

**Biochemische und strukturelle Untersuchungen der
Biosynthese unnatürlicher Aminosäuren als Bausteine
nicht-ribosomaler Peptide**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Verena Helmetag

geb. Pohlmann

aus Bad Arolsen

Marburg an der Lahn, 2009

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel von Oktober 2006 bis September 2009 an der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
am _____ angenommen.

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel
Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Lars-Oliver Essen

Tag der mündlichen Prüfung am: 16. Dezember 2009

Der Hauptteil dieser Arbeit wurde in folgenden Artikeln publiziert:

Pohlmann, V. and Marahiel, M. A. δ -Amino group hydroxylation of L-ornithine during coelichelin biosynthesis. *Org Biomol Chem* **2008**, 6, 1843-1848.

Helmetag, V., Samel, S. A., Thomas, M. G., Marahiel, M. A. and Essen, L.-O. Structural basis for the *erythro*-stereospecificity of the L-arginine oxygenase VioC in viomycin biosynthesis. *FEBS J* **2009**, 276, 3669-3682.

Im Verlauf der Promotion wurde weiterhin folgender Artikel veröffentlicht:

Wittmann, M., Linne, U., Pohlmann, V. and Marahiel, M. A. Role of DptE and DptF in the lipidation reaction of daptomycin. *FEBS J* **2008**, 275, 5343-5354.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Biochemische und strukturelle Untersuchungen der Biosynthese unnatürlicher Aminosäuren als Bausteine nicht-ribosomaler Peptide“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

Für Thomas

Zusammenfassung

Nicht-ribosomal synthetisierte Peptide weisen eine hohe strukturelle Vielfalt auf, die durch die Anwesenheit vieler nicht-proteinogener Bausteine hervorgerufen wird. Es wurde gezeigt, dass diese Bausteine oft essentiell für die Bioaktivität des jeweiligen Naturstoffs sind, jedoch ist die Biosynthese vieler dieser Bausteine weitestgehend nicht verstanden. Die hier vorgestellte Arbeit beschäftigt sich mit drei chemisch anspruchsvollen Modifikationsreaktionen an freien Aminosäuren, die effektiv durch so genannte Modifikationsenzyme durchgeführt werden. Die ungewöhnlichen, modifizierten Aminosäuren dienen dann als Synthesebausteine für die nicht-ribosomale Peptidsynthese.

Im ersten Teil der Arbeit wird der Biosyntheseweg von N^{δ} -hydroxylierten und N^{δ} -formylierten Ornithin-Resten *in vitro* untersucht. Diese Bausteine werden für die Biosynthese des Tris-Hydroxamat-Siderophors Coelichelin benötigt, in dem sie für die Komplexierung von Eisen(III)-Ionen verantwortlich sind. Für die Untersuchungen wurden die Flavin-abhängige Monooxygenase CchB und die Formyltransferase CchA aus *Streptomyces coelicolor* rekombinant hergestellt und biochemisch charakterisiert. Für CchB konnte, im Gegensatz zu CchA, Aktivität *in vitro* nachgewiesen werden. Da das Enzym ausschließlich freies L-Ornithin hydroxylierte, konnte gezeigt werden, dass diese Hydroxylierungsreaktion den ersten Schritt in der Biosynthese von Coelichelin darstellt und somit essentiell für dessen Produktion ist.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der stereospezifischen C_{β} -Hydroxylierung von L-Arginin, die von einem organisch-synthetischen Standpunkt aus betrachtet sehr aufwendig ist. Diese Reaktion wird von der nicht-Häm Eisen(II)- und α -Ketoglutarat-abhängigen Monooxygenase VioC aus *Streptomyces vinaceus* katalysiert und resultiert in dem Baustein erythro- β -Hydroxy-Arginin. Dieser wird nach einer weiteren Modifikationsreaktion in das Peptidgerüst des Antibiotikums Viomycin eingebaut. Interessanterweise katalysiert der Großteil von nicht-Häm Eisen(II)-/ α -Ketoglutarat-abhängigen Monooxygenasen die Bildung von *threo* Diastereomeren. Neben der biochemischen Charakterisierung von VioC wurde in dieser Arbeit auch die Lösung der Kristallstruktur der Monooxygenase durchgeführt. Anhand der erhaltenen Daten konnten die unerwartete Substrattoleranz von VioC und die für diese Enzymklasse ungewöhnliche *erythro* Stereochemie erklärt werden.

Eine weitere C_{β} -Funktionalisierung einer freien Aminosäure wird im dritten Teil dieser Arbeit untersucht. Der nicht-proteinogene Vorläuferbaustein (2*S*,3*S*)- β -Methyl-Phenylalanin, dessen chemische Synthese sehr anspruchsvoll ist, wird in das Glykopeptid-Antibiotikum Mannopectimycin in *Streptomyces hygroscopicus* eingebaut. Um den Biosyntheseweg zu untersuchen, wurde die *S*-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferase MppJ *in vitro* auf Aktivität getestet. Es konnte gezeigt werden, dass nicht wie erwartet Phenylalanin direkt methyliert wird, sondern dass die α -Ketosäure Phenylpyruvat von MppJ zu β -Methyl-Phenylpyruvat konvertiert wird. Eine anschließende Transaminierungsreaktion mit der Pyridoxal-5'-Phosphat-abhängigen Aminotransferase IlvE aus dem Primärmetabolismus von *Streptomyces coelicolor* resultierte in der Bildung der beiden Diastereomere (2*S*,3*S*)- und (2*S*,3*R*)- β -Methyl-Phenylalanin. Es konnte nicht endgültig gezeigt werden, ob die MppJ-katalysierte Methylierungsreaktion stereospezifisch verläuft oder nicht. Allerdings wurden in dieser Arbeit neue Erkenntnisse bezüglich der C_{β} -Funktionalisierung von Phenylalanin bzw. Phenylpyruvat erhalten.

Abkürzungen und Fachbegriffe

Generelle Abkürzungen und Fachbegriffe

Abkürzung	Ausgeschriebene Bezeichnung
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-Ethylbenzothiazolin-6-Sulfonsäure)
AcOH	Essigsäure
ACP	Acyl-Carrier-Protein
A-Domäne	Adenylierungsdomäne
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
Alloc	Allyl-Oxycarbonyl
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Boc	Tert-Butyl-Oxycarbonyl
CDA	Calcium-abhängiges Antibiotikum
C-Domäne	Kondensationsdomäne
CoA-SH	Coenzym A
Cy-Domäne	Zyklisierungsdomäne
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
E-Domäne	Epimerisierungsdomäne
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eq	Äquivalent
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FAD	Flavinadenindinukleotid
F-Domäne	Formylierungsdomäne
FMN	Flavinadeninmononukleotid
FMO	Flavin-enthaltende Monooxygenase
Fmoc	9-Fluorenyl-Methyl-Oxycarbonyl
FPLC	Schnelle Flüssigkeitschromatographie
FTHFS	Formyltetrahydrofolat Synthetase

hArg	β -Hydroxy-Arginin
hAsn	β -Hydroxy-Asparagin
HBTU	<i>O</i> -Benzotriazol- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
Hepes	2- <i>N'</i> -[<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure
hfOrn	<i>N</i> ⁵ -Hydroxyformyl-Ornithin
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
hOrn	<i>N</i> ⁵ -Hydroxy-Ornithin
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IPNS	Isopenicillin N Synthase
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalacto-Pyranosid
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laserdesorption-Flugzeit
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
<i>N</i> ¹⁰ -fH ₄ F/ <i>N</i> ⁵ -fH ₄ F	<i>N</i> ¹⁰ -Formyltetrahydrofolat/ <i>N</i> ⁵ -Formyltetrahydrofolat
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NFPA	Nonafluorpentansäure
NRPS	Nicht-ribosomale Peptidsynthetase
NTA	Nitrilotriessigsäure
Ox-Domäne	Oxidationsdomäne
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCP	Peptidyl-Carrier-Protein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Proteindatenbank
PHBH	<i>p</i> -Hydroxybenzoat-Monooxygenase
PKS	Polyketidsynthase
PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
PMP	Pyridoxamin-Phosphat
Ppan	4'-Phosphopantethein
PP _i	anorganisches Phosphat
PPTase	4'-Phosphopantetheinyl-Transferase
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-Pyrrolidino-Phosphonium-Hexafluorophosphat
R-Domäne	Reduktasedomäne
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
RT	Raumtemperatur
SAM	<i>S</i> -Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIM	Single-Ion Modus

SNAC	<i>N</i> -Acetylcysteamin
SPPS	Peptid-Festphasensynthese
TE-Domäne	Thioesterasedomäne
TFA	Trifluoressigsäure
TFE	Trifluorethanol
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
t_R	Retentionszeit
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v; w/v	Volumen/Volumen; Masse/Volumen
α KG	α -Ketoglutarat
β -Me-Phe	β -Methyl-Phenylalanin

Proteinogene Aminosäuren

Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamat	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Ornithin	Orn	O
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	VI
ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE.....	VII
INHALTSVERZEICHNIS.....	X
1. EINLEITUNG	1
1.1 Nicht-ribosomale Peptidsynthese.....	2
1.1.1 Die essentiellen Domänen.....	3
1.1.1.1 Elongation von nicht-ribosomal synthetisierten Peptiden.....	3
1.1.1.2 Termination der nicht-ribosomalen Peptidsynthese.....	5
1.1.1.3 Strukturelle Einsichten in ein Terminationsmodul	5
1.1.2 Optionale Domänen.....	6
1.1.2.1 Die Epimerisierungsdomäne.....	6
1.1.2.2 Die <i>N^α</i> -Methylierungsdomäne	6
1.1.2.3 Die <i>N^α</i> -Formylierungsdomäne	7
1.1.2.4 Weitere optionale Domänen	7
1.1.3 Klassifizierung der nicht-ribosomalen Peptidsynthese-Systeme	8
1.1.3.1 Lineare nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (TypA).....	8
1.1.3.2 Iterative nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (TypB).....	8
1.1.3.3 Nicht-lineare nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (TypC).....	8
1.2 Durch Modifikationsenzyme vermittelte strukturelle Vielfalt von nicht-ribosomal synthetisierten Peptiden.....	9
1.2.1 Flavin-abhängige Monooxygenasen	10
1.2.2 Nicht-Häm Fe(II)-abhängige Oxygenasen.....	14
1.2.3 <i>S</i> -Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferasen	19
1.2.4 Weitere Modifikations-Enzymklassen	23
1.3 Die Naturstoffe Coelichelin, Viomycin und Mannopeptimycin.....	25
1.3.1 Das Tris-Hydroxamat-Siderophor Coelichelin	26
1.3.2 Das Tuberactinomycin-Antibiotikum Viomycin	28
1.3.3 Das Glykopeptid-Antibiotikum Mannopeptimycin	32
1.4 Aufgabenstellung.....	36
2. MATERIAL	37
2.1 Geräte	37
2.2 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.....	39
2.3 Vektoren.....	41
2.3.1 pCB28a(+)	41
2.3.2 pET151/D-TOPO	41
2.3.3 pBAD102/D-TOPO.....	42
2.4 Oligonukleotide.....	42
2.5 Mikroorganismen	43
2.5.1 <i>Escherichia coli</i> TOP10	43
2.5.2 <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).....	43
2.5.3 <i>Streptomyces</i> Spezies	44

2.6 Kulturmedien	44
2.6.1 LB-Medium.....	44
2.6.2 Medium 65	44
3. METHODEN	45
3.1 Molekularbiologische Methoden	45
3.1.1 Kultivierung der <i>Streptomyces</i> Spezies und Präparation von chromosomaler DNA	45
3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA.....	45
3.1.3 Konstruktion der rekombinanten Expressionsplasmide	46
3.1.3.1 Die Coelichelin-Cluster-Konstrukte	46
3.1.3.2 Konstruktion von pET28a(+)[vioC]	47
3.1.3.3 Die Mannopectimycin-Cluster-Konstrukte.....	47
3.2 Proteinchemische Methoden	48
3.2.1 Genexpression	48
3.2.1.1 Expression unter Verwendung des pCB28a(+)-Vektors.....	48
3.2.1.2 Expression unter Verwendung des pET151/D-TOPO-Vektors	49
3.2.1.3 Expression unter Verwendung des pBAD102/D-TOPO-Vektors.....	49
3.2.2 Proteinreinigung	50
3.2.2.1 Zellaufschluss	50
3.2.2.2 Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie.....	50
3.2.2.3 Gelfiltrationschromatographie und Dialyse der rekombinanten Proteine	50
3.2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	51
3.3 Analytische Methoden	52
3.3.1 MALDI-MS.....	52
3.3.2 HPLC-MS.....	52
3.3.3 Peptid-Massenfingerabdruck.....	53
3.4 Chemische Synthesen	53
3.4.1 Synthese von N ^δ -Formyl-Ornithin	53
3.4.2 Synthese von N ^δ -Hydroxy-Ornithin	55
3.4.3 Synthese des SNAC-aktivierten Tetrapeptids D-Orn-D-Thr-L-Orn-D-Orn	57
3.4.4 Synthese eines Coenzym A-Phenylalanin-Thioesters.....	59
3.4.5 Synthese von (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)- und (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-β-Methyl-Phenylalanin.....	60
3.5 Biochemische Methoden	62
3.5.1 CchB-katalysierter Hydroxylierungsassay	62
3.5.2 CchA-katalysierter Formylierungsassay	63
3.5.3 C _β -Hydroxylierungsreaktion katalysiert durch VioC.....	64
3.5.4 MppJ-katalysierter Methylierungsassay mit α-Ketosäuren oder Aminosäuren	65
3.5.5 Methylierungsassay mit MppJ und Phe- <i>S</i> -PCP.....	65
3.5.6 Gekoppelter Methylierungs- und Transaminierungsassay	66
3.5.7 Bestimmung der Konfiguration von enzymatisch hergestelltem β-Me-Phe	67
3.5.8 Untersuchung der Razemisierungsempfindlichkeit von β-Methyl-Phenylpyruvat. 67	
3.6 Kristallographie und Strukturaufklärung	68
3.6.1 Kristallisation von VioC.....	68
3.6.2 Datensammlung und Strukturbestimmung.....	68
4. ERGEBNISSE	70
4.1 Biosynthese der N^δ-modifizierten Ornithin-Bausteine aus Coelichelin	70
4.1.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung von <i>cchB</i> und <i>cchA</i>	71
4.1.2 Biochemische Charakterisierung der Monooxygenase CchB.....	72

4.1.2.1 Hydroxylierungs-Aktivität von CchB	72
4.1.2.2 pH-Abhängigkeit der CchB-Aktivität	74
4.1.2.3 Substratspezifität von CchB	74
4.1.3 Biochemische Charakterisierung der putativen Formyltransferase CchA	75
4.2 Strukturelle Erklärung für die erythro Stereospezifität der Monooxygenase VioC	78
4.2.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung von <i>vioC</i>	78
4.2.2 Substratspezifität und kinetische Parameter von VioC	79
4.2.3 Kristallstruktur von VioC	82
4.2.3.1 Allgemeine Strukturbeschreibung	82
4.2.3.2 Aktives Zentrum von VioC	84
4.2.3.3 Deckel-Region von VioC	88
4.2.3.4 Datenstatistik der VioC-Strukturen	88
4.3 Biosynthese des β-Methyl-Phenylalanin-Bausteins aus Mannopectimycin	89
4.3.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung von <i>mppJ</i> , <i>mppP</i> , <i>mppQ</i> , <i>mppA-PCP₃</i> und <i>IlvE</i>	90
4.3.2 Methylierungs-Aktivität von MppJ	91
4.3.3 Substratspezifität von MppJ	92
4.3.4 Transaminierung von enzymatisch hergestelltem β -Methyl-Phenylpyruvat	93
4.3.5 Bestimmung der Konfiguration von enzymatisch gebildetem β -Me-Phe	96
4.3.6 Zeitabhängigkeit der MppJ-katalysierten Methylierungsreaktion	97
4.3.7 Untersuchung der Razemisierungssensitivität von (3 <i>S</i>)- β -Methyl-Phenylpyruvat	97
5. DISKUSSION	99
5.1 Biosynthese der N^{δ}-modifizierten Ornithin-Bausteine aus Coelichelin	99
5.1.1 Biochemische Charakterisierung der Monooxygenase CchB	100
5.1.2 Biochemische Charakterisierung der putativen Formyltransferase CchA	104
5.1.3 Schlussfolgerungen	107
5.2 Strukturelle Erklärung für die erythro Stereospezifität der Monooxygenase VioC	109
5.2.1 Biochemische Charakterisierung der Monooxygenase VioC	110
5.2.2 Kristallstrukturen von VioC	113
5.2.3 Schlussfolgerungen	118
5.3 Biosynthese des β-Methyl-Phenylalanin-Bausteins aus Mannopectimycin	119
5.3.1 Sequenzvergleich von MppJ mit SAM-abhängigen C-Methyltransferasen	120
5.3.2 Katalysemechanismen der MppJ-vermittelten Methylierung und der IlvE- katalysierten Transaminierung	122
5.3.3 Substratspezifität von MppJ und kinetische Parameter der Methylierungsreaktion	124
5.3.4 Transaminierung von β -Methyl-Phenylpyruvat	126
5.3.5 Untersuchungen zur Stereospezifität von MppJ	128
5.3.6 Schlussfolgerungen	129
6. LITERATUR	132
7. ANHANG	144
DANKSAGUNG	146

1. Einleitung

Viele Sekundärmetabolite von Pflanzen, Bakterien oder Pilzen, die schon seit vielen Jahren als medizinische Wirkstoffe verwendet werden, sind peptidischer Herkunft. Zum Beispiel wird das Peptid-Antibiotikum-Gemisch Tyrothricin zur Behandlung von Entzündungen von Hals, Rachen und Magenschleimhaut verwendet.^[1] Auch das von Alexander Fleming 1928 entdeckte β -Laktam-Antibiotikum Penicillin findet bis heute Anwendung in der Behandlung von bakteriellen Erkrankungen.^[2] Allerdings wurde durch den verbreiteten Einsatz von Antibiotika, z.B. in der Tiermast, die Resistenzbildung von Bakterienstämmen gegen diese Antibiotika gefördert.^[3] Mittlerweile haben insbesondere Kliniken mit multiresistenten Erregern, wie z.B. den Gram-positiven Organismen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* oder Enterokokken, zu kämpfen.^[4] Selbst gegen das in den neunziger Jahren zur Bekämpfung dieser Stämme häufig verwendete Glykopeptid-Antibiotikum Vancomycin treten zunehmend Resistenzen auf.^[5] Deshalb ist es von großer Bedeutung, kontinuierlich neue Antibiotika zu entdecken und zu entwickeln. Hierbei können die Produkte des Sekundärmetabolismus von Mikroorganismen sehr hilfreich sein, da viele Verbindungen mit antibakteriellen oder Antitumor-Aktivitäten aus Mikroorganismen isoliert werden konnten.^[6] Nach der Entdeckung neuer Sekundärmetaboliten ist die Aufklärung ihrer Biosynthese essentiell, um z.B. durch genetische Manipulation neue und optimierte Naturstoffanaloga erhalten zu können oder die Ausbeute mittels „pathway engineerings“ zu erhöhen.

Neben den Antibiotika stellen die von Mikroorganismen produzierten Siderophore eine weitere große Substanzklasse des Sekundärmetabolismus dar. Da Eisen zwar als essentielles Element von vielen Organismen für zahlreiche Stoffwechselwege benötigt wird, aber häufig nur in der unlöslichen Fe(III)-Form in der Umgebung dieser Mikroorganismen vorliegt, werden Moleküle mit hoher Affinität zu Eisen produziert und aus den Zellen ausgeschleust. Diese Siderophore komplexieren extrazellulär Eisen, werden in der beladenen *holo* Form durch spezifische Rezeptoren und Transporter erkannt und in den Zellinnenraum transportiert. Im Cytosol wird das Eisen hydrolytisch oder reduktiv vom Siderophor freigesetzt und zu den intrazellulären Zielproteinen transportiert. Somit wird die Eisen-Homöostase der Zelle aufrechterhalten.^[7,8]

Bei vielen Siderophoren handelt es sich ebenso wie bei einer Vielzahl an Antibiotika um Polypeptide oder Polyketide, die eine hohe strukturelle Diversität aufweisen. Der größte Anteil dieser Verbindungen wird durch große Multienzymkomplexe, den so genannten nicht-

ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) oder den Polyketid-Synthetasen (PKS), hergestellt.^[9-12] Die nicht-ribosomal synthetisierten Peptide enthalten nicht nur die 20 proteinogenen Aminosäuren, sondern es sind bis heute mehr als 500 Bausteine bekannt, die von den NRPS verwendet werden können.^[13] Diese Monomere werden häufig durch so genannte Modifikationsenzyme hergestellt oder modifiziert. Da einige dieser Enzyme in dieser Arbeit untersucht wurden, wird in der Einleitung noch genauer auf die unterschiedlichen Enzymklassen und verwendeten Mechanismen für die Vorläufermolekül-Synthese eingegangen (Abschnitt 1.2). Zudem trägt der modulare Aufbau der NRP Synthetasen und PK Synthetasen zu der hohen strukturellen Vielfalt von Sekundärmetaboliten bei, da z.B. auch Hybridmoleküle aus Peptiden und Polyketiden synthetisiert werden können.^[12] Durch die biochemische und strukturelle Charakterisierung dieser Enzymklasse konnte ein detailliertes Wissen über die Mechanismen der nicht-ribosomalen Peptidsynthese erhalten werden, das in Abschnitt 1.1 dieser Einleitung vorgestellt wird. Ein weiterer Abschnitt der Einleitung ist den in dieser Arbeit untersuchten nicht-ribosomal assemblierten Naturstoffen gewidmet (Abschnitt 1.3).

1.1 Nicht-ribosomale Peptidsynthese

In diesem Abschnitt werden die grundlegenden mechanistischen Aspekte der nicht-ribosomalen Peptidsynthese erläutert. Bei den Synthetasen handelt es sich um hoch geordnete, modular organisierte, multifunktionale Enzyme, die beachtliche molekulare Größe erreichen können.^[10,14,15] So stellt z.B. die Cyclosporin A-Synthetase mit einer Größe von 1.6 MDa eine der größten natürlichen Polypeptidketten dar.^[16] Im Gegensatz zu der ribosomalen Peptidsynthese findet die nicht-ribosomale Synthese ohne mRNA-Templat statt, wobei der modulare Aufbau der jeweiligen NRPS die Struktur des synthetisierten Peptids widerspiegelt. Jedes Modul ist für den Einbau eines bestimmten Bausteins, meistens einer Aminosäure, in das Produkt verantwortlich.^[10] Daher entspricht meistens die Modulanzahl der NRPS der Anzahl der eingebauten Aminosäuren und die Anordnung der Module entspricht der Primärsequenz der Polypeptidkette, da die Peptidsynthese vom N- zum C-Terminus erfolgt. Von dieser Kolinearität gibt es jedoch auch Ausnahmen, die in Abschnitt 1.1.3 behandelt werden.^[17]

Jedes NRPS-Modul ist in einzelne Domänen unterteilt, die die Reaktionsschritte der Peptidsynthese katalysieren.^[9,18] Die Funktionsweisen der einzelnen Domänen werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

1.1.1 Die essentiellen Domänen

1.1.1.1 Elongation von nicht-ribosomal synthetisierten Peptiden

Für einen Elongationsschritt während der nicht-ribosomalen Peptidsynthese werden drei Enzyme benötigt, die als essentielle Domänen bezeichnet werden. Die Adenylierungs (A)-Domäne, das Peptidyl-Carrier-Protein (PCP) und die Kondensations (C)-Domäne. Die von diesen Domänen katalysierten Reaktionen, die schematisch in Abb. 1.1 dargestellt sind, werden im Folgenden näher erläutert.

Im ersten Schritt der Elongationsreaktion kontrolliert die ca. 550 Aminosäuren lange A-Domäne den Substrateintritt in die Synthese, da sie eine Aminosäure oder einen Baustein spezifisch erkennt und unter Mg^{2+} -abhängiger ATP-Hydrolyse als Aminoacyl-Adenylat-Intermediat aktiviert.^[19,20] Durch die Strukturaufklärung der PheA A-Domäne des Gramicidin S-NRPS-Systems wurde die Aminosäure-Bindungstasche im aktiven Zentrum identifiziert.^[19] Mit diesen Informationen konnte ein Spezifitäts-Code ermittelt werden, womit nur aufgrund der A-Domänen-Aminosäuresequenz anhand von zehn spezifischen Resten die Substratspezifität einer A-Domäne vorhergesagt werden kann.^[21] Im zweiten Schritt wird die aktivierte Aminosäure auf die Thiolgruppe des 4'-Phosphopantethein (Ppan)-Kofaktors eines PCPs übertragen.^[22]

Das PCP besteht aus ca. 80 Aminosäuren und wird in einem als „priming“ bezeichneten Prozess posttranslational von der *apo* in die *holo* Form überführt. Hierbei wird der Ppan-Kofaktor von Coenzym A (CoA) durch die Katalyse von 4'-Phosphopantetheinyl-Transferasen (PPTasen) auf einen konservierten Serinrest der PCPs übertragen.^[23] Ein biochemisch und strukturell gut untersuchtes Mitglied dieser Enzymklasse ist die PPTase Sfp aus *Bacillus subtilis*.^[24,25] Sie weist eine geringe Substratspezifität auf und überträgt daher auch funktionalisierte CoA-Derivate auf nahezu jedes beliebige PCP. Wegen dieser niedrigen Substratspezifität können *in vivo* auch Acyl-CoA-Derivate anstelle von CoA auf PCPs übertragen werden, die die nicht-ribosomale Peptidsynthese blockieren. Um dies zu verhindern werden die Acylgruppen durch alleinstehende Thioesterasen des Typs II (TE II) durch hydrolytische Thioesterspaltung entfernt.^[26] Diese Enzyme werden vermutlich auch für die Entfernung von Aminosäuren verwendet, die fälschlicherweise auf die NRPS geladen wurden.^[27] Um die Peptidbindung katalysieren zu können, muss das Substrat zu dem katalytischen Zentrum der folgenden Kondensationsdomäne transportiert werden. Dies wird dadurch gewährleistet, dass das Substrat während der gesamten Synthese kovalent an die Thiolgruppe des 20 Å langen Ppan-Kofaktors gebunden bleibt.^[22,28] NMR-Studien haben gezeigt, dass sich diese Thiolgruppe um ca. 16 Å bewegen kann und so die gebundenen

Reaktionsintermediate weitertransportiert.^[29] Da die Intermediate somit nicht frei diffundieren, wird die katalytische Effizienz der Synthese gesteigert und Nebenprodukte werden minimiert.^[18]

Die eigentliche Peptidbindungsbildung wird durch die Kondensationsdomäne (ca. 450 Aminosäuren) katalysiert.^[30,31] Dabei wird der nukleophile Angriff der freien α -Aminogruppe der abwärts gelegenen PCP-gebundenen Aminosäure auf die Thioesterbindung des aufwärts gelegenen PCP-gebundenen Intermediats katalysiert. Die C-Domäne besitzt eine Donor- und eine Akzeptorstelle, die Spezifität für das jeweilige Elektrophil und Nukleophil aufweisen und so die Katalyse steuern können.^[17] Dabei ist neben der Identität der Substrate auch deren Stereochemie entscheidend.^[32,33] Dies zeigt, dass während der nicht-ribosomalen Peptidsynthese nicht nur die A-Domänen sondern auch die C-Domänen Einfluss auf die Spezifität haben. Anhand der Kristallstrukturen von VibH, einer freistehenden C-Domäne aus dem Biosynthesystem des Siderophors Vibriobactin,^[34] und der PCP-C-Domäne der Module 5 und 6 der Tyrocidin-Synthetase TycC aus *Bacillus brevis*^[35] konnten erste Einblicke in den Mechanismus der C-Domänen gewonnen werden. Dabei ist der zweite konservierte Histidin-Rest des Kernmotivs HHXXXDG im aktiven Zentrum von zentraler Bedeutung.

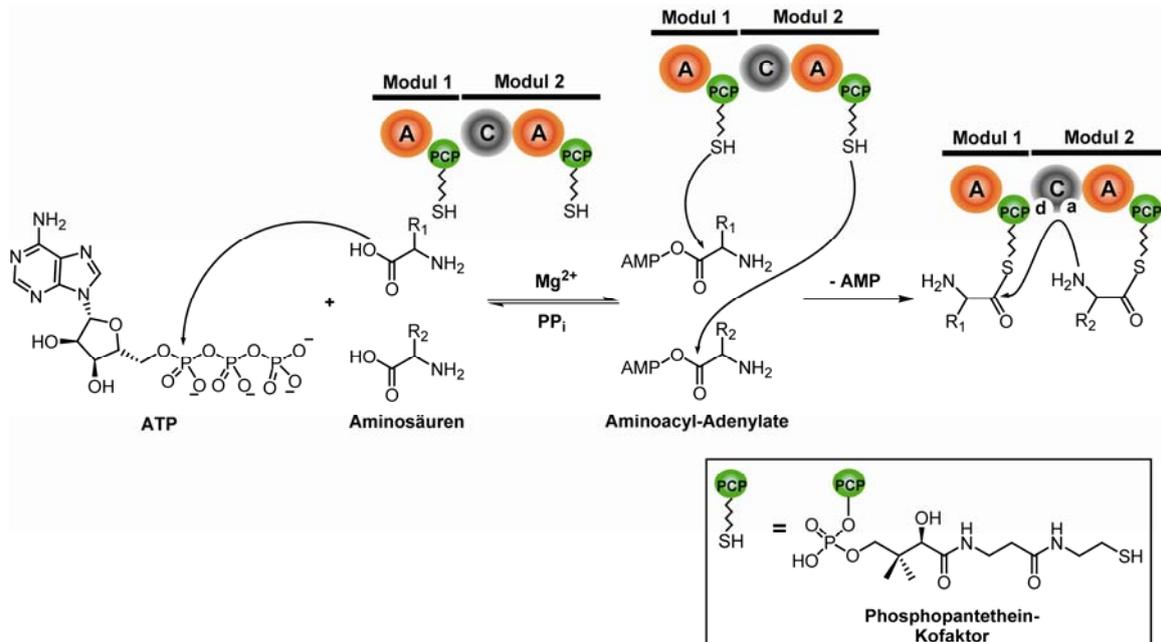


Abbildung 1.1: Schematische Übersicht der durch die drei essentiellen Domänen der nicht-ribosomalen Peptidsynthese katalysierten Reaktionen. Zunächst werden spezifische Aminosäuren durch die A-Domänen erkannt und unter ATP-Verbrauch als Aminoacyl-Adenylate aktiviert. Anschließend erfolgt der Transfer auf den PCP-gebundenen Ppan-Kofaktor. Abschließend katalysiert die C-Domäne die Amidbindungsbildung zweier benachbarter Substrate. d = Donorstelle der C-Domäne; a = Akzeptorstelle der C-Domäne.

Nach der ersten Peptidkupplungsreaktion erfolgt die schrittweise Kondensation der jeweiligen Intermediate mit an den PCPs von abwärts gelegenen Elongationsmodulen gebundenen

Aminosäuren. Dieser Mechanismus weist Analogie zu einer Fließband-artigen Assemblierung auf. Beispiele für solche „Fließbänder“, wo nicht nur mehrere Module sondern auch mehrere Synthetasen an der nicht-ribosomalen Peptidsynthese beteiligt sind, werden in dem Abschnitt 1.3 dieser Einleitung näher vorgestellt.

1.1.1.2 Termination der nicht-ribosomalen Peptidsynthese

Das letzte Modul einer NRPS, das so genannte Terminationsmodul, ist meistens für die Freisetzung des Peptids verantwortlich. Dieser Schritt wird häufig von einer zusätzlichen Domäne, der Thioesterase (TE)-Domäne (ca. 280 Aminosäuren), katalysiert. Dabei spielt ein konservierter Serinrest, der Teil einer katalytischen Triade (Serin, Histidin und Aspartat) ist, eine entscheidende Rolle.^[36] Auf diesen Serinrest wird das am benachbarten PCP gebundene Peptidyl-Intermediat übertragen. Der gebildete Oxoester kann dann entweder von einem Nukleophil der Peptidkette intramolekular oder von Wasser intermolekular angegriffen werden. So findet entweder eine Makrozyklisierung^[11] oder eine hydrolytische Freisetzung des Produktes statt, wie es in der Vancomycin-Biosynthese beobachtet wurde.^[37] Eine weitere Strategie zur Freisetzung des Peptidproduktes ist die reduktive Spaltung durch eine Reduktase (R)-Domäne, die in dem Terminationsmodul der Gramicidin A- und Nostocyclopeptid-Synthetase identifiziert werden konnte.^[38,39]

1.1.1.3 Strukturelle Einsichten in ein Terminationsmodul

Die Struktur des vollständigen Terminationsmoduls der Surfactin-Synthetase konnte kürzlich gelöst werden (Abb. 1.2).^[40]

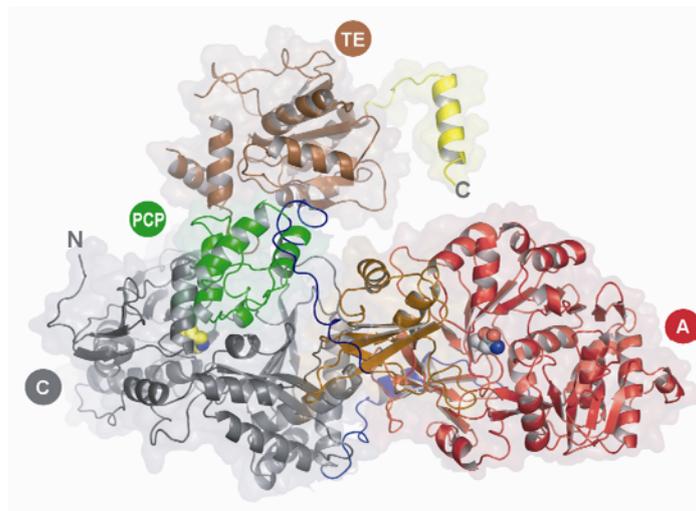


Abbildung 1.2: Kristallstruktur der Synthetase SrfA-C, die das Terminationsmodul des Surfactinbiosynthese-Clusters bildet. Ein im aktiven Zentrum der A-Domäne gebundenes Leucin-Molekül und der katalytisch aktive Rest H147 der C-Domäne sind kugelförmig dargestellt. Die C-Domäne ist grau und die A-Domäne ist rot (Kerndomäne) und orange (Subdomäne) dargestellt. Außerdem ist das PCP in grün und die TE-Domäne in braun gezeigt (aus Tanovic *et al.*).^[40]

Diese Kristallstruktur vermittelt erste Einblicke in die Anordnung der einzelnen Domänen innerhalb dieses Terminationsmoduls. Die C-Domäne und der Kern der A-Domäne bilden eine katalytische Plattform, auf deren Oberfläche das kleinere PCP und die C-terminale A-Subdomäne angeordnet sind. Im Gegensatz zu der kompakten Anordnung der C- und A-Domäne und des PCPs ist die terminale TE-Domäne ohne Interaktionen mit den anderen Domänen angeordnet. Sie ist nur über eine kurze Linker-Region mit dem PCP verbunden.^[40]

1.1.2 Optionale Domänen

Neben den in Abschnitt 1.1.1 vorgestellten essentiellen Domänen existieren in verschiedenen NRPS-Systemen weitere Domänen, die zwar zur strukturellen Vielfalt der nicht-ribosomal synthetisierten Produkte beitragen, aber für die Peptidelongation nicht essentiell sind. In diesem Abschnitt werden einige dieser Domänen näher betrachtet.

1.1.2.1 Die Epimerisierungsdomäne

Viele nicht-ribosomale Peptide weisen D-Aminosäurebausteine in ihrem Peptidrückgrat auf. Diese Bausteine nehmen zum einen Einfluss auf die für die Bioaktivität der Peptide benötigte Konformation und zum anderen verhindern sie den proteolytischen Abbau der Peptide.^[41] Häufig wird der Einbau von D-konfigurierten Substraten durch das Zusammenwirken von Epimerisierungs (E)-Domänen (ca. 450 Aminosäuren) und C-Domänen sichergestellt.^[42,43] Die E-Domänen sind in die nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen integriert und katalysieren mit Hilfe eines konservierten Histidin-Rests die C-terminale Epimerisierung von PCP-gebundenen Peptidketten oder Bausteinen. Die nächste zu einer E-Domäne abwärts gelegene C-Domäne weist in ihrer Donorstelle eine Spezifität für das D-konfigurierte Substrat auf und sorgt auf diese Weise für den selektiven Einbau der D-Aminosäure in das Peptid.^[32] E-Domänen sind häufig am C-terminalen Ende einer nicht-ribosomalen Peptidsynthetase lokalisiert, wo sie an der spezifischen Erkennung anderer Synthetasen über kleine helikale Einheiten beteiligt ist, die die Kommunikation vermitteln (COM-Domänen).^[44,45]

1.1.2.2 Die N^α-Methylierungsdomäne

In vielen nicht-ribosomal synthetisierten Peptiden, wie z.B. Cyclosporin,^[46] Pristinamycin^[47] und Actinomycin,^[48] sind N-methylierte Peptidbindungen vorhanden, deren Synthese von N^α-Methylierungs (M)-Domänen katalysiert wird.^[48,49] Die ca. 420 Aminosäuren umfassende M-Domäne ist meistens in das C-terminale Ende einer A-Domäne insertiert und verwendet S-Adenosylmethionin (SAM) als Kosubstrat. Biochemische Untersuchungen haben gezeigt,

dass die M-Domänen nur PCP-gebundene Substrate akzeptieren und dass die Methylierungsreaktion vor der Peptidbindungsbildung stattfindet. Während der katalysierten Reaktion greift die α -Aminogruppe der PCP-gebundenen Aminosäure nukleophil die aktivierte Methylgruppe des Kosubstrats SAM an.^[48,49]

1.1.2.3 Die N^α -Formylierungsdomäne

Obwohl die *N*-Formylierung in der Initiation der ribosomalen Peptidsynthese in Prokaryoten eine wichtige Rolle spielt,^[50] findet man diesen Mechanismus in der Initiation der nicht-ribosomalen Peptidsynthese sehr selten. Bisher sind zwei NRPS-Systeme bekannt, die am N-Terminus eine so genannte N^α -Formylierungs (F)-Domäne besitzen, die LgrA-Synthetase aus *Bacillus brevis*, die in die Biosynthese von linearem Gramicidin involviert ist^[38] und die ApdA-Synthetase aus dem Biosynthesecluster der Anabaenopeptilide.^[51] Bisher konnte für die F-Domäne (ca. 200 Aminosäuren) aus *Bacillus brevis* gezeigt werden, dass N^{10} -Formyltetrahydrofolat (N^{10} -fH₄F) als Formylgruppendonor fungiert und dass die F-Domäne nur PCP-gebundenes L-Valin oder L-Isoleucin an der N^α -Gruppe formyliert.^[52]

1.1.2.4 Weitere optionale Domänen

Zusätzlich zu den schon genannten Domänen gibt es weitere NRPS-assoziierte Domänen, die auch zur strukturellen Vielfalt von nicht-ribosomal synthetisierten Peptiden beitragen. In einigen Cystein-, Serin- und Threonin-spezifischen Modulen ersetzt die Zyklisierungs (Cy)-Domäne (ca. 450 Aminosäuren) die C-Domäne.^[53] Diese weist hohe Homologie zu C-Domänen auf und katalysiert neben der Peptidbindungsbildung auch die Bildung von heterozyklischen Fünfringen in der Peptidkette. Hierbei führt die Zyklisierung der Cysteinseitenkette mit der aufwärts gelegenen Carboxygruppe zu Thiazolinen und die Heterozyklisierung von Serin- oder Threonin-Seitenketten führt zu Oxazolinen.^[10,18,41]

Oft ist eine Oxidations (Ox)-Domäne (ca. 250 Aminosäuren) mit der Cy-Domäne assoziiert. Diese katalysiert die Flavinmononukleotid (FMN)-abhängige Oxidation von Thiazolin- und Oxazolinringen zu den stabileren Thiazol- und Oxazolringen.^[12,54]

Eine Reduktase (R)-Domäne kann neben der bereits erwähnten Peptidfreisetzung (Abschnitt 1.1.1.2) auch NADPH-abhängig die zwei-Elektronen-Reduktion von Thiazolinen zu Thiazolidinen katalysieren. Dies wurde in den NRPS-Systemen beobachtet, die für die Biosynthese der Siderophore Yersiniabactin und Pyochelin verantwortlich sind.^[55]

1.1.3 Klassifizierung der nicht-ribosomalen Peptidsynthese-Systeme

Die verschiedenen NRPS-Systeme lassen sich aufgrund der Domänenabfolge und der Reihenfolge der Reaktionen zum Aufbau des Peptidgerüsts in drei unterschiedliche Gruppen einteilen,^[17] die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

1.1.3.1 Lineare nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (TypA)

In linearen nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen sind die drei essentiellen Domänen eines Elongationsmoduls in der Reihenfolge C-A-PCP angeordnet. Allerdings besitzt das Initiationsmodul, das für die Aktivierung der N-terminalen Aminosäure einer Peptidkette verantwortlich ist, meistens keine C-Domäne. Die Reihenfolge und die Anzahl der Module von linearen nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen entsprechen der Sequenz der linearen Peptidkette. Durch das Terminationsmodul erfolgt die Freisetzung der Peptidkette mittels Zyklisierung, Hydrolyse oder Reduktion. Beispiele für diesen NRPS Typ findet man bei der Synthese der Antibiotika Tyrocidin,^[56] Daptomycin^[57] oder Surfactin.^[58]

1.1.3.2 Iterative nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (TypB)

Iterative nicht-ribosomale Peptidsynthetasen verwenden im Gegensatz zu linearen Synthetasen ihre Module mehrmals zum Aufbau eines Produkts. Allerdings sind die einzelnen Module auch hier linear angeordnet. Auf diese Weise können Peptidketten gebildet werden, die sich aus wiederholenden kleineren Untereinheiten zusammensetzen. Diese Einheiten werden durch die Elongationsmodule synthetisiert und an dem terminalen PCP oder einer TE-Domäne miteinander verknüpft. Ist die richtige Anzahl an Untereinheiten vorhanden, wird das vollständig synthetisierte Peptid von der Synthetase freigesetzt. Beispiele für iterativ synthetisierte Peptide sind z.B. das Siderophor Enterobactin, ein zyklisches Trimer aus Dihydroxybenzoylserin-Untereinheiten,^[59] und das Chromodepsipeptid Thiocoralin, dessen iterativ arbeitende TE-Domäne kürzlich biochemisch charakterisiert wurde.^[60]

1.1.3.3 Nicht-lineare nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (TypC)

Die nicht-linearen nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen weichen in ihrer Domänenorganisation innerhalb eines Moduls von der Standardabfolge C-A-PCP ab. Außerdem entspricht die Modulanzahl nicht immer der Anzahl der eingebauten Aminosäuren. Deshalb lässt sich das Produkt dieser Synthetasen häufig nicht korrekt vorhersagen. Die Abweichung vom typischen Modulaufbau führt oft zu nicht-linearen Produkten, die aus internen Zyklisierungen oder Verzweigungen des Peptids resultieren. Ein Beispiel hierfür ist das

verzweigte Tetrapeptid-Siderophor Coelichelin, dessen Biosynthese später in dieser Einleitung näher erläutert wird (Abschnitt 1.3.1).^[61] Außerdem wird in nicht-linearen Systemen häufig beobachtet, dass einem Modul eine Adenylierungsdomäne fehlt. Das entsprechende PCP wird dann entweder von einer in die Synthetase integrierten A-Domäne mit einem Baustein beladen oder die Aktivierung einer Aminosäure erfolgt *in trans* durch eine andere Synthetase oder alleinstehende A-Domäne. Beispiele hierfür finden sich in der Kutznerid-Biosynthese^[62] sowie in der Biosynthese von Syringomycin^[63] und den Capreomycinen.^[64]

1.2 Durch Modifikationsenzyme vermittelte strukturelle Vielfalt von nicht-ribosomal synthetisierten Peptiden

Neben den *in cis* arbeitenden Modifikationsdomänen (siehe Abschnitt 1.1.2) wird die strukturelle Diversität von nicht-ribosomal synthetisierten Peptiden durch Modifikationsenzyme erzeugt, die zwar mit den nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen assoziiert sind, aber *in trans* agieren. Dabei können die Modifikationsenzyme in die Biosynthese von Bausteinen für die nicht-ribosomale Peptidsynthese involviert sein. Diese Bausteine leiten sich häufig von proteinogenen Aminosäuren ab und werden entweder vor der Aktivierung durch die NRPS modifiziert oder die Modifikationsenzyme arbeiten *in trans* während die Aminosäure an das entsprechende Carrier-Protein gebunden vorliegt.^[65,66] Zudem sind auch Enzyme bekannt, die das vollständig synthetisierte Peptidrückgrat z.B. durch Übertragung von Zuckern modifizieren.^[67] Abbildung 1.3 zeigt einige Beispiele nicht-ribosomal synthetisierter Peptide, die strukturelle Besonderheiten aufgrund von Modifikationsreaktionen durch *in trans* arbeitende Enzyme aufweisen.

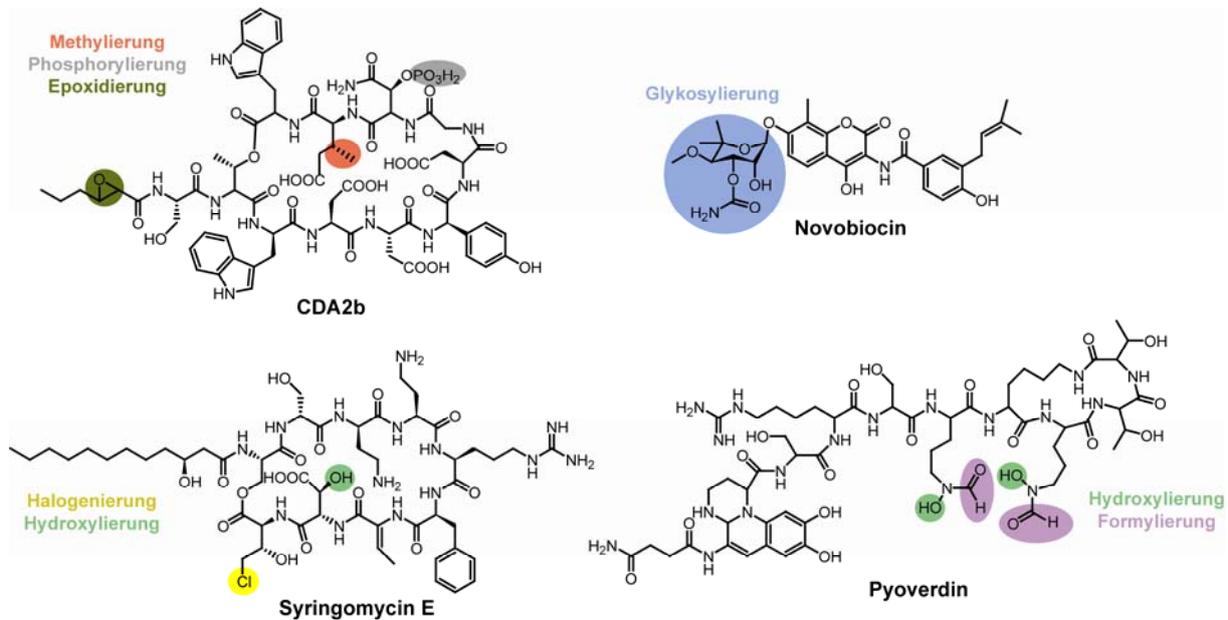


Abbildung 1.3: Beispiele für die hohe strukturelle Vielfalt von nicht-ribosomal synthetisierten Peptiden, die durch *in trans* arbeitende Enzyme modifiziert wurden. Gezeigt sind die Moleküle CDA2b (Calcium-abhängiges Antibiotikum),^[68] Novobiocin,^[69] Syringomycin E^[70,71] und Pyoverdine^[72,73] und die jeweilige Position der Modifikation ist farblich unterlegt.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung einiger Modifikationsenzyme, die in die Biosynthese von nicht-proteinogenen Bausteinen für die nicht-ribosomale Peptidsynthese involviert sind. Deshalb werden in diesem Abschnitt zunächst die Enzymklassen näher vorgestellt, denen die in dieser Arbeit betrachteten Modifikationsenzyme zugeordnet werden können. Anschließend wird ein Überblick über weitere Enzymklassen gegeben, die auch an Modifikationsreaktionen während der nicht-ribosomalen Peptidsynthese beteiligt sind.

1.2.1 Flavin-abhängige Monooxygenasen

Katalysierte Reaktionen:

Die Enzymklasse der Flavin-abhängigen Monooxygenasen katalysiert eine große Anzahl an verschiedenen Oxygenierungsreaktionen, wobei die meisten Oxygenasen eine hohe Regio- und/oder Stereoselektivität aufweisen. Es können Hydroxylierungen, Epoxidierungen, Bayer-Villiger Oxidationen oder Sulfoxidationen katalysiert werden (Abb. 1.4).^[74]

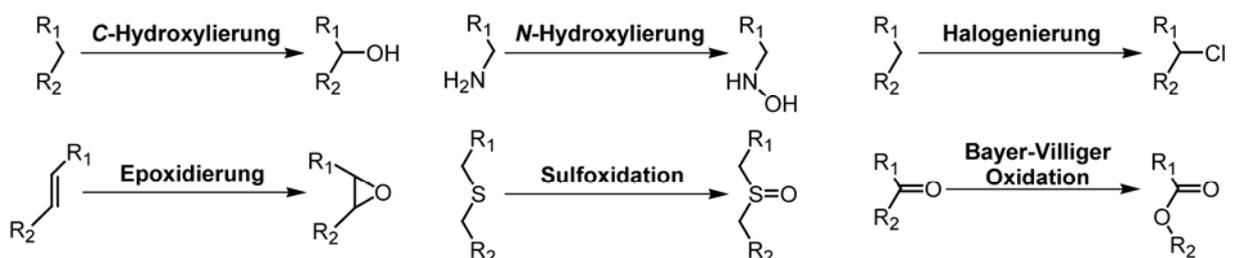


Abbildung 1.4: Überblick über Reaktionen, die von Flavoprotein-Monooxygenasen katalysiert werden.

Für die Katalyse der hier gezeigten Reaktionen benötigen die Enzyme den Flavin-Kofaktor in seiner reduzierten Form. Da die Elektronen für die Reduktion von FAD oder FMN in den meisten Flavin-abhängigen Oxygenasen von den reduzierten Kosubstraten NADH oder NADPH zur Verfügung gestellt werden, werden diese Enzyme externe Flavoprotein-Monooxygenasen genannt.^[74] Es existieren allerdings auch Beispiele für interne Flavoprotein-Monooxygenasen, wo der Flavin-Kofaktor durch das Substrat reduziert wird. So oxidiert die Laktat Monooxygenase Laktat zu Pyruvat und reduziert dadurch das Flavin. Dieses wiederum reagiert mit molekularem Sauerstoff, um das gebildete Pyruvat in Kohlendioxid und Acetat zu konvertieren.^[75] Alle bisher bekannten internen und externen Flavoprotein-Monooxygenasen binden ihren Kofaktor FAD oder FMN nicht-kovalent in der Nukleotidbindungsstelle. Doch ist auch kovalent gebundenes FAD oder FMN bekannt, wie z.B. in der Vanillyl-Alkohol Oxidase, die FAD kovalent über einen Histidin-Rest bindet.^[76]

In der nicht-ribosomalen Peptidbiosynthese sind einige Beispiele für die Katalyse von Modifikationsreaktionen durch externe Flavoprotein-Monooxygenasen bekannt. Auch in die Biosynthese einiger Hydroxamat-Siderophore sind diese Enzyme involviert, wobei sie z.B. für die Hydroxylierung der Seitenketten-Aminogruppe von L-Ornithin (z.B. PvdA aus *Pseudomonas aeruginosa*^[72]) oder L-Lysin (IucD aus *Escherichia coli*^[77]) verantwortlich sein können (Abb. 1.5 (A) und (B)). Zudem wurde die Epoxidase HcmO biochemisch charakterisiert, die während der Biosynthese von CDA in *Streptomyces coelicolor* Acyl-Carrier-Protein (ACP)-gebundene Hexen-Säure epoxidiert (Abb. 1.5 (C)).^[78]

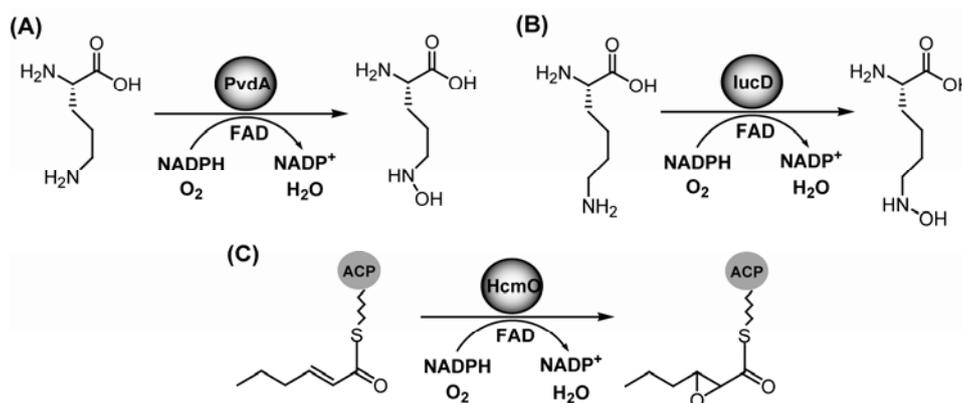


Abbildung 1.5: Beispiele von Modifikationsreaktionen die von Flavin-abhängigen Monooxygenasen katalysiert werden. (A) Ornithin-Hydroxylierung in der Biosynthese von Pyoverdin. (B) Seitenketten-Hydroxylierung von Lysin während der Biosynthese von Aerobactin. (C) Fettsäuremodifikation während der CDA-Biosynthese.

Einteilung der Flavin-abhängigen Monooxygenasen:

Die externen Flavin-abhängigen Monooxygenasen können aufgrund der Aminosäuresequenz und strukturellen Daten in sechs Unterklassen (Klasse A-F) eingeteilt werden.^[74] Hier sollen nun die beiden Unterklassen näher erläutert werden, die die meisten Vertreter haben und am eingehendsten charakterisiert sind.

Die Flavoprotein-Monooxygenasen der Klasse A werden durch ein einzelnes Gen codiert und zeigen hohe Affinität zu ihrem FAD-Kofaktor. Als Kosubstrat wird von diesen Oxygenasen entweder NADPH oder NADH verwendet und typische Substrate sind aromatische Moleküle, die eine aktivierende Hydroxyl- oder Aminogruppe besitzen. Daher sind diese Enzyme häufig in den mikrobiellen Abbau von aromatischen Komponenten involviert, in dem sie die *ortho*- oder *para*-Hydroxylierung des aromatischen Rings katalysieren.^[79] Der bekannteste Vertreter dieser Enzymklasse ist die 4-Hydroxybenzoat-3-Monooxygenase (PHBH) aus *Pseudomonas*-Spezies, die umfassend charakterisiert wurde (für weitere Beispiele siehe van Berkel *et al.*^[74]).^[80-82] Anhand der Kristallstrukturen von PHBH konnte ein GXGXXG-Motiv in einer so genannten Rossmann-Faltung ($\beta\alpha\beta$) identifiziert werden, das den ADP Rest des Kofaktors FAD im aktiven Zentrum koordiniert.^[83,84] Interessanterweise konnte keine zweite Domäne identifiziert werden, die für die NADPH-Bindung verantwortlich ist. Dies steht im Einklang mit der Vermutung, dass NADPH nur einen kurzlebigen Komplex mit dem Enzym bildet, um FAD zu reduzieren. Das gebildete NADP⁺ wird im Anschluß sehr schnell freigesetzt.^[74]

Die Flavoprotein-Monooxygenasen der Klasse B werden ebenfalls durch ein Gen codiert und zeigen auch eine hohe Affinität zu FAD. Alle Enzyme dieser Klasse benötigen NADPH als Kosubstrat und werden als multifunktionale Flavin-abhängige Monooxygenasen bezeichnet, da von dieser Enzymklasse Kohlenstoff- und Heteroatome hydroxyliert werden können. Daher wird die Klasse B noch einmal in drei Unterfamilien aufgeteilt: Flavin-enthaltende Monooxygenasen (FMOs), mikrobielle *N*-hydroxylierende Monooxygenasen (NMOs) und Bayer-Villiger Monooxygenasen (BVMOs).^[74] Die erste Kristallstruktur eines Vertreters dieser Monooxygenasen-Klasse konnte 2004 für die Phenylaceton-Monooxygenase, eine Bayer-Villiger Monooxygenase aus *Thermobifida fusca*, gelöst werden.^[85] Die Struktur besteht unter anderem aus zwei Rossmann-Faltungs-Domänen, die mit den Kernmotiven GXGXXG zum einen den FAD-Kofaktor und zum anderen das NADPH-Kosubstrat binden. Zusätzlich zu den bereits diskutierten Flavoprotein-Monooxygenasen, die nur aus einer Polypeptidkette bestehen, wurden auch Flavin-abhängige Monooxygenasen identifiziert, die aus mehreren Domänen bestehen. Eine Übersicht über die Monooxygenasen der Klassen C-F haben van Berkel *et al.* zusammengestellt.^[74]

Mechanismen:

Mit Hilfe umfangreicher spektroskopischer Untersuchungen konnte der Katalysemechanismus einer Klasse A-Flavoprotein-Monooxygenase (PHBH) und einer Klasse B-Monooxygenase (FMO) aufgeklärt werden. In beiden Enzymen entsteht durch die Addition von molekularem Sauerstoff an den reduzierten Flavin-Kofaktor ein Hydroperoxy-Flavin-Intermediat, das das jeweilige Substrat hydroxyliert und eine Hydroxy-Flavin-Spezies bildet.^[86-88] Trotz der ähnlichen chemischen Reaktionsmechanismen zeigen die Enzyme PHBH und FMO unterschiedliches Verhalten in Bezug auf ihre kinetischen Mechanismen. Die Monooxygenase PHBH benötigt das Vorhandensein von Substrat, um die Reduktion von Flavin durch NADPH zu katalysieren (Abb. 1.6 (A)).^[89,90] Im Gegensatz zu dieser Beobachtung stehen die Ergebnisse, die für den Mechanismus von FMO erhalten wurden. Der Flavin-Kofaktor kann in FMO durch NADPH jederzeit reduziert werden, auch wenn kein Substrat vorhanden ist (Abb. 1.6 (B)).^[91-93]

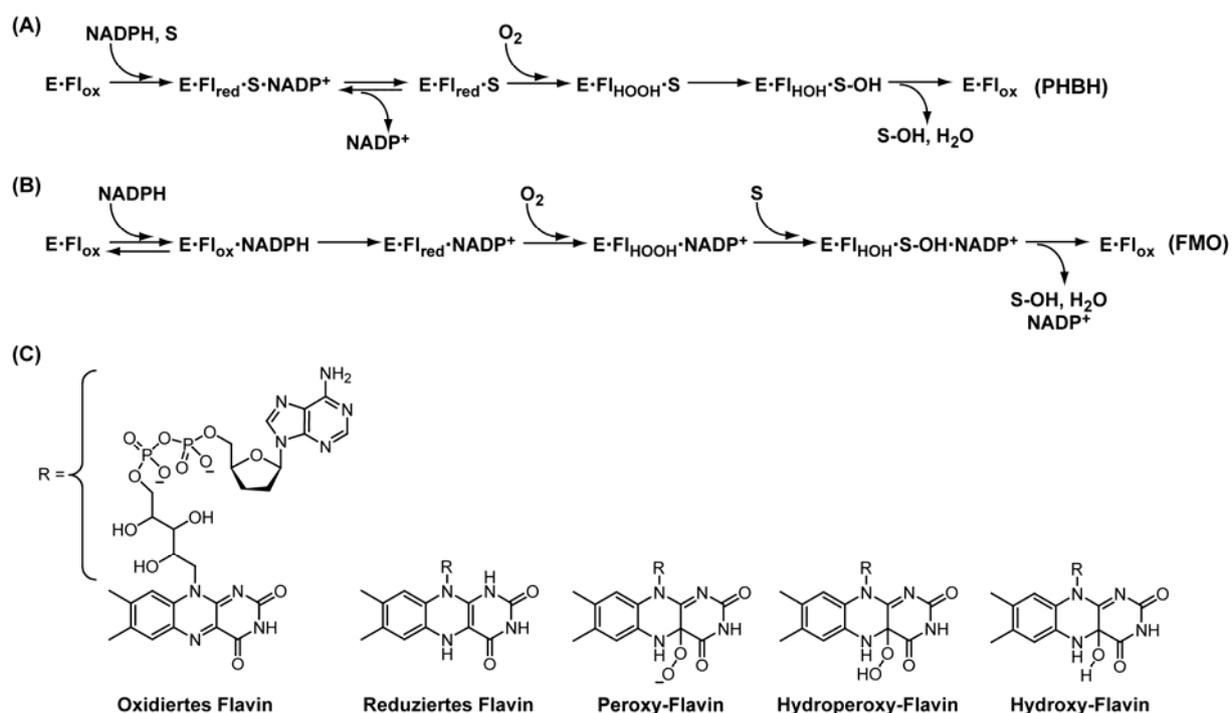


Abbildung 1.6: (A) Reaktionsschema für die Hydroxylierung eines Substrats durch die 4-Hydroxybenzoat-3-Monooxygenase (PHBH) aus *Pseudomonas fluorescens*. (B) Reaktionsschema für eine Flavin-enhaltende Monooxygenase (FMO) aus Schweineleber-Mikrosomen. Das Substrat wird jeweils als S bezeichnet und das Produkt der Reaktionen ist mit S-OH gekennzeichnet. Die Flavin-Zustände während des katalytischen Zyklus sind mit Fl_{ox} (oxidiertes Flavin), Fl_{red} (reduziertes Flavin), Fl_{HOOH} (Hydroperoxy-Flavin) und Fl_{HOH} (Hydroxy-Flavin) bezeichnet. (C) Oxidationszustände des Flavin-Kofaktors (nach Meneely *et al.*).^[94]

Ein detaillierter Mechanismus für die N^δ-Hydroxylierung von L-Ornithin, die von der Monooxygenase CchB aus *Streptomyces coelicolor* katalysiert wird, findet sich im Diskussionsteil dieser Arbeit (Abb. 5.2, Abschnitt 5.1.1).

1.2.2 Nicht-Häm Fe(II)-abhängige Oxygenasen

Katalysierte Reaktionen:

Ebenso wie die Flavin-abhängigen Monooxygenasen katalysieren die zahlreichen Vertreter der Familie der nicht-Häm Fe(II)-abhängigen Oxygenasen eine große Anzahl verschiedener Oxidationsreaktionen. Neben Rieske-Oxygenasen und ringspaltenden Oxygenasen bilden die α -Ketoglutarat-abhängigen Enzyme die größte Untergruppe der nicht-Häm Eisen(II)-Oxygenasen. Diese katalysieren Modifikationsreaktionen von Aminosäure-Seitenketten, die Reparatur von alkylierter DNA/RNA oder sind in die Biosynthese von Antibiotika oder pflanzlichen Naturstoffen involviert.^[95-97] Die folgende Abbildung zeigt einige Reaktionen, die von nicht-Häm Fe(II)-Oxygenasen katalysiert werden (Abb. 1.7).

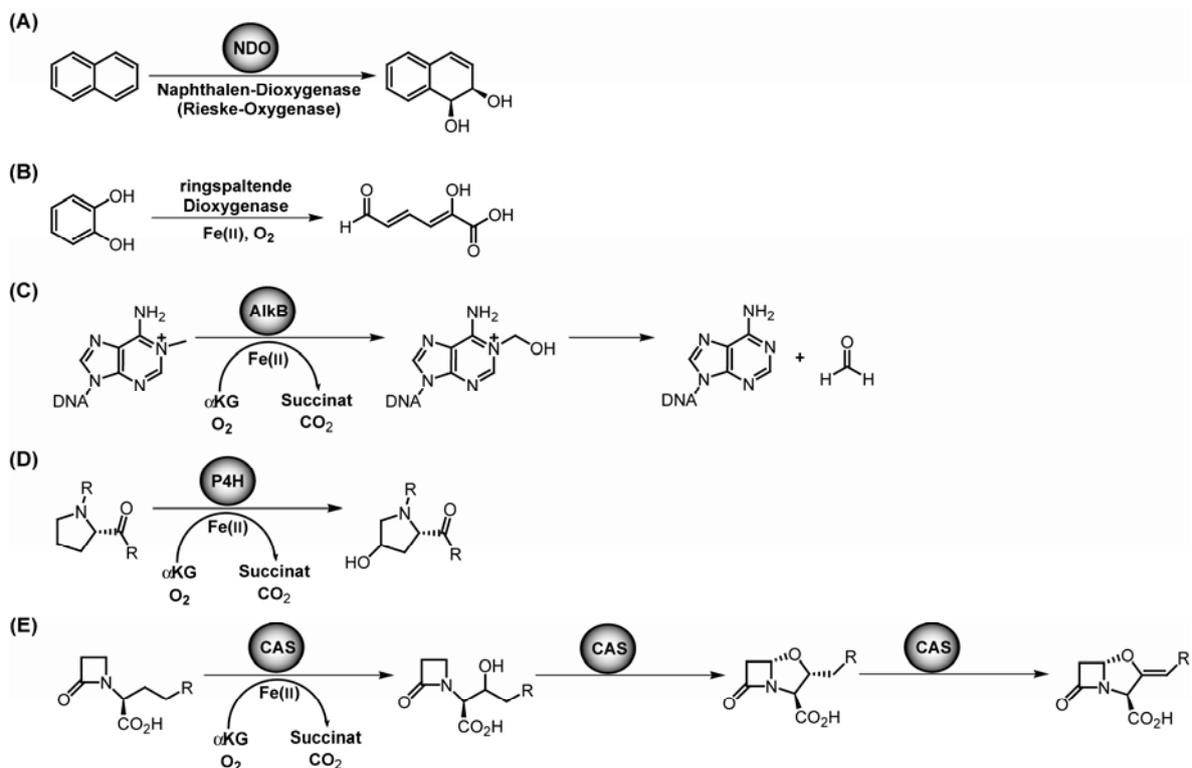


Abbildung 1.7: Überblick über Reaktionen, die von nicht-Häm Fe(II)-Oxygenasen katalysiert werden. (A) Eine Rieske nicht-Häm Eisen-Dioxygenase katalysiert die *cis*-Dihydroxylierung von Naphthalen. (B) Reaktion einer ringspaltenden Dioxygenase. (C) DNA-Dealkylierung durch AlkB. (D) Hydroxylierung von Prolin durch die Prolyl-4-Hydroxylase. (E) Die Clavaminat Synthase (CAS) katalysiert drei Schritte der Clavulansäure-Biosynthese.

Ein häufiger erster Schritt beim biologischen Abbau aromatischer Verbindungen ist ihre Umwandlung in *cis*-dihydroxylierte Verbindungen. Diese Reaktion wird oftmals von nicht-Häm Eisen-abhängigen Rieske-Dioxygenasen katalysiert, die dabei eine hohe Regio- und Stereospezifität aufweisen (Abb. 1.7 (A)).^[98] Auch die durch nicht-Häm Fe(II)-Oxygenasen katalysierte oxidative Ringspaltung ist ein Schlüsselschritt des biologischen Abbaus von aromatischen Verbindungen in Bakterien (Abb. 1.7 (B)).^[99]

Bei Reaktionen von nicht-Häm Eisen(II)- und α KG-abhängigen Enzymen wird die oxidative Umsetzung des Substrats mit der Decarboxylierung des Kosubstrats α -Ketoglutarat zu Succinat und Kohlendioxid gekoppelt.^[97,98] Aus medizinischer Sicht stellt die Beschädigung von DNA und RNA durch Alkylierung ein gravierendes Problem dar, welches Replikation, Transkription und damit Translation negativ beeinflusst. Es wurden allerdings mehrere Fe(II)- und α KG-abhängige Oxygenasen charakterisiert die alkylierte DNA- und RNA-Basen reparieren. AlkB aus *Escherichia coli* hydroxyliert z.B. die Alkylgruppe wobei die unmodifizierte Base durch spontane Deformylierung zurück gebildet wird (Abb. 1.7 (C)).^[100] Eine weitere wichtige Reaktion bezüglich der Gesundheit höherer Organismen stellt die Hydroxylierung von Prolin-Resten an der C4-Position dar (Abb. 1.7 (D)). Diese Reaktion wird für die Verknüpfung von Helices in Kollagen benötigt, wobei die Prolyl-4-Hydroxylase (P4H) nicht freies Prolin sondern Prolin-Reste in einer Peptidkette hydroxyliert.^[101,102] Die Clavaminat Synthase (CAS) katalysiert drei separate Oxidationsreaktionen in der Biosynthese von Clavulansäure (Abb. 1.7 (E)). Eine Hydroxylierungsreaktion produziert Proclavaminsäure, die durch Zyklisierung in Dihydroclavaminsäure umgewandelt wird. Im letzten CAS-katalysierten Schritt wird Clavaminsäure gebildet.^[103]

Auch in der nicht-ribosomalen Peptidbiosynthese sind Modifikationsenzyme involviert, die nicht-Häm Fe(II)- und α KG-abhängig Hydroxylierungsreaktionen katalysieren. Dabei findet man Monooxygenasen die freie Aminosäuren an der C_{β} -Position hydroxylieren und Enzyme die nur Carrier-Protein-gebundene Substrate akzeptieren. Die Monooxygenase AsnO katalysiert die regio- und stereospezifische Hydroxylierung von L-Asparagin in der Biosynthese von CDA und die C_{β} -Hydroxylierung der nicht-proteinogenen Aminosäure L-Enduracididin wird durch MppO aus *Streptomyces hygroscopicus* katalysiert (Abb. 1.8 (A)).^[104,105] Im Gegensatz dazu wird durch die Fe(II)-/ α KG-abhängigen Enzyme KtzO und KtzP, die in die Biosynthese der Kutzneride involviert sind, nur PCP-gebundenes Glutamat an der C_{β} -Position hydroxyliert. Dabei zeigen auch diese Enzyme eine hohe Stereospezifität. KtzO katalysiert die Bildung des *threo* Diastereomers von β -Hydroxy-Glutamat und KtzP generiert das *erythro* Diastereomer.^[62] Auch die Monooxygenase SyrP aus *Pseudomonas syringae* weist bei der Hydroxylierung von PCP-gebundenem Aspartat eine hohe Substrat- und Stereospezifität auf (Abb. 1.8 (B)).^[71]

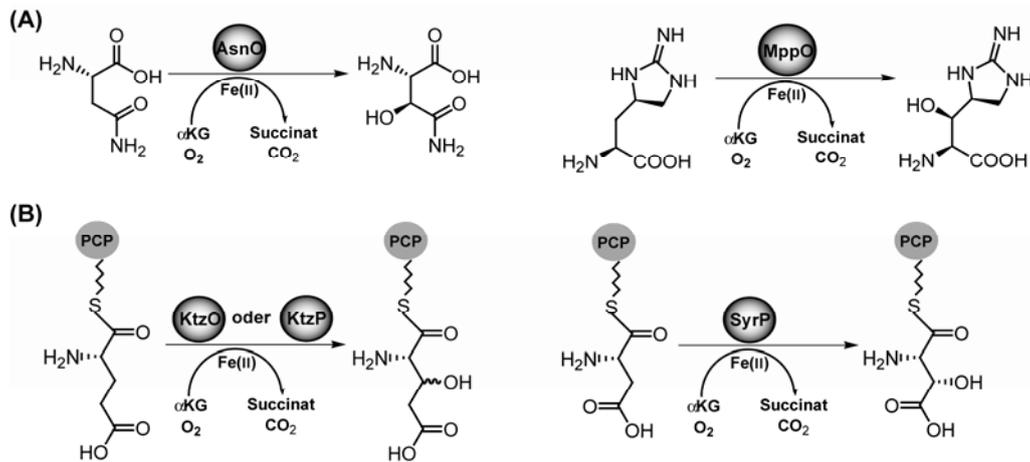


Abbildung 1.8: Beispiele von Modifikationsreaktionen während der nicht-ribosomalen Peptidsynthese die von nicht-Häm Fe(II)-/αKG-abhängigen Monooxygenasen katalysiert werden. (A) C_β-Hydroxylierung von L-Asparagin und L-Enduracididin durch AsnO und MppO. (B) Hydroxylierungsreaktionen an PCP-gebundenen Aminosäuren durch KtzO oder KtzP und SyrP.

Die hier gezeigten Beispiele stellen Reaktionen dar die in der Natur eine große Bedeutung haben. Allerdings sind viele dieser regio- und stereospezifischen Enzym-katalysierten Reaktionen auch deshalb von großem Interesse, da Modifikationsreaktionen an nicht aktivierten Kohlenstoffatomen in der organischen Chemie komplexe Synthesewege erfordern.^[96]

Strukturelle Informationen:

In den letzten Jahren konnten zahlreiche Kristallstrukturen von verschiedenen nicht-Häm Eisen(II)- und αKG-abhängigen Oxygenasen gelöst werden.^[96] Anhand dieser großen Vielfalt an strukturellen Daten konnte ein in dieser Enzymklasse konserviertes Faltungsmotiv identifiziert werden. Die so genannte „jelly roll“-Faltung wird durch zwei antiparallele β-Faltblätter hervorgerufen, die aus fünf bzw. drei β-Strängen gebildet werden.^[96] Auch die Fe(II)-/αKG-abhängige Oxygenase TauD, die die Hydroxylierung von 2-Aminoethan-1-sulfonsäure (Taurin) katalysiert, weist dieses Strukturmotiv auf (Abb. 1.9 (A)).^[106,107] Zudem wurde in den nicht-Häm Eisen(II)-abhängigen Enzymen das konservierte Motiv 2-His-1-Carboxylat gefunden, das für die Koordination von Eisen im aktiven Zentrum und damit auch für die Aktivierung von molekularem Sauerstoff verantwortlich ist.^[108] So weist der TauD•Taurin•αKG•Fe(II)-Komplex eine Koordination von Eisen im aktiven Zentrum durch die Reste H99, D101 und H255 auf. Zusätzlich wird das Eisen von dem Kosubstrat αKG zweifach koordiniert (Abb. 1.9 (B)).^[107] Dieses Kosubstrat wird zusätzlich durch Salzbrücken mit der Seitenkette des Restes R266 stabilisiert. Im Gegensatz dazu wird das Substrat in TauD nicht direkt an das Eisenzentrum gebunden, jedoch wird Taurin so im aktiven Zentrum

koordiniert, dass das zu hydroxylierende Kohlenstoffatom in der Nähe der Sauerstoffbindungsstelle des Eisens positioniert wird.

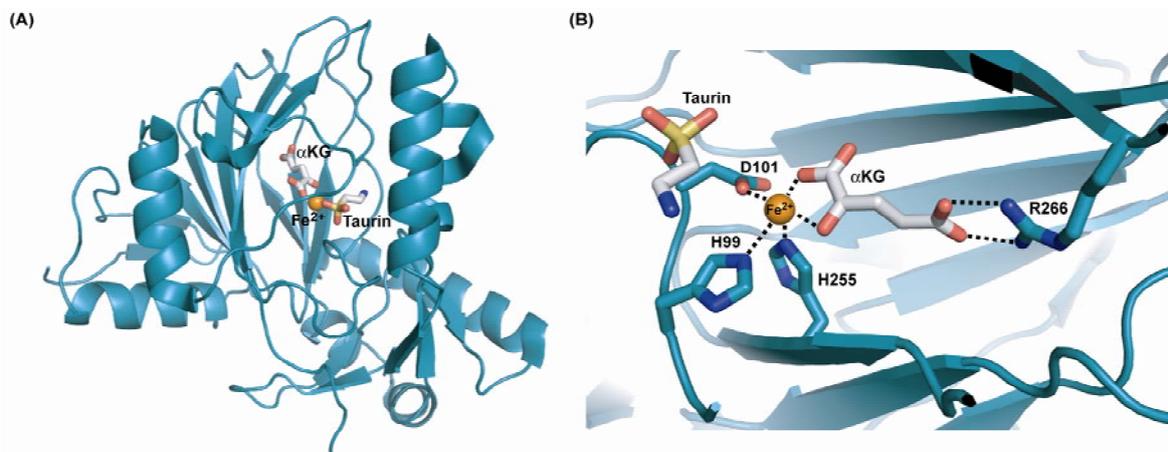


Abbildung 1.9: Kristallstruktur der Fe(II)-/αKG-abhängigen Oxygenase TauD (PDB Code: 1OS7). (A) Gesamtstruktur eines Monomers von TauD. (B) Aktives Zentrum des Substratkomplexes von TauD. Gebundenes Eisen ist in orange gezeigt und das Substrat Taurin und das Kosubstrat αKG sind grau dargestellt.

Mechanismus:

Im Gegensatz zu den in Abschnitt 1.2.1 beschriebenen Flavin-abhängigen Monooxygenasen, die Oxygenierungsreaktionen an elektronenreichen Substraten katalysieren, wird für Oxygenierungsreaktionen an aliphatischen Kohlenstoff-Atomen, die sich nicht in der Nähe von aktivierenden Gruppen befinden, ein alternativer Mechanismus benötigt.^[109] Mit Hilfe der vorhandenen strukturellen Daten und spektroskopischen Studien der TauD-^[106] und Clavaminat Synthase-Mechanismen^[110] konnte ein genereller Mechanismus für αKG-abhängige Oxygenasen postuliert werden (Abb. 1.10). Dabei wird eine schrittweise Bindung von αKG, Substrat und abschließend molekularem Sauerstoff postuliert. Das Eisen(II)-Ion wird zunächst oktaedrisch von drei Wassermolekülen und dem 2-His-1-Carboxylat-Motiv koordiniert (siehe Abb. 1.10, Zustand 1).^[111] Anschließend bindet das Kosubstrat α-Ketoglutarat zweizählig an das Metallzentrum, wodurch zwei Wassermoleküle verdrängt werden (Zustand 2).^[106] Im nächsten Schritt wird das native Substrat in der Nähe des Eisenions koordiniert und der letzte Wasserligand von Eisen freigesetzt. Damit ändert sich normalerweise die Koordination von Fe(II) von oktaedrisch zu quadratisch-pyramidal (Zustand 3).^[96] Auf diese Weise wird das Eisen aktiviert, um mit molekularem Sauerstoff zu reagieren.^[102] Daher wird in Anwesenheit des Substrats ein Fe(III)-Superoxid-Intermediat gebildet das radikalischen, anionischen Charakter aufweist (Zustand 4).^[112] Anschließend greift diese Spezies nukleophil das Carbonyl-Kohlenstoffatom von αKG an und bildet ein zyklisches Peroxo-Intermediat aus (Zustand 5). Durch die folgende Decarboxylierung und Spaltung der O-O-Bindung entstehen die Koprodukte Kohlendioxid, Succinat und ein

Fe(IV)=O-Intermediat (Zustand 6). Diese Eisen-Spezies ist für die folgende Oxidation des Substrats verantwortlich. Mit spektroskopischen Methoden konnte zudem gezeigt werden, dass ein Fe(IV)-Intermediat in Reaktionen von nicht-Häm Eisen-Enzymen involviert ist.^[106,113,114] In der Subfamilie der Hydroxylasen abstrahiert die Fe(IV)-Spezies ein Wasserstoffatom von der zu hydroxylierenden Position des Substrats (Zustand 7) und eine folgende radikalische Rekombinationsreaktion führt zur Bildung des hydroxylierten Produkts (Zustand 8).^[102,113]

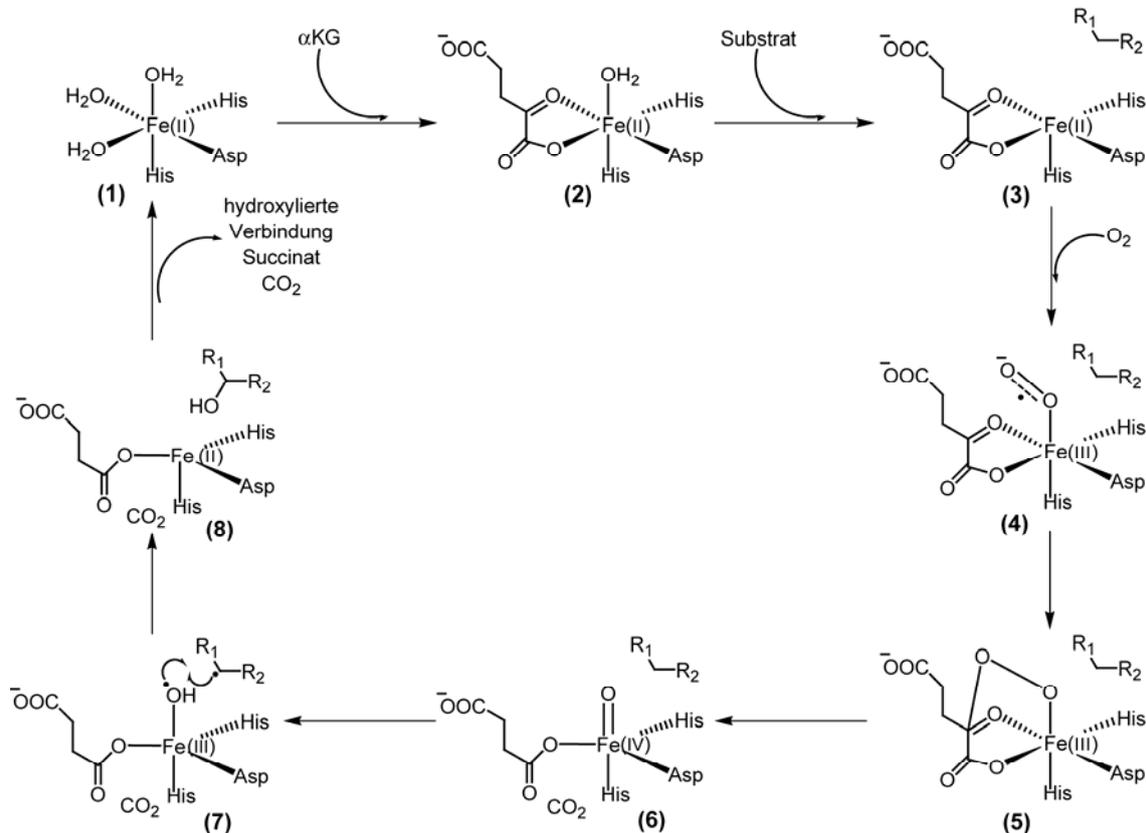


Abbildung 1.10: Allgemeiner Mechanismus der Hydroxylgruppenübertragung durch Fe(II)- und α KG-abhängige Monooxygenasen (nach Price *et al.*).^[106]

Für die in dieser Arbeit untersuchte nicht-Häm Fe(II)-/ α KG-abhängige Monooxygenase VioC aus dem Viomycin-Biosyntheseweg kann der gezeigte Mechanismus postuliert werden (siehe Abbildung 5.6). Eine detaillierte Betrachtung dieses Enzyms findet sich im Ergebnis- und Diskussionsteil dieser Arbeit (Abschnitte 4.2 und 5.2).

1.2.3 S-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferasen

Katalysierte Reaktionen:

S-Adenosylmethionin (SAM) ist nach Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) das am häufigsten verwendete Enzymsubstrat.^[115] SAM wird von Methyltransferasen als Kosubstrat verwendet, wobei allerdings auch Methyl-Tetrahydrofolat als Methylgruppendonor dienen kann.^[116] Allgemein betrachtet sind SAM-abhängige Methyltransferasen an vielen biologischen Prozessen wie z.B. Metabolismus, Katabolismus, Signaltransduktion, Proteinreparatur oder Gensuppression beteiligt. Dabei akzeptieren Methyltransferasen kleine Moleküle, Proteine oder sogar DNA als Substrate, wobei Stickstoff-, Schwefel-, Sauerstoff- und Kohlenstoffatome methyliert werden können.^[117] In der folgenden Abbildung sind einige Beispiele für Reaktionen gezeigt, die von SAM-abhängigen Methyltransferasen katalysiert werden. Dabei wird das Koprodukt S-Adosylhomocystein (AdoHCy) gebildet.

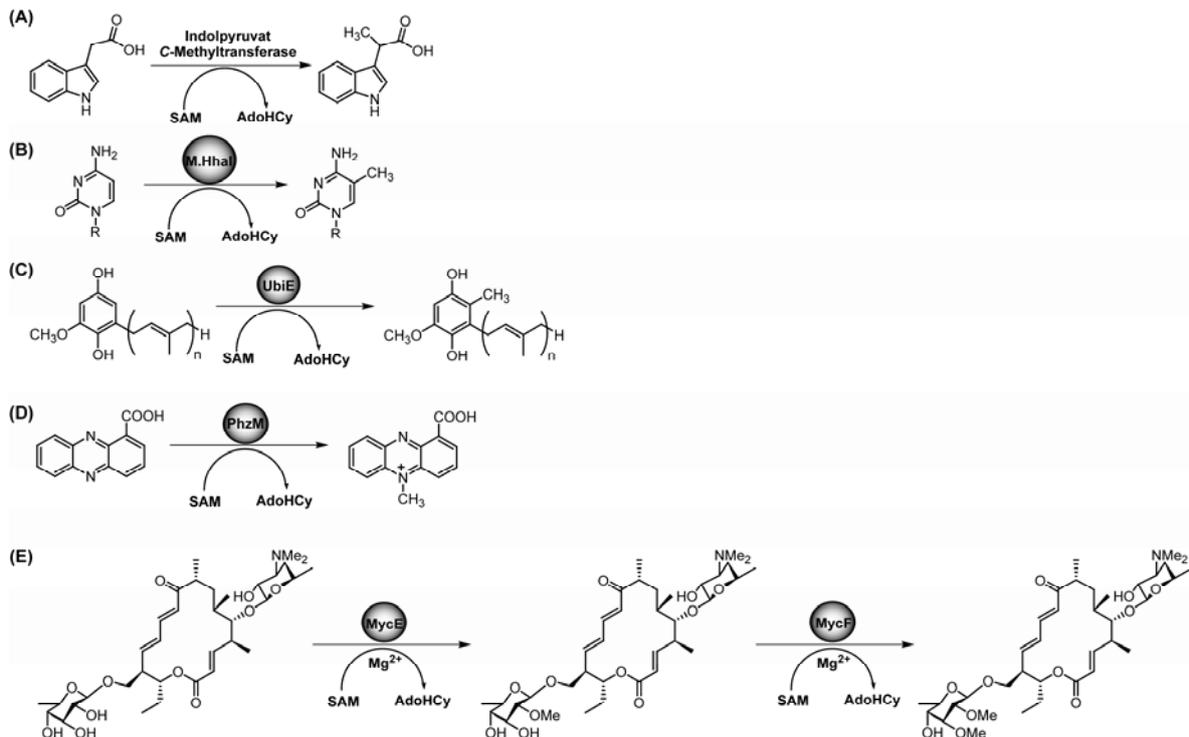


Abbildung 1.11: Überblick über Reaktionen die von SAM-abhängigen Methyltransferasen katalysiert werden. (A) C-Methylierung von Indolpyruvat. (B) DNA Cytosin-C5-Methylierung durch die M.HhaI-Methyltransferase. (C) C-Methylierung durch UbiE während der Ubiquinon-Biosynthese. (D) N-Methylierung durch PhzM während der Pyocyanin-Biosynthese. (E) MycE und MycF katalysieren O-Methylierungen von Mycinamicin-Derivaten.

Die Biosynthese des von *Streptomyces griseus* produzierten Antibiotikums Indolmycin erfordert die C-Methylierung von Indolpyruvat durch eine SAM-abhängige Methyltransferase (Abb. 1.11 (A)).^[118] Ein interessantes Beispiel für eine C-Methylierung außerhalb des Sekundärmetabolismus ist die Methylierung der DNA-Base Cytosin. Diese Reaktion wird von der DNA C5-Cytosin Methyltransferase M.HhaI SAM-abhängig katalysiert

(Abb. 1.11 (B)).^[119] Das von *Escherichia coli* produzierte Ubiquinon (Coenzym Q) wird ebenfalls durch eine C-Methylierung während der Biosynthese modifiziert. Es konnte die SAM-abhängige Methyltransferase UbiE identifiziert werden, die diese Reaktion katalysiert (Abb. 1.11 (C)).^[120] Neben den bereits angesprochenen C-Methylierungen katalysieren SAM-abhängige Methyltransferasen auch die Methylierung von Stickstoffatomen. Während der Biosynthese von Pyocyanin, einem von *Pseudomonas aeruginosa* produzierten Pigment, wird Phenazin-1-carboxylat (PCA) durch die Methyltransferase PhzM an der N⁵-Position methyliert. Durch diese Reaktion wird 5-Methyl-PCA gebildet (Abb. 1.11 (D)).^[121] Abschließend sind zwei O-Methylierungsreaktionen gezeigt, die während der Biosynthese der Makrolid-Antibiotika Mycinamicine stattfinden (Abb. 1.11 (E)). Die von MycE und MycF katalysierten O-Methylierungen der Zucker-Hydroxy-Gruppen schützen zum einen die reaktive Hydroxy-Gruppe vor unerwünschten Nebenreaktionen und erhöhen zum anderen die Löslichkeit. Zudem konnte gezeigt werden, dass die O-Methylierungen die Bioaktivität und die pharmakokinetischen Eigenschaften des Naturstoffes beeinflussen.^[122,123] Neben den bereits erwähnten N^α-Methylierungsdomänen, die in nicht-ribosomale Peptidsynthetasen integriert sind und somit *in cis* arbeiten, konnten bisher auch einige Modifikationsenzyme identifiziert werden, die *in trans* SAM-abhängig Methylierungsreaktionen an Bausteinen der nicht-ribosomalen Peptidsynthese katalysieren.

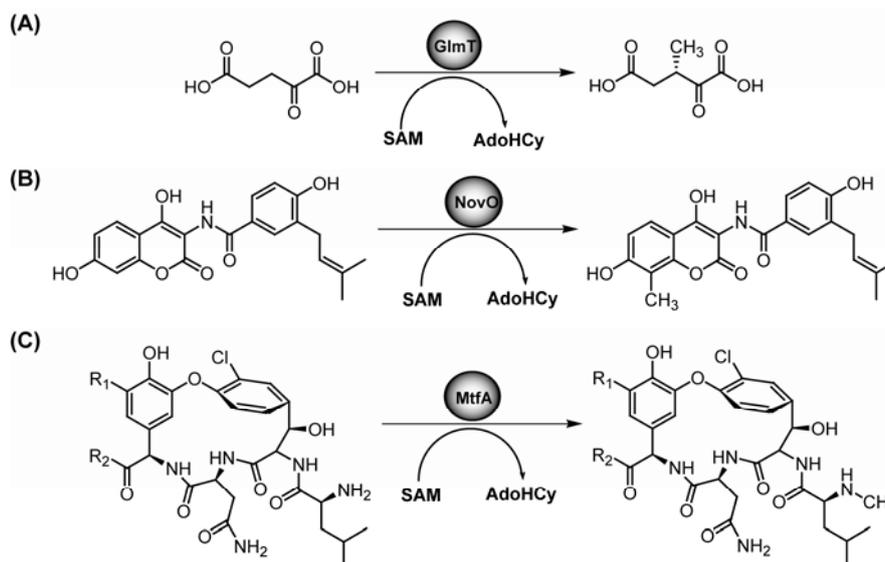


Abbildung 1.12: Beispiele für Modifikationsreaktionen während der nicht-ribosomalen Peptidsynthese die von SAM-abhängigen Methyltransferasen katalysiert werden. (A) C β -Methylierung von α -Ketoglutarat während der Biosynthese des (2*S*,3*R*)- β -Methyl-Glutamat-Bausteins von CDA. (B) SAM-abhängige C-Methylierungsreaktion der Novobiocinsäure katalysiert durch NovO. (C) N-Methylierung eines Chloroeremomycin-Zwischenprodukts durch MtfA.

Die Methyltransferase GlmT akzeptiert ausschließlich freies α -Ketoglutarat als Substrat und katalysiert die regio- und stereospezifische Übertragung einer Methylgruppe von SAM auf

das C β -Atom des Substrats (Abb. 1.12 (A)). Der Methylierung schließt sich eine Transaminierungsreaktion an, die den für die CDA-Biosynthese benötigten Baustein (2*S*,3*R*)- β -Methyl-Glutamat generiert.^[124] Im Gegensatz zu der Methyltransferase GlnT, die eine frei vorliegende Verbindung (α KG) methyliert, stellt Novobiocinsäure das native Substrat von NovO dar (Abb. 1.12 (B)), die zuvor durch mehrere Biosyntheseschritte aus Tyrosin hergestellt wurde. Diese SAM-abhängige C-Methylierung findet während der Biosynthese des Antibiotikums Novobiocin statt.^[125] Die SAM-abhängige Methyltransferase MtfA des Chloroeremomycin-Biosynthesystems katalysiert den Methylgruppen-Transfer auf die N $^{\alpha}$ -Aminogruppe eines Leucin-Rests des Chloroeremomycin-Zwischenprodukts in *Amycolatopsis orientalis* (Abb. 1.12 (C)).^[126] Diese Reaktion ist ein Beispiel für eine N $^{\alpha}$ -Methylierung während der nicht-ribosomalen Peptidsynthese, die nicht von Methylierungs-Domänen sondern von einem SAM-abhängigen Enzym *in trans* katalysiert wird.^[11]

Strukturelle und mechanistische Informationen:

Zahlreiche Kristallstrukturen von SAM-abhängigen Methyltransferasen zeigen, dass diese Enzymklasse eine große strukturelle Vielfalt aufweist.^[116] Die Substratbindungsstellen und die Konformationen von gebundenem SAM oder AdoHcy variieren je nach katalysierter Reaktion. Trotzdem wurden die Methyltransferasen in fünf verschiedene strukturelle Klassen aufgeteilt (Klasse I-V).^[116] Die Sequenzidentitäten der Methyltransferasen untereinander sind sehr gering, obwohl die Enzyme der gleichen strukturellen Klasse angehören.^[116] Allerdings weist der größte Teil der SAM-abhängigen Methyltransferasen eine sehr ähnliche Topologie der Gesamtstruktur auf.^[127] Die Methyltransferasen bilden ein siebensträngiges β -Faltblatt mit einer charakteristischen β -Haarschleife am C-terminalen Ende aus. Dieses Kernmotiv wird von α -Helices flankiert, wodurch ein doppelt gewundenes offenes $\alpha\beta\alpha$ -Sandwich entsteht (Abb. 1.13).^[116] Die erste Kristallstruktur einer SAM-abhängigen Methyltransferase wurde 1993 für die DNA C5-Cytosin Methyltransferase M.HhaI gelöst und zeigt die typische Sandwichstruktur aus α -Helices und β -Strängen, die für die Methyltransferasen der Klasse I gefunden wurde.^[128]

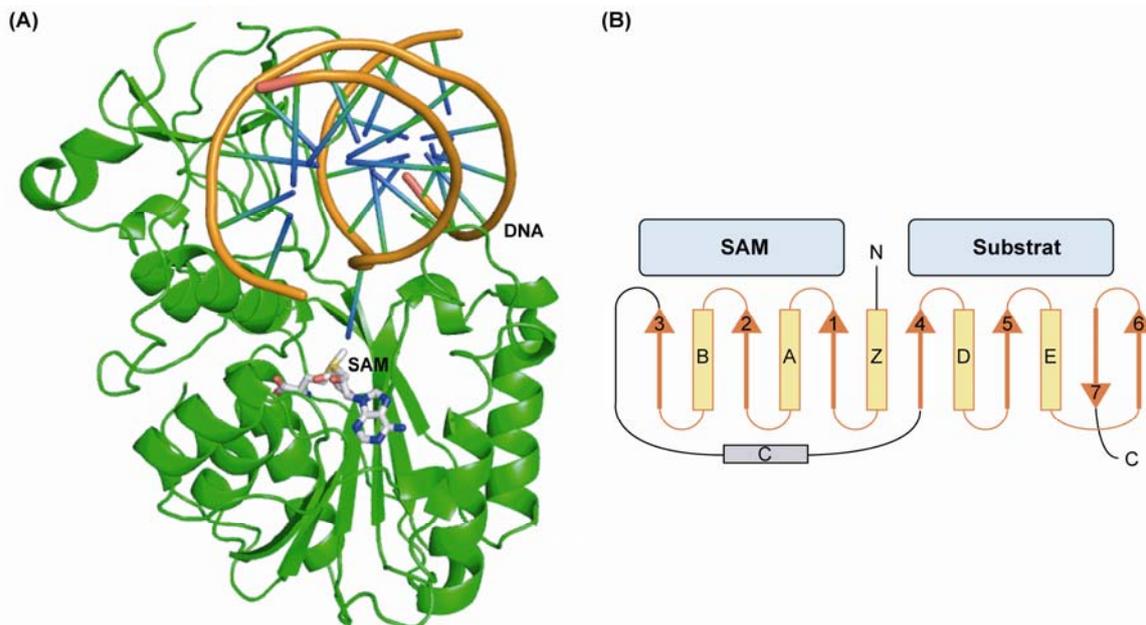


Abbildung 1.13: (A) Gesamtstruktur der Methyltransferase M.HhaI (PDB Code: 6MHT) mit SAM (grau) und gebundener DNA (orange). (B) Schematische Darstellung der Topologie einer Klasse I Methyltransferase (aus Martin *et al.*).^[127] α -Helices sind als Zylinder (A, B, D, E und Z) und β -Stränge als Pfeile (1-7) dargestellt. Die nicht streng konservierte α -Helix C ist grau dargestellt.

Der erste β -Strang endet zumeist mit einem GXGXG-Motiv, das charakteristisch für Nukleotidbindungsstellen und somit in die Koordination von SAM involviert ist.^[127,129] Des Weiteren findet sich am C-terminalen Ende des β -Stranges 2 ein konservierter azider Rest, der Wasserstoffbrückenbindungen zu den Hydroxylgruppen der SAM-Ribose ausbildet.^[127] Die wenigen bekannten Methyltransferasen der Klassen II-V werden in dieser Arbeit nicht näher erläutert. Eine Übersicht wurde aber von Schubert *et al.* erstellt.^[116]

Bezüglich des Mechanismus von SAM-abhängigen Methyltransferasen konnte gezeigt werden, dass die meisten Reaktionen durch einen direkten Transfer der aktivierten Methylgruppe nach einem S_N2 -Mechanismus ablaufen.^[116,130] Daher ist die Abstraktion eines Protons von dem zu methylierenden Atom notwendig. Es wurde gezeigt, dass Methyltransferasen verschiedene Reste als Base verwenden können, z.B. Tyrosin oder Arginin und Glutamat, je nach der Polarisierbarkeit des Zielatoms.^[131,132] Untersuchungen bezüglich der kinetischen Mechanismen zeigen, dass das SAM-Kosubstrat als erstes an das Enzym gebunden wird und anschließend die Substratbindung erfolgt. Nach der Freisetzung des methylierten Produkts wird abschließend AdoHCy freigesetzt.^[133]

Der postulierte Mechanismus einer C_β -Methylierung durch die in dieser Arbeit untersuchte SAM-abhängige Methyltransferase MppJ aus *Streptomyces hygroscopicus* ist in Abschnitt 5.3.2 gezeigt (Abb. 5.10 (A)).

Radikalische, SAM-abhängige Proteinfamilie:

Die radikalische SAM-Proteinfamilie beinhaltet über 600 Vertreter und verwendet einen Eisen-Schwefel-Cluster, um durch reduktive Spaltung des *S*-Adenosyl-Methionins ein radikalisches Intermediat zu generieren.^[134] Dabei wird der Eisen-Schwefel-Cluster durch Cystein-Reste ausgebildet, die ein konserviertes CXXXCXXC-Motiv bilden. Durch radikalische, SAM-abhängige Proteine werden z.B. Isomerisierungen, Schwefeleinlagerungen, anaerobische Oxidationen oder Methylierungen katalysiert.^[134] An der Biosynthese des Antibiotikums Clorobiocin ist z.B. eine radikalische Methyltransferase (CloN6) beteiligt, die die Methylierung eines nicht nukleophilen Kohlenstoffatoms katalysiert.^[135]

1.2.4 Weitere Modifikations-Enzymklassen

In diesem Abschnitt werden einige weitere Klassen von Modifikationsenzymen kurz vorgestellt. Dabei wird besonders auf die Klasse der Halogenasen eingegangen, da einige Unterfamilien der Halogenasen ähnliche katalytische und strukturelle Eigenschaften aufweisen wie die in Abschnitt 1.2.1 und 1.2.2 beschriebenen Oxygenasen. Außerdem wird die Enzymfamilie der Häm-Eisen-abhängigen Oxygenasen kurz vorgestellt. Eine Übersicht über die von den eben genannten Enzymen katalysierten Modifikationsreaktionen gibt Abbildung 1.14.

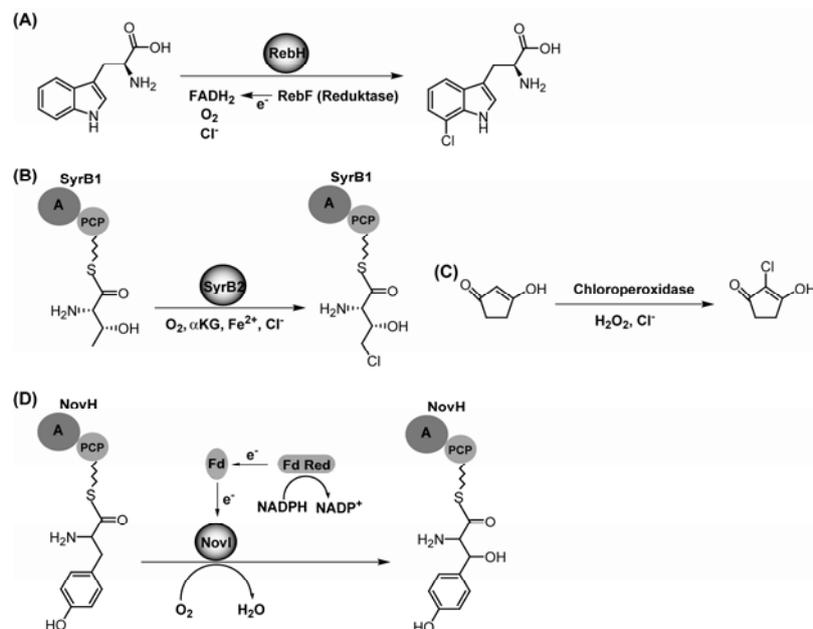


Abbildung 1.14: Übersicht über weitere Modifikationsreaktionen an Sekundärmetabolit-Bausteinen. (A) Chlorierung von Tryptophan durch die Flavin-abhängige Halogenase RebH. (B) SyrB2-katalysierte Chlorierung von PCP-gebundenem Threonin während der Syringomycin-Biosynthese. (C) Chlorierungsreaktion während der Biosynthese von Caldariomycin durch eine Häm-Eisen-abhängige Haloperoxidase. (D) Tyrosin-Hydroxylierung durch ein Cytochrom-P450-Enzym während der Novobiocin-Biosynthese. Fd = Ferredoxin; Fd Red = Ferredoxin-Reduktase.

Halogenasen:

Halogenasen, die C-Funktionalisierungen katalysieren, sind zahlreich und werden in vier Enzymklassen eingeteilt. Die FADH₂- und die nicht-Häm Eisen(II)-/αKG-abhängigen Halogenasen verwenden molekularen Sauerstoff zur Oxidation des Halogenids und die Vanadium- und die Häm-Eisen-abhängigen Haloperoxidasen verwenden Wasserstoffperoxid zur Oxidation des Halogenid-Ions.^[109] Dabei werden in der Natur zumeist nur Chlorierungen, Bromierungen und Iodierungen katalysiert, da Fluorierungen aufgrund der hohen Elektronegativität des Fluoridions alternative Reaktionsmechanismen erfordern.^[109]

Mechanistisch gesehen benötigen Flavin-abhängige Halogenasen FAD und molekularen Sauerstoff für ihre Aktivität. FAD wird während der Reaktion in der reduzierten Form als FADH₂ benötigt. Dieses Intermediat wird von einem zweiten Enzym, einer NAD(P)H-abhängigen Flavin-Reduktase, zur Verfügung gestellt. Daher handelt es sich um so genannte Zwei-Komponenten FADH₂-abhängige Halogenasen.^[136] Während der Katalyse werden Hypophalit-Intermediate (HOX) gebildet, die als „X^{+c}-Äquivalente mit elektronenreichen Substraten reagieren können.^[109] Dies wurde z.B. bei der Flavin-abhängigen Halogenase RebH beobachtet, die die Flavin-Reduktase RebF für ihre Chlorierungsaktivität benötigt (Abb. 1.14 (A)). RebH katalysiert die Bildung von 7-Chlorotryptophan als Initiationsschritt der Rebeccamycin-Biosynthese.^[88,137]

Ebenso wie die Flavin-abhängigen Halogenasen bilden die Häm-Eisen- und die Vanadium-abhängigen Haloperoxidasen während der Katalyse ein HOX-Intermediat aus. Dieses ist allerdings kovalent an das Häm oder den Vanadium-Komplex gebunden und dient wiederum als „X^{+c}-Äquivalent. Das Substrat reagiert über ein stabilisiertes Carbanion und greift nukleophil das HOX-Intermediat an.^[109] Während der Biosynthese von Caldariomycin katalysiert eine Häm-abhängige Chloroperoxidase die Chlorierung an einem elektronenreichen Kohlenstoffatom (Abb. 1.14 (C)).^[138] Ebenso findet eine Bromierungsreaktion während der Synderol-Biosynthese an einem elektronenreichen Substrat statt. Diese Reaktion wird von einer Vanadium-abhängigen Bromoperoxidase katalysiert.^[139]

Die nicht-Häm Fe(II)-/αKG-abhängige Halogenase SyrB2 katalysiert die Chlorierung von PCP-gebundenem Threonin während der Syringomycin-Biosynthese (Abb. 1.14 (B)).^[70] Dabei entspricht der Mechanismus der Katalyse weitestgehend dem Mechanismus von nicht-Häm-Eisen(II)- und αKG-abhängigen Monooxygenasen (siehe Abschnitt 1.2.2). Um unreaktive aliphatische Kohlenstoffatome hydroxylieren oder halogenieren zu können, verläuft der Mechanismus über radikalische Intermediate. Anhand der Kristallstruktur von SyrB2 konnte aufgeklärt werden, dass das Eisenzentrum in der Halogenase nicht durch ein 2-His-1-

Carboxylat-Motiv sondern nur durch zwei Histidin-Reste koordiniert wird. Die Koordination durch α KG ist weiterhin gegeben und die „freie“ Position wird durch ein Chlorid-Anion besetzt.^[140] Während der Katalyse rekombiniert das am Substrat entstandene C-Radikal mit einem Chlorid-Radikal und der ursprüngliche Fe(II)-Zustand wird wieder hergestellt.^[109]

Häm Fe(II)-abhängige Oxygenasen:

Die Häm Eisen(II)-abhängigen Oxygenasen wurden in den letzten Jahrzehnten intensiv untersucht, wobei eine große Gruppe dieser Enzyme von den Cytochrom P450-Proteinen gebildet wird.^[141] Diese weisen eine hohe Komplexität, aber auch einen großen Anwendungsbereich auf. Die Häm-enthaltenden Enzyme katalysieren in der Natur z.B. C-Hydroxylierungen, Heteroatom-Oxygenierungen, Epoxidierungen oder Reduktionen. Damit sind sie in zahlreiche Biosynthesewege für z.B. Fettsäuren und Steroide oder in den Abbau von Pflanzen- und Insektenschutzmitteln involviert.^[142] Zahlreiche Mechanismen für diverse Reaktionen der Cytochrom P450-Enzyme konnten aufgeklärt werden und sind von Sono *et al.* zusammengefasst worden.^[141]

So katalysiert die Cytochrom P450 Monooxygenase NovI während der Novobiocin-Biosynthese eine C_{β} -Hydroxylierung (Abb. 1.14 (D)). Die Aminosäure Tyrosin liegt an das PCP der NovH-Synthetase gebunden vor und stellt zwei Elektronen für die Hydroxylierungsreaktion zur Verfügung. Die zusätzlich benötigten zwei Elektronen werden durch die Elektronentransfer-Proteine Ferredoxin und Ferredoxin-Reduktase freigesetzt und von NADPH für die Hydroxylierungsreaktion zur Verfügung gestellt.^[143]

1.3 Die Naturstoffe Coelichelin, Viomycin und Mannopectimycin

Während dieser Arbeit wurde die Biosynthese von verschiedenen nicht-proteinogenen Aminosäuren untersucht, die mittels nicht-ribosomaler Peptidsynthese in drei unterschiedliche Sekundärmetabolite, Coelichelin, Viomycin und Mannopectimycin, eingebaut werden. In diesem Abschnitt werden die drei nicht-ribosomalen Peptide näher vorgestellt, indem die Biosynthesewege erläutert werden und ein Einblick in die jeweiligen Stoffklassen gegeben wird. Außerdem wird die biologische Wirkungsweise der Peptide vorgestellt.

1.3.1 Das Tris-Hydroxamat-Siderophor Coelichelin

Siderophorklassen:

Da Eisen hauptsächlich in der unlöslichen Fe(III)-Form in der Natur vorliegt, aber für viele Mikroorganismen ein essentieller Nährstoff ist, werden niedermolekulare organische Eisen-Chelatoren, so genannte Siderophore, welche eine hohe Affinität zu Fe(III) aufweisen, produziert. Diese werden zunächst intrazellulär synthetisiert und dann ausgeschleust, um Fe(III) zu koordinieren. Anschließend erfolgt der Rücktransport in die Zelle mittels Membrantransportern.^[8] Siderophore können entsprechend ihrer Eisen-koordinierenden funktionalen Gruppen in drei Hauptklassen unterteilt werden: Hydroxamat-Typ, Catechol-Typ und Carboxylat-Typ (Abb. 1.15). Es sind aber Siderophore bekannt, die unterschiedliche funktionale Gruppen zur Komplexbildung von Eisen verwenden. Diese Naturstoffe werden als gemischte Siderophore bezeichnet.^[8] Ein Beispiel ist Petrobactin aus *Bacillus cereus*, das mit einer Citrat- und zwei Catechol-Gruppen Eisen bindet und das in einem NRPS-unabhängigen Biosyntheseweg assembliert wird.^[144]

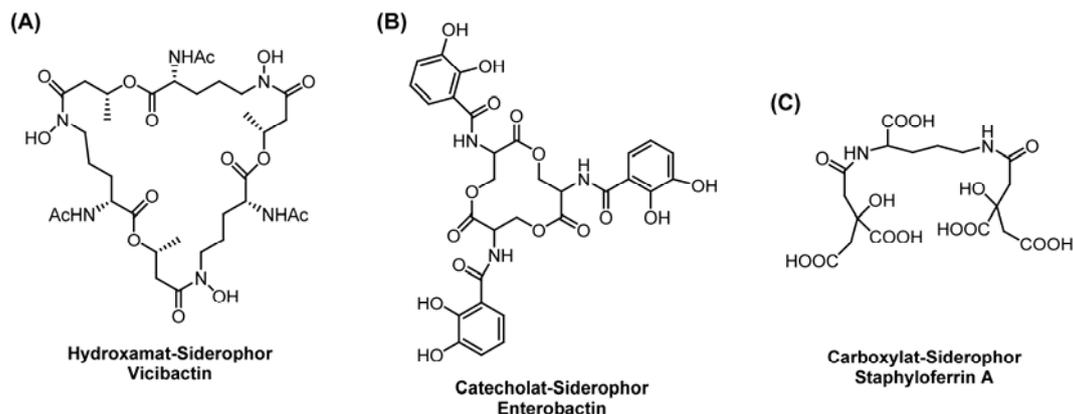


Abbildung 1.15: Siderophorklassen und repräsentative Beispiele. (A) Hydroxamat-Siderophor Vicibactin aus *Rhizobium etli*.^[145] (B) Tris-Catechol-Siderophor Enterobactin aus *Escherichia coli*.^[146] (C) Carboxylat-Siderophor Staphyloferrin A aus *Staphylococcus aureus*.^[147]

Biosynthese von Coelichelin:

Die nicht-ribosomale Peptidsynthetase CchH aus *Streptomyces coelicolor* ist für die Coelichelin-Produktion essentiell.^[61] Anhand von Sequenzvergleichen wurde die Synthetase CchH annotiert und sie weist zehn katalytische Domänen auf, welche in drei Modulen organisiert sind (Abb. 1.16).^[148] Die vermutliche Spezifität der drei vorhandenen Adenylierungsdomänen wurde anhand der so genannten Spezifitäts-Codes ermittelt.^[21,149] Demzufolge aktiviert die erste A-Domäne N^{δ} -Hydroxyformyl-Ornithin (hfOrn), die zweite ist spezifisch für L-Threonin und die dritte A-Domäne aktiviert N^{δ} -Hydroxy-Ornithin (hOrn).^[148] Die Strukturaufklärung des Siderophors mittels NMR-Studien zeigte, dass, entgegen der Erwartungen, der nicht-proteinogene Baustein hfOrn zweimal in dem Molekül vorhanden ist,

wodurch ein Tetrapeptid gebildet wird.^[61] Daher wurde postuliert, dass die hfOrn-aktivierende A-Domäne nach der Synthese des Tripeptids ein zweites hfOrn-Molekül aktiviert und auf das PCP₂ überträgt.^[61] Allerdings konnte bisher nicht gezeigt werden, ob die C-Domäne des zweiten oder des dritten Moduls die letzte Kondensationsreaktion katalysiert. Die NRPS CchH kann also zu der Klasse der nicht-linearen NRPS gezählt werden (siehe Abschnitt 1.1.3). Zudem weist Coelichelin eine Isopeptidbindung auf, die in einer verzweigten Struktur resultiert. Diese Isopeptidbindung wird durch den nukleophilen Angriff der δ -Aminogruppe von hOrn-3 auf das Carbonyl-Kohlenstoffatom von Thr-2 gebildet.^[61] Im letzten Kondensationsschritt der Coelichelin-Biosynthese greift die α -Aminogruppe von hOrn-3 das hfOrn-4-Molekül nukleophil an. Die NRPS CchH weist ein weiteres ungewöhnliches Merkmal auf. Am C-Terminus findet man ein PCP und keine TE-Domäne. Da die Strukturaufklärung von Coelichelin zeigte, dass das Peptid als Carbonsäure vorliegt, kommt nur eine hydrolytische Abspaltung von der Synthetase in Frage. Diese Aufgabe könnte das vom Biosynthese-Gencluster codierte Enzym CchJ übernehmen. Es zeigt hohe Homologien zu α,β -Hydrolasen und ist für die Biosynthese von Coelichelin essentiell.^[61,150]

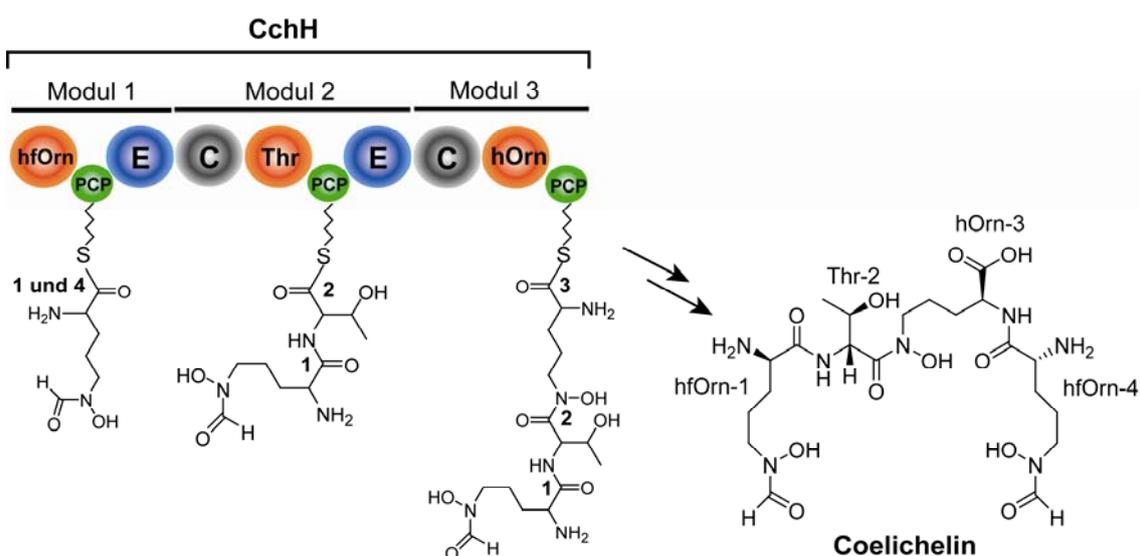


Abbildung 1.16: Postulierte Biosynthese von Coelichelin. Nach der Synthese des Tripeptids hfOrn-Thr-hOrn durch die nicht-ribosomale Peptidsynthetase wird erneut ein hfOrn-Baustein aktiviert und in das Peptid eingebaut. Anschließend wird das Tetrapeptid Coelichelin von der Synthetase abgespalten.

Um einen Einblick in die Biosynthese des neuartigen Siderophors Coelichelin zu gewinnen, wurden die Modifikationsreaktionen an den Ornithin-Seitenketten in dieser Arbeit untersucht. Die Ergebnisse dieser Charakterisierungen sind in Abschnitt 4.1 zusammengefasst und werden in Abschnitt 5.1 diskutiert.

Biologische Funktion von Coelichelin:

NMR-Analysen eines Gallium-Coelichelin-Komplexes ließen vermuten, dass der Naturstoff in der Lage ist, Eisen zu komplexieren. Diese Annahme konnte mittels ESI-MS Analysen und spektroskopischen Methoden bestätigt werden. Coelichelin bildet einen 1:1-Komplex mit einem Fe(III)-Ion aus.^[61,151] Bisher konnte für einige Tris-Hydroxamat-Gruppen enthaltende Naturstoffe gezeigt werden, dass sie eine wichtige Rolle bei der Eisenaufnahme von Mikroorganismen einnehmen.^[8] Sequenzanalysen der Proteine CchC, CchD, CchE und CchF, die auch Teil des Biosynthese-Operons von Coelichelin sind, zeigten, dass diese Proteine sequentielle Homologien zu Lipoproteinrezeptoren, Permeasen und ATPase Komponenten von bekannten Siderophor-Transport-Systemen aufweisen.^[8,150] Aufgrund der hier beschriebenen Beobachtungen kann angenommen werden, dass Coelichelin in den Prozess der Eisenaufnahme von *Streptomyces coelicolor* involviert ist.^[150,151]

1.3.2 Das Tuberactinomycin-Antibiotikum Viomycin

Familie der Tuberactinomycin-Antibiotika:

Die Tuberactinomycin-Familie der nicht-ribosomal synthetisierten Antibiotika umfasst mehrere strukturell verwandte Antibiotika. Neben den Tuberactinomycinen gehören die Capreomycin-Antibiotika und das Streptothricin F dieser Antibiotika-Klasse an (Abb. 1.17).^[152]

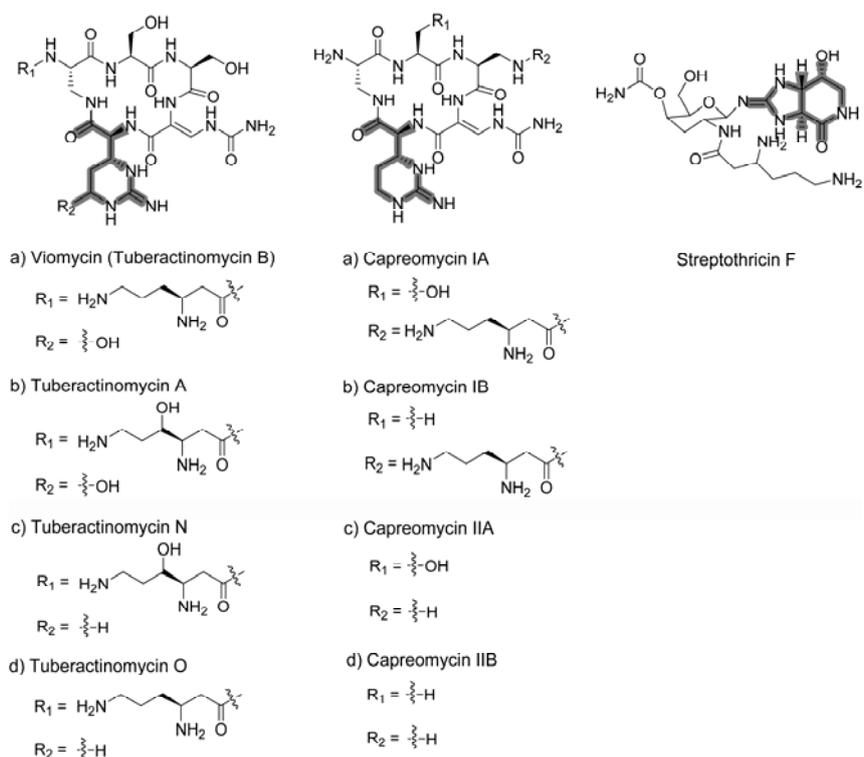


Abbildung 1.17: Chemische Strukturen der Tuberactinomycin-Antibiotika. Der für die antimikrobielle Aktivität essentielle Capreomycinid-Residue und seine Derivate sind grau unterlegt.

Ein Drittel der Weltbevölkerung ist mit dem potentiell pathogenen Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* infiziert. Dieses kann Tuberkulose auslösen und somit zu dem Kollaps des respiratorischen Systems und auch zum Tod führen.^[153] Ein gravierendes Problem bei der Behandlung von Tuberkulose-Patienten stellt die zunehmende Resistenz von *Mycobacterium tuberculosis* gegen die vorhandenen Medikamente zur Behandlung der Tuberkulose dar.^[154] Daher müssen derzeit verwendete Antibiotika weiterentwickelt werden, um dem Resistenzproblem zu begegnen. Die Tuberactinomycin-Antibiotika werden zur Behandlung von Tuberkulose eingesetzt und stellen vielversprechende „Scaffolds“ zur Bioaktivitätserweiterung dar. Viomycin wurde als erstes Mitglied dieser Familie identifiziert, doch Nebenwirkungen wie nierenschädigende Eigenschaften limitierten den Einsatz dieses Antibiotikums.^[155,156] Inzwischen wurde Viomycin in der Tuberkulose-Therapie durch das Antibiotikum Capreomycin ersetzt, das ein Gemisch aus vier Derivaten ist und geringere Toxizität aufweist (Abb. 1.17).^[157] Die Tuberactinomycin-Antibiotika können auch zur Behandlung von Infektionen eingesetzt werden, die durch Vancomycin-resistente Enterokokken und Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* Stämme verursacht werden.^[158]

Biosynthese von Viomycin:

Das zyklische Pentapeptid-Antibiotikum Viomycin aus *Streptomyces vinaceus* setzt sich aus zwei Serin-Resten, einem L-2,3-Diaminopropionat-Baustein (2,3-Dap), einem β -Ureidodehydroalanin-Rest (β -Uda) und einem L-Tuberactidin-Baustein (Cap) zusammen. Außerdem wird β -Lysin als exozyklische Aminosäure an das Peptidgrundgerüst gebunden.^[158] Durch Annotierung des Biosynthese-Genclusters konnten sechs Gene identifiziert werden, die für nicht-ribosomale Peptidsynthetasen codieren. Vier dieser Synthetasen (VioA, VioI, VioF und VioG) sind vermutlich in die Assemblierung des Pentapeptidgerüsts involviert (Abb. 1.18).^[157,158]

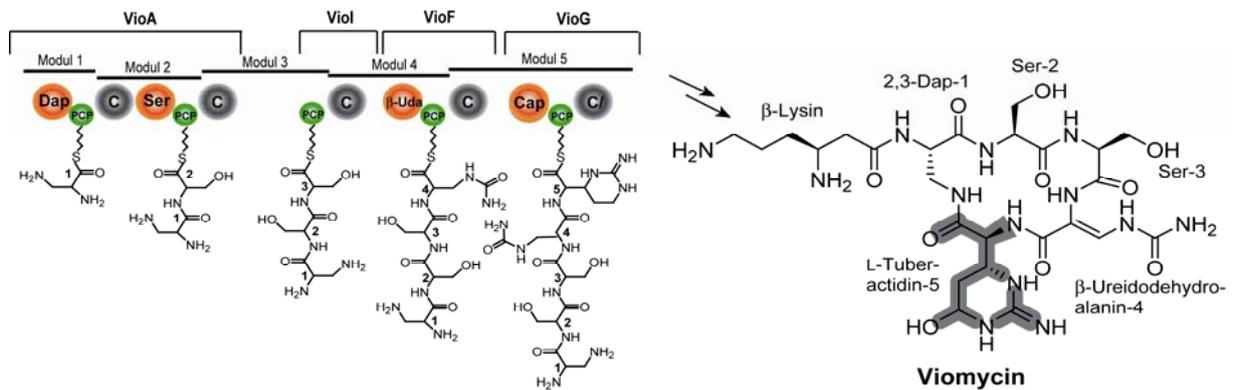


Abbildung 1.18: Postulierte Anordnung der nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen für die Synthese des Viomycin-Peptidgerüsts. Nach der Abspaltung und Makrolaktamisierung wird das zyklische Pentapeptid durch mehrere Modifikationsenzyme in Viomycin umgewandelt.

Die vier Synthetasen enthalten fünf Module, die wiederum in 14 Domänen unterteilt sind. Jedes Modul aktiviert einen spezifischen Baustein und baut ihn in die wachsende Peptidkette ein. Bisher konnten die Spezifitäten der A-Domänen von VioF und VioG *in vitro* bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass die VioF-A-Domäne spezifisch β -Ureidoalanin aktiviert und die A-Domäne der VioG-Synthetase spezifisch für (2*S*,3*R*)-Capreomycinid ist.^[157,159] Da im Modul 3 die entsprechende Adenylierungsdomäne fehlt, wurde postuliert, dass die Serin-aktivierende A-Domäne aus Modul 2 zwei Serin-Reste aktiviert und auf die Peptidyl-Carrier-Proteine von Modul 2 und Modul 3 transferiert. Interessanterweise befindet sich am C-Terminus von VioG eine verkürzte Kondensationsdomäne, obwohl keine weitere Peptidbindungsbildung katalysiert werden muss. Es konnte allerdings auch keine TE-Domäne identifiziert werden, die eine Zyklisierung des Peptidrückgrats katalysiert.^[157]

In dem Viomycin-Biosynthese-Gencluster werden zahlreiche NRPS-assoziierte Modifikationsenzyme codiert, die zum einen das Peptidrückgrat nach der Assemblierung modifizieren und zum anderen in die Biosynthese der Vorläufermoleküle involviert sind. Bezüglich der Modifikationsreaktionen von PCP-gebundenen Bausteinen oder dem Peptidrückgrat konnte gezeigt werden, dass die nicht-Häm Eisen-abhängige Rieske Oxygenase VioQ für die C5-Hydroxylierung von L-Capreomycinid nach der Aktivierung durch die VioG-A-Domäne verantwortlich ist.^[159] Des Weiteren wurde postuliert, dass VioJ die α,β -Dehydrierung des β -Ureidoalanin-Restes katalysiert und dass die sechste Aminosäure β -Lysin unter Katalyse der Enzyme VioO (A-Domäne und PCP) und VioM (C-Domäne) auf die α -Aminogruppe von L-2,3-Diaminopropionat übertragen wird.^[157,158]

Die vier nicht-proteinogenen Bausteine der Viomycin-Biosynthese werden vermutlich wie in Abbildung 1.19 dargestellt vor der Aktivierung durch die entsprechenden A-Domänen synthetisiert. Da das Enzym VioP Homologien zu Lysin-2,3-Aminomutasen zeigt, die den

Transfer der α -Aminogruppe von Lysin auf das C_{β} -Kohlenstoffatom katalysieren, wird es der Biosynthese von β -Lysin zugeordnet (Abb. 1.19 (A)).^[158,160] Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zwischen VioL und Ornithin-Carbamoyltransferasen wird angenommen, dass dieses Enzym für die Modifikation von L-2,3-Diaminopropionat zuständig ist und β -Ureidoalanin bildet (Abb. 1.19 (B)).^[157,161] Für die Biosynthese von L-2,3-Diaminopropionat werden vermutlich zwei Modifikationsenzyme benötigt. Die Ausgangsverbindung der Biosynthese stellt L-Serin dar, das von einem homologen Protein der Cystein-Synthasen und Serin-Dehydratasen (VioB) als α -Aminoacrylat-Intermediat über eine Schiff-Base gebunden wird. Dieses wird anschließend durch Ammoniak nukleophil angegriffen und von VioB freigesetzt. Als Nucleophildonor dient vermutlich L-Ornithin, das durch die Ornithin-Cyclodeaminase VioK zu L-Prolin umgesetzt wird (Abb. 1.19 (C)).^[158] Die Biosynthese von (2*S*,3*R*)-Capreomycin wurde bereits eingehend untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die nicht-Häm Fe(II)-/ α KG-abhängige Monooxygenase VioC stereospezifisch die C_{β} -Position von L-Arginin hydroxyliert. In einem zweiten Reaktionsschritt katalysiert das PLP-abhängige Enzym VioD die Zyklisierung von β -Hydroxy-Arginin zu Capreomycin.^[152,162,163] Die von VioC-katalysierte Hydroxylierungsreaktion wurde in dieser Arbeit näher untersucht, indem das Enzym biochemisch und strukturell charakterisiert wurde (Abschnitte 4.2 und 5.2).

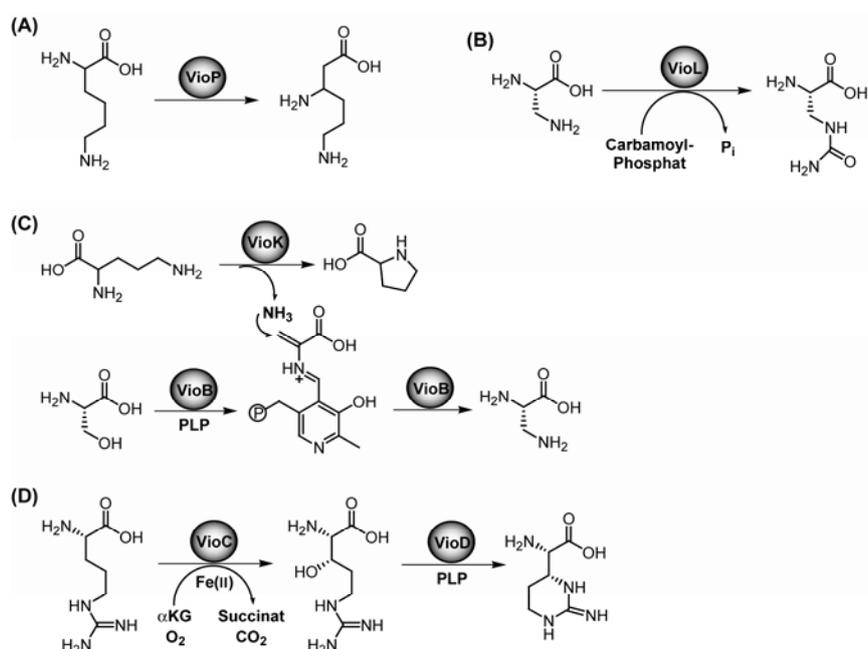


Abbildung 1.19: Vermutete Biosynthesewege der nicht-proteinogenen Viomycin-Bausteine. (A) VioP-katalysierte Bildung von β -Lysin. (B) Carbamoylierung von L-2,3-Diaminopropionat durch VioL. (C) Für die Biosynthese von L-2,3-Diaminopropionat wird Serin durch VioB PLP-abhängig dehydratisiert und anschließend nukleophil von einer Aminogruppe angegriffen (untere Reaktion). Als Aminogruppendonor dient Ammoniak, das in einer VioK-katalysierten Zyklisierung von Ornithin freigesetzt wird (obere Reaktion). (D) Der (2*S*,3*R*)-Capreomycin-Baustein wird aus L-Arginin generiert. VioC hydroxyliert die C_{β} -Position von Arg und die folgende VioD-katalysierte Zyklisierung führt zu dem Capreomycin-Molekül.

Wirkungsweise von Viomycin:

Die Wirkungsweise von Viomycin als Antibiotikum wurde auf vielfältige Weise untersucht. Hierbei wurden z.B. Ribosomen-Rekonstitution oder Translations-Inhibitions-Studien durchgeführt.^[164-166] Dabei wurde festgestellt, dass Viomycin Bakterienwachstum durch Blockierung der Proteinbiosynthese am Ribosom inhibiert. Das Antibiotikum beeinflusst dabei verschiedene Abläufe, die am Ribosom stattfinden. Die Bildung des 30S-Untereinheiten-Initiations-Komplexes wird behindert^[166] und die tRNA-Translokation von der A- zur P-Seite in der 50S-Untereinheit wird durch Viomycin blockiert.^[165] Dies deutet auf eine einzigartige Wirkungsweise von Viomycin hin. Das Antibiotikum scheint mit beiden Untereinheiten des Ribosoms Interaktionen einzugehen. Allerdings konnten bisher keine Kristallstrukturen von Ribosomen-gebundenem Viomycin erhalten werden. Daher ist der genaue Wirkungsmechanismus von Viomycin noch unbekannt.^[167]

1.3.3 Das Glykopeptid-Antibiotikum Mannopectimycin*Mannopectimycin-Antibiotika:*

Die Familie der Mannopectimycin-Antibiotika umfasst fünf Derivate, die zu den Glykopeptid-Antibiotika gezählt werden können und von *Streptomyces hygroscopicus* produziert werden (Abb. 1.20).^[168] Diese Naturstoffe weisen Aktivität gegen klinisch relevante Gram-positive pathogene Stämme auf. Hierbei wurde Aktivität gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* Stämme, Penicillin-resistente *Streptococcus pneumoniae* Stämme und Vancomycin-resistente Enterokokken beobachtet.^[169] Die Mannopectimycin-Derivate zeigen unterschiedliche antimikrobielle Aktivitäten. Die Hauptprodukte eines Fermentationsprozesses, Mannopectimycin α und β , weisen geringe Bioaktivität auf.^[169] Dies kann auf die fehlende Veresterung der Di-Mannose-Einheit im Fall von Mannopectimycin α und die fehlende Glykosylierung von Mannopectimycin β zurückgeführt werden (Abb. 1.20).^[169]

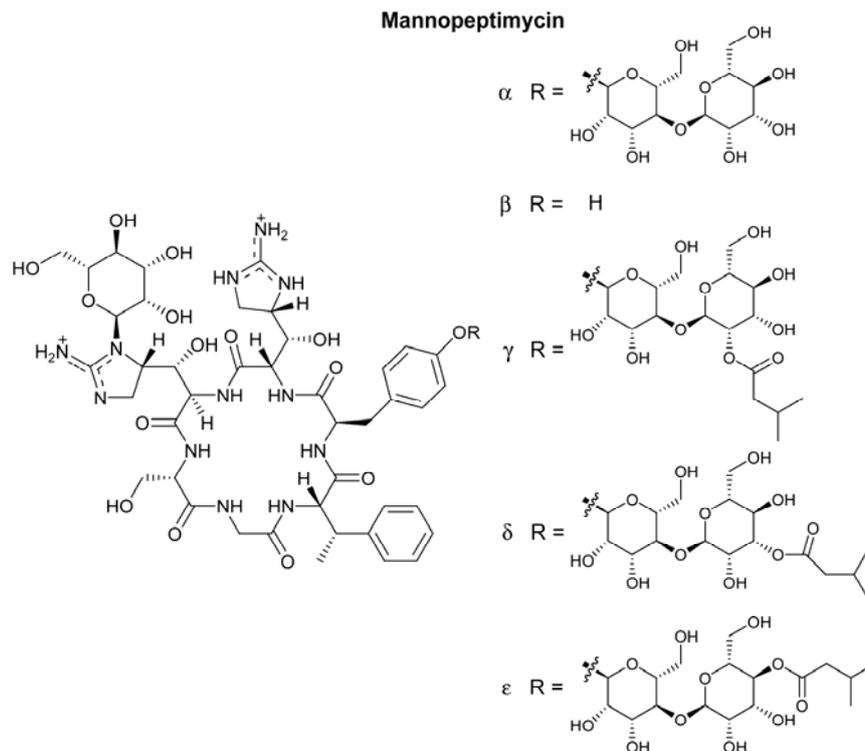


Abbildung 1.20: Chemische Strukturen der Mannopectimycine $\alpha - \epsilon$.

Biosynthese der Mannopectimycine:

Der Mannopectimycin-Biosynthese-Gencluster enthält zwei Gene, die für nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (MppA und MppB) codieren. Hierbei ist jedes der sechs Module für den Einbau einer spezifischen Aminosäure verantwortlich (Abb. 1.21). Zunächst werden L-Serin und Glycin miteinander peptidisch verknüpft und es wird vermutet, dass die dritte A-Domäne von MppA für die Aktivierung von β -Methyl-Phenylalanin verantwortlich ist.^[170] Mittels NMR-Studien konnte die absolute Stereochemie der Mannopectimycin-Bausteine bestimmt werden (Abb. 1.21)^[168] und es wurde postuliert, dass die Adenylierungsdomäne MppA-A₃ spezifisch (2*S*,3*S*)- β -Me-Phe aktiviert. Die zweite trimodulare Synthetase MppB katalysiert zunächst den Einbau eines D-Tyrosin-Rests, wobei anschließend die nicht-proteinogene Aminosäure (2*S*,3*S*)- β -Hydroxy-Enduracididin aktiviert wird. Da das Terminationsmodul von MppB keine A-Domäne aufweist, der β -Hydroxy-Enduracididin-Rest aber zweimal in dem Hexapeptid-Grundgerüst der Mannopectimycine identifiziert wurde, scheint die MppB-A₂-Domäne zwei (2*S*,3*S*)- β -Hydroxy-Enduracididin-Reste zu aktivieren. Der zweite Baustein wird anschließend durch die C-terminale Epimerisierungsdomäne in (2*R*,3*S*)- β -Hydroxy-Enduracididin umgewandelt und in die Peptidkette eingebaut.^[170] Die Spezifität von MppB-A₂ für (2*S*,3*S*)- β -Hydroxy-Enduracididin konnte *in vitro* gezeigt werden.^[170] Ein weiteres ungewöhnliches Merkmal der NRPS ist das Fehlen einer C-terminalen TE-Domäne, die die Zyklisierung und Abspaltung des Mannopectimycin-Peptids von der Synthetase katalysieren

könnte. Daher wurde postuliert, dass das im Gencluster codierte α,β -Hydrolase-ähnliche Enzym MppK diese Reaktion katalysiert.^[170]

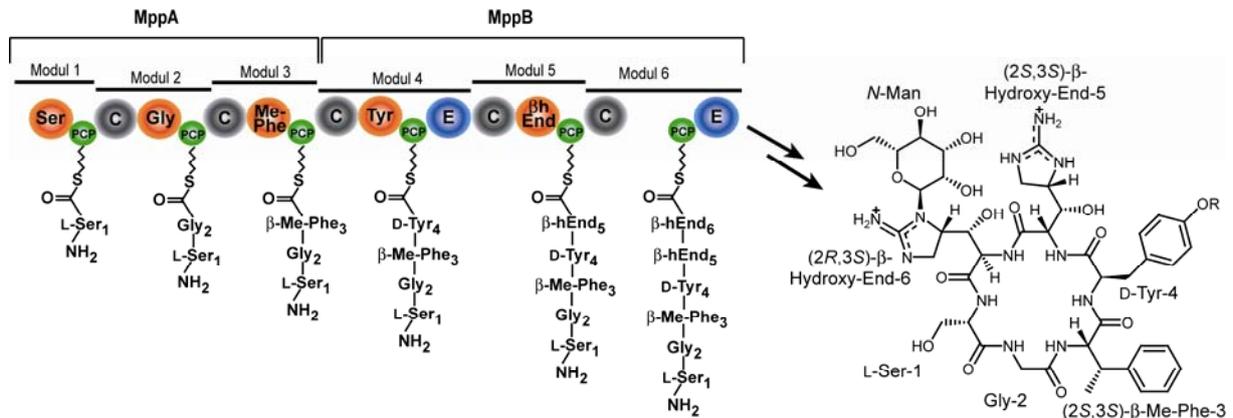


Abbildung 1.21: Domänenorganisation der nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen des Biosynthese-Genclusters von Mannozeptimycin und Assemblierung des Hexapeptids.

In dem Biosynthese-Gencluster der Mannozeptimycine werden drei putative Mannosyltransferasen (MppG, MppH und MppI) codiert, die vermutlich Glykosylierungsreaktionen des Mannozeptimycin-Peptidrückgrats katalysieren.^[170]

Bezüglich der Vorläufermolekül-Biosynthese wurde postuliert, dass der Enduracididin-Baustein, der auch in das Peptid-Antibiotikum Enduracidin eingebaut wird, durch die beiden putativen PLP-abhängigen Aminotransferasen MppP und MppQ synthetisiert wird.^[171] Bisher konnte allerdings nur gezeigt werden, dass dieser Baustein aus der Aminosäure L-Arginin gebildet wird.^[172] Außerdem wurde die nicht-Häm Fe(II)-/ α KG-abhängige Monooxygenase MppO biochemisch charakterisiert.^[105] Diese weist eine hohe Substratspezifität für L-Enduracididin auf und katalysiert eine stereospezifische C_β -Hydroxylierung, um den Baustein (2S,3S)- β -Hydroxy-Enduracididin zu generieren. Ein weiterer nicht-proteinogener Baustein der Mannozeptimycin-Biosynthese ist (2S,3S)- β -Methyl-Phenylalanin, der vermutlich durch eine MppJ-katalysierte C_β -Methylierung von Phenylalanin gebildet wird.^[170] Da die Biosynthese von (2S,3S)- β -Me-Phe in dieser Arbeit untersucht wurde, wird im Ergebnisteil (Abschnitt 4.3) und im Diskussionsteil (Abschnitt 5.3) näher auf diese neuartige Methyltransferase innerhalb der Mannozeptimycin-Biosynthese eingegangen.

Wirkungsweise der Mannozeptimycine:

Studien zur Wirkungsweise der Mannozeptimycin-Antibiotika zeigten, dass sie Einfluss auf die bakterielle Zellwandbiosynthese nehmen.^[169] Dabei weisen die Mannozeptimycine einen einzigartigen Wirkungsmechanismus auf. Sie binden den Membran-assoziierten Zellwand-Vorläufer Lipid II auf eine andere Weise als bisher bekannte Lipid II-bindende Antibiotika

wie z.B. Ramoplanin, Mersacidin oder Vancomycin.^[173] Durch ihre Wirkungsweise inhibieren die Mannopectimycine den für den Einbau von Lipid II in das Peptidoglykan essentiellen Transglykosylierungsschritt (Abb. 1.22).^[173]

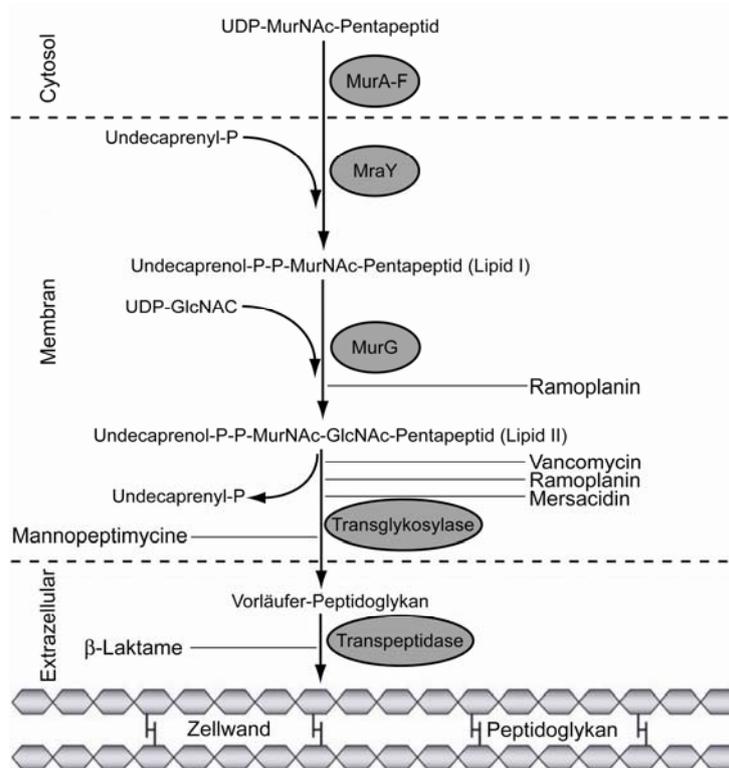


Abbildung 1.22: Schematische Darstellung der Zellwandbiosynthese mit den Angriffspunkten der Lipid II-bindenden Antibiotika (nach Koehn).^[174] UDP = Uridindiphosphat, P = Phosphat, MurNAc = *N*-Acetylmuraminsäure, GlcNAc = *N*-Acetylglucosamin.

Zusätzlich binden die Mannopectimycine Lipoteichonsäure, wodurch das Antibiotikum auf der Zelloberfläche angereichert wird.^[174] Diese Ergebnisse zeigen, dass Lipid II ein vielversprechendes Zielmolekül für die Weiterentwicklung von Antibiotika darstellt, da bisher vier verschiedene Antibiotika-Familien identifiziert wurden, die mit Lipid II interagieren. Interessanterweise weisen diese vier Antibiotika-Klassen unterschiedliche Mechanismen bei der Inhibition der bakteriellen Zellwandbiosynthese auf.^[175]

1.4 Aufgabenstellung

Das erste Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Biosynthese von N^δ -modifizierten Ornithin-Bausteinen, die charakteristisch für das Tris-Hydroxamat-Siderophor Coelichelin sind. Die putative Flavin-abhängige Monooxygenase CchB und die putative Formyltransferase CchA sollten *in vitro* biochemisch charakterisiert werden, um die Substratspezifität und den Zeitpunkt der Hydroxylierungs- und Formylierungsreaktion während der Coelichelin-Biosynthese zu untersuchen.

In dieser Arbeit sollte auch die chemisch anspruchsvolle C_β -Hydroxylierung von L-Arginin während der Viomycin-Biosynthese näher untersucht werden. Diese Modifikationsreaktion wird von der nicht-Häm Eisen(II)- und α -Ketoglutarat-abhängigen Monooxygenase VioC katalysiert. Die biochemische Charakterisierung fokussierte insbesondere die Substratspezifität sowie die katalytische Effizienz des Enzyms VioC. Entgegen des postulierten Produkts katalysiert die Monooxygenase VioC die Bildung des *erythro* Diastereomers von β -Hydroxy-Arginin. Um strukturelle Erklärungen für diese Stereospezifität und die Substratelektivität von VioC zu erhalten, sollten die Kristallstrukturen eines VioC-Substratkomplexes und eines VioC-Produktkomplexes gelöst werden.

Das dritte Ziel dieser Arbeit war die *in vitro*-Charakterisierung der Biosynthese von β -Methyl-Phenylalanin. Diese nicht-proteinogene Aminosäure findet sich im Glykopeptid-Antibiotikum Mannopectimycin. Die bioinformatische Analyse des Mannopectimycin-Genclusters ermöglichte die Identifizierung der putativen SAM-abhängigen Methyltransferase MppJ. Das Protein sollte rekombinant hergestellt und biochemisch *in vitro* charakterisiert werden. Ziel dieser Charakterisierung war die Identifikation des nativen Substrats von MppJ sowie die Bestimmung des Zeitpunkts der Methylierungsreaktion.

2. Material

2.1 Geräte

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte mit Hersteller und Typenbezeichnung.

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
Autoklav	<i>Tuttnauer 5075 ELV</i> <i>Fedegari Autoclavi SPA FVA3/A1</i>
Analysewaagen	<i>Sartorius</i>
Beamlines	X06SA an der SLS (Villigen, Schweiz) ID14-4 an der ESRF (Grenoble, Frankreich)
Bidestillationsanlage für Wasser	<i>Seral Seralpur Pro90CN</i>
Brutschrank	<i>Köttermann 2736</i>
Clean-Bench	<i>Antair BSK</i>
Dokumentation von DNA-Agarosegelen	<i>Cybertech CS1 Videokamera</i> <i>Mitsubishi Video Copy Processor Thermodrucker</i>
Elektrophorese	Agarosegelkammern (hergestellt von Philipps-Universität Marburg) <i>Bio-Rad Mini-PROTEAN 3 Gelkammer</i>
Elektroporations-Pulser	<i>Bio-Rad Gene Pulser und Pulse-Controller</i>
ESI-MS-System	<i>Hewlett Packard Series 1100</i>
Fluidizer	<i>AVESTIN, EmulsiFlex-C5</i>
FPLC-Säulen	<i>Amersham Biosciences</i> Ni-NTA Säulen, HiTrap TM Desalting, HiLoad Superdex Gelfiltrationssäule
FPLC-System	<i>Amersham Pharmacia FPLC-System 250:</i> Gradienten-Programmer GP-250, Pumpen P-500, Uvicord Optische Einheit UV-1 ($\lambda = 280 \text{ nm}$), Uvicord Kontrolleinheit UV-1, Injektionsventil V-7, 2-Kanal Flachbrettschreiber REC-102, 3-Wege-Magnetventil PSV-100, Fraktionskollektor FRAC-100; <i>Amersham Pharmacia ÄktaTM Prime</i>

French-Press	<i>SLM Aminco</i> French-Pressure Cell Press 5.1 <i>Thermo Spectronic</i> Standard Cell 40 KP
Gefriertrocknungs-Anlagen	<i>Edwards</i> Freeze Dryer Super Modulyo <i>Christ</i> Alpha 2-4 LSC
Heizschüttler	<i>Eppendorf</i> Thermomixer Comfort
HPLC-System	<i>Agilent</i> series 1100 HPLC-System: Vakuum-Entgaser, DAD-Detektor, Quaternäre Pumpe, Autosampler, Fraktionskollektor, HP-Chemstation
HPLC-Trennsäulen	<i>Macherey & Nagel</i> CC 250/2 Nucleodur 100-3 C18ec, CC 250/3 Nucleosil 120-3 C18, VP 250/21 Nucleodur 100-5 C18ec <i>Thermo Electron Corporation</i> Hypercarb 250-5
Kristallisationsroboter	<i>Genomic Solutions</i> Cartesian Microsys™ SQ 4000
Kristallobservation	<i>Olympus</i> Mikroskop SZ60, Lichtquelle TH3, Objektivaufsatz SZ-PT
Luftschüttler	<i>New Brunswick Scientific</i> Series25 Incubator Shaker, Innova4300 Incubator Shaker <i>INFORS HT</i> Multitron
MALDI-TOF	<i>Bruker</i> FLEXIII
Nanodrop	<i>PEQLab</i> ND-1000
PCR-Maschine	<i>Eppendorf</i> Mastercycler Personal
Peptid-Synthetisierer	<i>Advanced ChemTech</i> APEX396 Synthesizer
pH-Meter	<i>Schott</i> CG 840
Pipetten	<i>Eppendorf</i> Research Serie
Pipettierroboter	<i>Zinsser Analytic</i> Lissy
Photometer	<i>Amersham Biosciences</i> Ultrospec3100Pro
Speed-Vac	<i>Uniequib</i> Univapo 150H
Vakuumgeltrockner	<i>Fisherbrand</i> FSGD-5040
Vortexer	<i>Scientific Industries</i> Vortex Genie2

Zentrifugen	<i>Eppendorf</i> Centrifuge 5415D <i>Heraeus</i> Biofuge Pico, Megafuge 1.0 R <i>Sorvall</i> RC26Plus, RC5BPlus
-------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

2.2 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien, die in der folgenden Tabelle nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von den Firmen *Merck* (Darmstadt) und *Sigma-Aldrich* (Seelze, Steinheim) in p.a. Qualität bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.

Hersteller (Vertriebsort)	Produkt(e)
<i>ACROS Organics</i> (Nidderau, Deutschland)	L-Homoarginin Hydrochlorid
<i>Agilent Technologies</i> (Böblingen, Deutschland)	DHB-Matrix
<i>Amersham Biosciences European GmbH</i> (Freiburg, Deutschland); <i>GE Healthcare</i>	Agar Nr. 1, Ampicillin, Coomassie Brilliant Blue G und R250, Hefeextrakt, IPTG, Kanamycin
<i>Bachem</i> (Weil am Rhein, Deutschland)	geschützte und ungeschützte Aminosäuren
<i>Brand</i> (Wertheim, Deutschland)	Einmalküvetten Plastbrand PS
<i>Eppendorf</i> (Hamburg, Deutschland)	1.5 mL und 2.0 mL Reaktionsgefäße
<i>Eurogentech</i> (Seraing, Belgien)	Agarose, Elektroporationsküvetten
<i>Fermentas</i> (St. Leon-Rot, Deutschland)	PageRuler Unstained Protein Ladder
<i>Finnzymes</i> (Espoo, Finnland)	Phusion DNA-Polymerase
<i>GATC</i> (Konstanz, Deutschland)	Plasmidsequenzierungen
<i>Hempton Research</i> (Aliso Vejo, USA)	Schlaufen zur Proteinkristallfixierung
<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland)	<i>E. coli</i> -Stämme (TOP10, BL21) pBAD102/D-TOPO Expression Kit pET151/D-TOPO Expression Kit
<i>Iris Biotech</i> (Marktredwitz, Deutschland)	geschützte Aminosäuren

<i>Merck4Biosciences</i> (Nottingham, Großbritannien)	2-Chlorotriethylchlorid-Harz, geschützte Aminosäuren, HBTU, HOBt, pET28a(+)-Vektor, PyBOP
<i>Millipore</i> (Bedford, USA)	Dialysemembran (Porengröße 0.025 µm) Amicon Ultra-Konzentratoren
<i>MP Biomedicals</i> (Illkirch, Frankreich)	Coenzym A Trilithiumsalz
<i>Nextal Biotechnologies</i> (Montreal, Kanada)	Kristallisations-Screens (Nextal Classic Suite, Nextal Classic Lite Suite, Nextal Anion Suite, Nextal MBC I Suite, Nextal MBC II Suite)
<i>New England Biolabs</i> (Frankfurt am Main, Deutschland)	Desoxyribonukleotide (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 1 kb-DNA-Ladder, Protein-Marker, Restriktionsendonukleasen
<i>Eurofins MWG Operon</i> (Ebersberg, Deutschland)	Oligonukleotide
<i>Oxoid</i> (Cambridge, Großbritannien)	Agar Nr. 1, Trypton
<i>Qiagen</i> (Hilden, Deutschland)	Ni ²⁺ -NTA-Agarose, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick-spin PCR Purification Kit
<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)	Acrylamid für SDS-PAGE, β-Mercaptoethanol, Ethidiumbromid, Piperidin
<i>Sarstedt</i> (Nümbrecht, Deutschland)	Pipettenspitzen
<i>Schleicher & Schüll</i> (Dassel, Deutschland)	Sterilfilter (0.20 µm und 0.45 µm) Whatmann-3MM Papier
<i>Serva</i> (Heidelberg, Deutschland)	Bromphenolblau, Triton X-100
<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim, Deutschland)	Glycerol, <i>N</i> -Acetylcysteamin, Oligonukleotide, SDS, TEMED, trockene Lösungsmittel

2.3 Vektoren

2.3.1 pCB28a(+)

Bei dem pCB28a(+)-Vektor handelt es sich um einen derivatisierten pET28a(+)-Vektor (Novagen), der für die Expression von rekombinanten Proteinen mit N-terminaler His₆-Tag Fusion verwendet wurde (Abb. 2.1). Die Transkription der klonierten Gene ist abhängig von der T7-RNA-Polymerase und kann durch IPTG-Zugabe induziert werden.

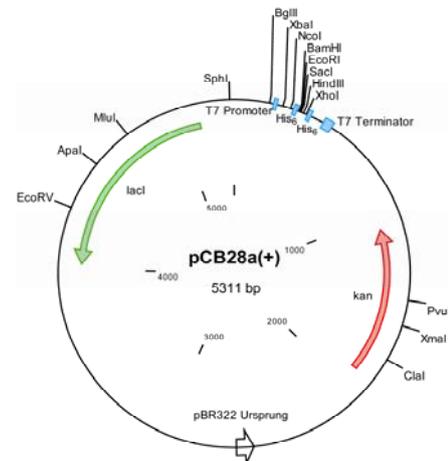


Abbildung 2.1: Physikalische Karte des Expressionsvektors pCB28a(+).

2.3.2 pET151/D-TOPO

Das pET151/D-TOPO Vektorsystem (Invitrogen) wurde ebenfalls für die Klonierung und Expression von rekombinanten Proteinen mit N-terminalem His₆-Tag verwendet. Damit können die Proteine über Ni²⁺-NTA Affinitätschromatographie gereinigt werden. Die Expression wird über einen T7-Promotor reguliert und ist mit IPTG induzierbar. In die so genannte „TOPO Cloning Site“ können direkt PCR-Produkte mit glatten Enden kloniert werden und der His₆-Tag kann nach der Reinigung durch die TEV-Protease (engl. *tobacco etch virus protease*) abgespalten werden, deren Spaltungssequenz durch den Vektor codiert wird (Abb. 2.2).

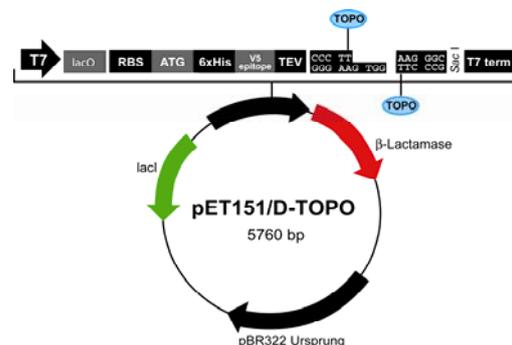


Abbildung 2.2: Physikalische Karte des Expressionsvektors pET151/D-TOPO.

2.3.3 pBAD102/D-TOPO

Ein weiteres verwendetes TOPO-Vektorsystem war der pBAD102/D-TOPO-Vektor (Invitrogen). Hierbei wird die Expression über einen araBAD-Promotor (P_{BAD}) reguliert und mit Arabinose induziert. Während der Expression wird neben einem C-terminalen His₆-Tag an das rekombinant produzierte Protein eine His-patch Thio redoxin-Domäne (11.7 kDa) angehängen, die zur Verbesserung der Translationseffizienz und Proteinlöslichkeit beitragen soll (Abb. 2.3).

Allerdings kann diese Domäne durch die Enterokinase-Protease abgespalten werden, welche die EK Spaltungssequenz erkennt.

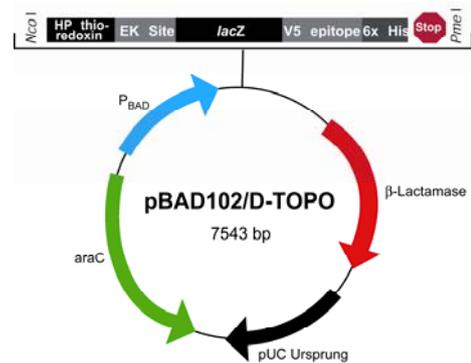


Abbildung 2.3: Physikalische Karte des Expressionsvektors pBAD102/D-TOPO.

2.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide, die als PCR-Primer zur Amplifikation der Zielgene eingesetzt wurden, sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tabelle 2.3: Verwendete PCR-Primer mit unterstrichener Restriktionsschnittstelle.

Primername	Sequenz (5' → 3')	Restriktions-enzym	Vektor	Ziel-gen
5'-CchBBamHI	AAAAAAGGATCCTCACAGGTTCTT CCTGCTGACTCAAC	<i>Bam</i> HI	pCB28a(+)	<i>cchB</i>
3'-CchBHind	AAAAAAAAGCTTTTAACGCGCGCC GGTGCCGGT	<i>Hind</i> III		
5'-CchApCB	AAAAAAGAATTCATGCGGGTCGTC ATGTTCCGGCT	<i>Eco</i> RI	pCB28a(+)	<i>cchA</i>
3'-CchApCB	AAAAAACTCGAGTCAGGGGCGGGC GGTCAG	<i>Xho</i> I		
5'-CchATOPO	CACCATGCGGGTCGTCATGTTCGG CTACCAGAC	—	pBAD102/ D-TOPO	<i>cchA</i>
3'-CchATOPO	GGGGCGGGCGGTCAGGTAGCC	—		
5'-MppJBamHI	AAAAAAGGATCCCATGAGTACCGAG GTTTCCGAGGCGC	<i>Bam</i> HI	pCB28a(+)	<i>mppJ</i>

3'-MppJHindIII	AAAAAAAAGCTTTTACTCGAGTTC GAAGACCACGGAGAC	<i>HindIII</i>		
5'MppPBamHI	AAAAAAGGATCCGTGCTGAGCTGC TACTCCTCCTCG	<i>BamHI</i>	pCB28a(+)	<i>mppP</i>
3'MppPHindIII	AAAAAAAAGCTTTCAACGCTGTTT CAGCACGTGGGCGC	<i>HindIII</i>		
5'MppQBamHI	AAAAAAGGATCCATGACGCCTGTC GCAGAAGGAGGAC	<i>BamHI</i>	pCB28a(+)	<i>mppQ</i>
3'MppQHindIII	AAAAAAAAGCTTTCACGATCTCAC TCCGATCTCGAGGTC	<i>HindIII</i>		
5'-MppA-T3 für pET151	CACCACCGCCGACCGCATCCCG	—	pET151/D- TOPO	<i>PCP₃</i> von <i>mppA</i>
3'-MppA-T3 für pET151	TCATAGGGCGCCGCCTCCG	—		
5'-IlvEBamHI	AAAAAAGGATCCATGACGACGCC ACGATCGAGCTC	<i>BamHI</i>	pCB28a(+)	<i>ilvE</i>
3'-IlvEHindIII	AAAAAAAAGCTTTCAGGCCAGCGT GTGCATCCACC	<i>HindIII</i>		

2.5 Mikroorganismen

2.5.1 *Escherichia coli* TOP10

Der Stamm *E. coli* TOP10 (Invitrogen) wurde zu Klonierungszwecken eingesetzt. Er besitzt den Genotyp F⁻ *mcrA*. (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) 80*lacZ*.M15.*lacX74 deoR recA1 araD139. (ara-leu)*7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*.

2.5.2 *Escherichia coli* BL21(DE3)

Der Stamm *E. coli* BL21(DE3) (Invitrogen) mit dem Genotyp F⁻ *ompT*[[*Ion*]*r_b⁻m_b⁻* wurde als bakterieller Wirtsorganismus zur Expression von Plasmid-DNA verwendet. Er zeichnet sich durch das Fehlen von OmpT (Protease der Außenmembran) und einem Mangel an Ion (Protease) aus, wodurch die Stabilität der überproduzierten rekombinanten Proteine merklich erhöht wird. Eine weitere Besonderheit dieses Stammes besteht darin, dass das Gen einer durch IPTG induzierbaren T7-Polymerase auf einem λ -Prophagen im Chromosom nach *lacZ* und dem Promotor *lacuV5* insertiert ist. Dies ist essentiell für die Induktion der Expression von Genen, die unter Kontrolle des T7-Promotors stehen.

2.5.3 *Streptomyces* Spezies

Streptomyces coelicolor A3(2) (DSM 40783) and *Streptomyces hygroscopicus* (NRRL 30439) wurden kultiviert, um chromosomale DNA aus diesen Stämmen zu gewinnen.

2.6 Kulturmedien

Die folgenden Medien wurden für die Anzucht der oben beschriebenen Mikroorganismen verwendet. Für die Kultivierung auf Agarplatten wurde Agar Nr. 1 in einer Konzentration von 1.5% (w/v) vor dem Autoklavieren (121 °C, 1.5 bar, 20 min) dem Medium zugegeben. Selektierende Antibiotika wurden in folgenden Konzentrationen zu autoklaviertem, auf unter 55 °C abgekühltem Medium gegeben: 50 µg/mL Kanamycin und 100 µg/mL Ampicillin.

2.6.1 LB-Medium

E. coli-Stämme wurden ausschließlich in LB-Medium mit einem pH-Wert von 7.0 gezüchtet. Bei Expressionsansätzen wurde dem Medium zusätzlich Magnesiumchlorid mit einer Endkonzentration von 20 mM hinzugefügt, um die Proteinlöslichkeit und Proteinstabilität zu erhöhen.

LB-Medium: 10 g/L Bactotrypton
5 g/L Hefeextrakt
5 g/L Natriumchlorid

2.6.2 Medium 65

Streptomyces Spezies wurden zur Anzucht in Medium 65 mit einem pH von 7.2 inkubiert.

Medium 65: 4 g/L Glucose
4 g/L Hefeextrakt
2 g/L Calciumcarbonat
10 g/L Malzextrakt

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung der *Streptomyces* Spezies und Präparation von chromosomaler DNA

Je 5 mL Flüssigmedium (Medium 65) wurden wie vorgegeben (Protokolle der DSMZ oder NRRL) mit gefriergetrockneten Sporen der entsprechenden *Streptomyces* Spezies inokuliert und fünf Tage bei 28 °C und 250 Upm inkubiert. Nach der Zellernte (13 000 Upm, 3 min) wurde das Pellet mit 1 mL *ddH*₂O gewaschen, in 500 µL Lysepuffer (100 mM TRIS/HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA, 1% (w/v) SDS) resuspendiert und mit Säure behandelten Glaskugeln bis zu einem Endvolumen von 1.25 mL versetzt. Nach zweiminütigem Vortexen wurde der Boden des Eppendorf-Reaktionsgefäßes aufgestochen und es wurde kurz in ein anderes Reaktionsgefäß zentrifugiert. Die so erhaltene flüssige Phase wurde dann mit 275 µL einer 7 M Ammoniumacetatlösung (pH 7.0) versetzt und anschließend 5 min bei 65 °C und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µL Chloroform und kurzem Schütteln wurde erneut zentrifugiert (13 000 Upm, 2 min). Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die chromosomale DNA wurde durch Zugabe von 1 mL Isopropanol und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur ausgefällt. Nach Zentrifugation bei 13 000 Upm für 5 min wurde das DNA-Pellet zweimal mit je 200 µL 70% aq. EtOH gewaschen, für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und abschließend in 200 µL *ddH*₂O resuspendiert.

3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen zu präparieren, wurden zunächst 4 mL LB-Medium mit einer Zellkolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 250 Upm inkubiert. 2 mL dieser Übernachtskultur wurden dann in einem Reaktionsgefäß pelletiert (13 000 Upm, 5 min) und das Pellet wurde in 300 µL Puffer P1 (50 mM TRIS/HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 100 µg/mL RNase A) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 300 µL Puffer P2 (200 mM aq. NaOH, 1% (w/v) SDS) versetzt, geschüttelt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das Lysat mit 300 µL Puffer P3 (2.55 M aq. KOAc (pH 4.8)) versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (13 000 Upm, 20 min, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 600 µL Isopropanol versetzt und erneut zentrifugiert (13 000 Upm, 30 min, 4 °C), um die Plasmid-DNA zu

pelletieren. Dieses Pellet wurde anschließend mit 200 μ L 70% aq. EtOH gewaschen, bei 56 °C für 15 min getrocknet und in 30 μ L *ddH*₂O resuspendiert (56 °C, 15 min, 1 000 Upm).

3.1.3 Konstruktion der rekombinanten Expressionsplasmide

Die zur Konstruktion der rekombinanten Plasmide verwendeten Techniken sind größtenteils etabliert und beschrieben.^[176] Im Folgenden wird deshalb nur ein kurzer Überblick gegeben und die Besonderheiten der einzelnen Klonierungen werden dargestellt.

Mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und der Phusion Polymerase (Finnzymes) wurden die benötigten DNA-Fragmente entsprechend den Herstellerangaben für GC-reiche Templat-DNA amplifiziert. Die Reinigung der Amplifikate erfolgte nach Agarosegelelektrophorese mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ nach den Vorschriften des Herstellers (Qiagen). Nach Ligation der DNA-Fragmente mit den entsprechenden Vektoren erfolgte die Produktion der Plasmide in *E. coli* TOP10-Zellen. Die Plasmide wurden wie oben beschrieben (Abschnitt 3.1.2) isoliert und mittels Restriktionsverdau und DNA-Sequenzierung (GATC Biotech) verifiziert. Anschließende Elektrottransformationen von *E. coli* BL21(DE3)-Zellen mit den Plasmiden wurden wie vom Hersteller (Invitrogen) beschrieben durchgeführt.

3.1.3.1 Die Coelichelin-Cluster-Konstrukte

Konstruktion von pCB28a(+)[cchB]:

Das *cchB* Gen wurde aus chromosomaler DNA von *S. coelicolor* A3(2) mittels PCR mit den in Tabelle 2.3 aufgelisteten Primern amplifiziert. Das 1377 bp lange Genfragment wurde mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (Tabelle 2.3) nach Herstellerangaben (New England Biolabs) geschnitten und anschließend mit Hilfe der T4-DNA-Ligase nach Vorschriften der Herstellers (New England Biolabs) in die korrespondierenden Restriktionsschnittstellen des pCB28a(+)-Vektors ligiert.

Konstruktion von pCB28a(+)[cchA]:

Das *cchA* Gen (948 bp) wurde ebenfalls aus der chromosomalen DNA von *S. coelicolor* A3(2) mit den in Tabelle 2.3 gezeigten Oligonukleotiden mittels PCR amplifiziert. Nach Restriktionsverdau mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen (Tabelle 2.3) wurde das Genfragment in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des pCB28a(+)-Vektors ligiert.

Konstruktion von pBAD102/D-TOPO[cchA]:

Nach erneuter Amplifikation des *cchA* Gens mit den in Tabelle 2.3 aufgelisteten synthetischen Oligonukleotiden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion, wurde das PCR-Produkt (949 bp) unter Verwendung des „pBAD Directional TOPO Expression Kits“ (Invitrogen) nach Herstellerangaben direkt in den pBAD102/D-TOPO-Vektor kloniert.

3.1.3.2 Konstruktion von pET28a(+)[vioC]

Dieses Konstrukt wurde von Prof. Dr. Michael G. Thomas (Fachbereich Bakteriologie, Universität von Wisconsin-Madison, USA) beschrieben und hergestellt.^[152]

3.1.3.3 Die Mannopectimycin-Cluster-Konstrukte*Konstruktion von pCB28a(+)[mppJ]:*

Dieses Expressionsplasmid wurde von Dr. Christoph Mahlert (Bayer, Deutschland) konstruiert. Es wurden die in Tabelle 2.3 beschriebenen Primer für die PCR von der chromosomalen DNA von *S. hygroscopicus* verwendet. Nach Restriktionsverdau des *mppJ*-Amplifikates (1038 bp) mit den in Tabelle 2.3 gezeigten Restriktionsendonukleasen wurde das DNA-Fragment mit dem pCB28a(+)-Vektor ligiert.

Konstruktion von pCB28a(+)[mppP]:

Dr. Christoph Mahlert (Bayer, Deutschland) hat auch dieses Konstrukt hergestellt. Für die Amplifikation des *mppP* Gens aus der chromosomalen DNA von *S. hygroscopicus* mittels PCR wurden synthetische Oligonukleotide verwendet (Tabelle 2.3). Das Genfragment (906 bp) wurde anschließend mit den in Tabelle 2.3 aufgelisteten Restriktionsendonukleasen geschnitten und in die korrespondierenden Restriktionsschnittstellen des pCB28a(+)-Vektors ligiert.

Konstruktion von pCB28a(+)[mppQ]:

Das *mppQ* Gen wurde von Dr. Christoph Mahlert (Bayer, Deutschland) aus der chromosomalen DNA von *S. hygroscopicus* mit den in Tabelle 2.3 dargestellten Primern amplifiziert (1272 bp). Nach Restriktionsverdau mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (Tabelle 2.3) wurde das Amplifikat in den pCB28a(+)-Vektor ligiert.

Konstruktion von pET151/D-TOPO[mppA-PCP₃]:

Das *mppA-PCP₃* Genfragment codiert für die dritte PCP-Domäne der Mannopectimycin-Synthetase MppA. Dieses Genfragment (285 bp) wurde mit den in Tabelle 2.3 gezeigten Primern aus der chromosomalen DNA von *S. hygroscopicus* mittels PCR amplifiziert und unter Verwendung des „Champion pET151 Directional TOPO Expression Kits“ (Invitrogen) nach Herstellerangaben direkt in den pET151/D-TOPO-Vektor ligiert.

Konstruktion von pCB28a(+)[ilvE]:

Das *ilvE* Gen (1089 bp) wurde von Dr. Christoph Mahlert (Bayer, Deutschland) aus der chromosomalen DNA von *S. coelicolor* A3(2) mit den in Tabelle 2.3 dargestellten Primern amplifiziert. Anschließend wurde das Amplifikat mit den in Tabelle 2.3 aufgeführten Restriktionsendonukleasen geschnitten und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des pCB28a(+)-Vektors ligiert.

3.2 Proteinchemische Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Standardtechniken der Proteinanalytik (SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der SDS-Polyacrylamid-Gele) wurden nach Laemmli^[177] und Bennett^[178] durchgeführt und werden deshalb nicht näher erläutert.

3.2.1 Genexpression

3.2.1.1 Expression unter Verwendung des pCB28a(+)-Vektors

Die Expressionen wurden durchgeführt, indem 500 mL LB-Medium in einem 2 L Kulturkolben mit 50 µg/mL Kanamycin versetzt und anschließend mit 5 mL einer Übernachtskultur des entsprechenden Produzentenstammes inokuliert wurden. Insgesamt wurden im präparativen Maßstab 5 L LB-Medium verwendet.

Für die Produktion von CchA, MppJ, MppP und MppQ wurden die Zellen anfangs bei 30 °C und 250 Upm inkubiert. Bei einer optischen Dichte von ca. 0.25 ($\lambda = 600$ nm) wurde die Temperatur schrittweise auf 18 °C reduziert und die Induktion der Überexpression mit 0.1 mM IPTG erfolgte bei einer optischen Dichte von 0.6 ($\lambda = 600$ nm). Nach weiterer Inkubation für ca. 18 h bei 18 °C wurden die Kulturen durch Zentrifugation (7 000 Upm, 15 min, 4 °C) pelletiert. Die entstandenen Pellets wurden in 50 mM HEPES, 300 mM NaCl (pH 8.0) resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Für die Produktion der rekombinanten Proteine CchB und IlvE wurden die Zellen zunächst bei 30 °C und 250 Upm bis zu einer optischen Dichte von 0.6 ($\lambda = 600$ nm) inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte entweder mit 0.1 mM IPTG (CchB) oder mit 1 mM IPTG (IlvE). Die Kulturen wurden dann weitere 4 h bei 25 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (7 000 Upm, 15 min, 4 °C). Die Pellets wurden ebenfalls in 50 mM Hepes, 300 mM NaCl (pH 8.0) resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Um das Protein VioC zu erhalten, wurden die Kulturen bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0.6 ($\lambda = 600$ nm) inkubiert und die Überexpression wurde mit 0.5 mM IPTG induziert. Nach weiterer Inkubation bei 30 °C und 250 Upm für 3 h wurden die Zellen zentrifugiert (7 000 Upm, 15 min, 4 °C) und das Pellet wurde in 50 mM Hepes, 300 mM NaCl (pH 8.0) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.1.2 Expression unter Verwendung des pET151/D-TOPO-Vektors

Auch für die präparative Expression der PCP₃ von MppA wurden 5 LB-Medium verwendet. Es wurden je 500 mL Kulturmedium in 2 L Kolben mit 100 µg/mL Ampicillin versetzt und mit je 5 mL der Übernachtskultur inokuliert. Zu Beginn des Zellwachstums wurde die Kultur bei 30 °C und 250 Upm bis zu einer optischen Dichte von 0.6 ($\lambda = 600$ nm) inkubiert. Um die Überexpression zu induzieren, wurde die Zellkultur mit 0.25 mM IPTG versetzt. Nach weiterer Inkubation bei 25 °C für 4 h erfolgte die Zentrifugation (7 000 Upm, 15 min, 4 °C) der Kulturen. Das erhaltene Zellpellet wurde in Puffer (50 mM Hepes, 300 mM NaCl (pH 8.0)) resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

3.2.1.3 Expression unter Verwendung des pBAD102/D-TOPO-Vektors

Für die Produktion von CchA aus dem pBAD102/D-TOPO-Vektor wurden insgesamt 5 L LB-Medium zu je 500 mL in 2 L Kulturkolben mit 100 µg/mL Ampicillin versetzt und mit je 5 mL einer Übernachtskultur inokuliert. Nach Inkubation bei 30 °C und 250 Upm bis zu einer optischen Dichte von ca. 0.25 ($\lambda = 600$ nm) wurde die Temperatur schrittweise auf 18 °C reduziert und die Induktion der Überexpression erfolgte bei einer optischen Dichte von 0.6 ($\lambda = 600$ nm) mit 0.005 % Arabinose. Die Kulturen wurden weitere 18 h bei 18 °C inkubiert und durch Zentrifugation bei 7 000 Upm und 4 °C für 15 min pelletiert. Das Pellet wurde in 50 mM Hepes, 300 mM NaCl (pH 8.0) resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

3.2.2 Proteinreinigung

3.2.2.1 Zellaufschluss

Die resuspendierten Zellen wurden mit Hilfe des Fluidizers EmulsiFlex-C5 (AVESTIN) aufgeschlossen. Hierzu wurde die Zellsuspension unter hohem Druck (60 000-100 000 kPa) zweimal durch die mit Eis vorgekühlte Apparatur geschleust. Die Zelltrümmer und unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (17 000 Upm, 30 min, 4 °C) abgetrennt und der klare Überstand des Zentrifugats wurde für die Affinitätschromatographie verwendet.

3.2.2.2 Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Mit Hilfe der so genannten Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen (IMAC) können rekombinante His-getagte Proteine gereinigt werden. Die Reinigung der Proteine erfolgte entweder an einer FPLC-Anlage (Amersham Biosciences) oder an einem Äkta Prime System (Amersham Biosciences) mit Ni²⁺-Nitrilotriacetat (NTA)-Superflow (Qiagen) als Säulenmaterial. Die Säule (Amersham Biosciences) wurde mit dem Zellextrakt beladen (0.7 mL/min, 3 mM Imidazol) und solange gespült, bis keine Proteine mehr im Durchfluss detektiert wurden. Hierzu wurde die Absorption mittels einer Durchflusszelle bei 280 nm verfolgt. Anschließend wurde zur Elution der His-Tag Proteine bei einer Flussrate von 1.0 mL/min ein linearer Gradient von 3-250 mM Imidazol in 30 min angelegt. Das Eluat wurde in 2.0 mL Fraktionen gesammelt und proteinhaltige Fraktionen wurden mittels qualitativem Bradford-Test^[179] identifiziert. Die Reinheit dieser Fraktionen wurde mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden abschließend vereinigt und entweder mittels Gelfiltrationschromatographie weiter gereinigt oder mittels HiTrapTM-Desalting-Säulen (Amersham Biosciences) umgepuffert (Abschnitt 3.2.2.3). Die Fraktionen der MppP-Aufreinigung wurden nicht weiter behandelt, da das Protein unlöslich war.

3.2.2.3 Gelfiltrationschromatographie und Dialyse der rekombinanten Proteine

Die Gelfiltrationschromatographie wurde in dieser Arbeit als zweiter Reinigungsschritt für die Reinigung von VioC verwendet, da die Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie kein zufriedenstellendes Ergebnis brachte. Die Fraktionierung verschiedener Proteine nach der Größe basiert hierbei auf ihrem unterschiedlichen Diffusionsverhalten in der Gel-Matrix.

Die verwendete Gelfiltrationssäule 16/60 Superdex[®] G75 prep grade (Amersham Biosciences) wurde zunächst mit zwei Säulenvolumen Puffer (25 mM Hepes, 50 mM NaCl (pH 7.0) oder 10 mM TRIS/HCl (pH 8.0)) äquilibriert. Die Proteinlösung wurde anschließend

mit einer Flussrate von 1.0 mL/min aufgetragen und die Elution erfolgte dann ebenfalls bei 1.0 mL/min. Es wurden Fraktionen in einer Größe von 2.0 mL gesammelt und die proteinhaltigen Fraktionen wurden erneut mittels Bradford-Test identifiziert. Abschließend wurden die Fraktionen mit SDS-PAGE analysiert und über Amicon Ultra-Konzentratoren (Millipore; Ausschlussgröße 5-50 MW) ankonzentriert. Die Proteinlösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Proteinlösungen von CchB, CchA, MppJ, MppQ, MppA-PCP₃ und IlvE wurden im Anschluss an die IMAC-Reinigung über HiTrapTM-Desalting-Säulen nach Herstellerangaben umgepuffert. Hierbei wurde die Proteinlösung von CchB gegen 100 mM TRIS/HCl (pH 8.0) dialysiert. Für das rekombinante Protein CchA wurde als Dialysepuffer 25 mM Hepes, 150 mM NaCl (pH 7.0) verwendet. Die gereinigten Proteine MppJ, MppQ und MppA-PCP₃ wurden mit 25 mM Hepes, 50 mM NaCl (pH 7.0) umgepuffert. Für das rekombinante Protein IlvE wurde der Dialysepuffer 50 mM Hepes (pH 7.5) verwendet. Nach Umpuffern der Lösungen wurden die proteinhaltigen Fraktionen mittels Bradford-Test ermittelt, vereinigt und über Amicon Ultra-Konzentratoren mit der passenden Ausschlussgröße ankonzentriert. Abschließend wurden auch diese Proteinlösungen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Identifikation der Proteine erfolgte neben der SDS-PAGE Analyse mittels Peptid-Massenfingerabdruck (Abschnitt 3.3.3).

3.2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm.^[180] Der hierfür benötigte Extinktionskoeffizient des jeweiligen Proteins wurde unter Verwendung des Computerprogramms Protean (DNAS^Tar) anhand der Aminosäuresequenz berechnet (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Extinktionskoeffizienten und molare Massen der in der Arbeit verwendeten Proteine.

Protein (Vektorsystem)	Berechneter Extinktionskoeffizient / [M⁻¹ · cm⁻¹]	MW / [kDa]
CchB (pCB28a(+))	36.8 · 10 ³	51.3
CchA (pCB28a(+))	50.1 · 10 ³	37.2
CchA (pBAD102/D-TOPO)	64.3 · 10 ³	52.2
VioC (pET28a(+))	47.6 · 10 ³	41.6

MppJ (pCB28a(+))	$42.3 \cdot 10^3$	38.7
MppP (pCB28a(+))	$29.6 \cdot 10^3$	33.7
MppQ (pCB28a(+))	$36.0 \cdot 10^3$	45.6
MppA-PCP ₃ (pET151/D-TOPO)	$7.0 \cdot 10^3$	13.9
IlvE (pCB28a(+))	$60.1 \cdot 10^3$	40.8

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 MALDI-MS

Die Matrix-unterstützte-Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (engl. *matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*) (MALDI-MS) ist eine analytische Methode, um die molekulare Masse eines Peptids oder Proteins im Hochvakuum zu bestimmen. Die Ionisation der Probe in der Ionenquelle wird durch den Beschuss mit einem gepulsten Laserstrahl erreicht. Eine Matrixsubstanz bestehend aus kleinen organischen Molekülen, die bei der eingestrahlten Laserwellenlänge eine hohe Absorption aufweisen, wird durch die Laserpulse in starke elektronische Anregung versetzt. Die Matrixsubstanz überträgt anschließend ihre Energie auf den kokristallisierten Analyten, wodurch dieser schonend ionisiert und desorbiert wird. Die ionisierten Analytmoleküle werden dann durch eine Elektrode in Richtung des Massenanalysators beschleunigt. Hierbei handelt es sich um so genannte Flugzeit-Analysatoren (engl. *time of flight*) (TOF), in denen die Bestimmung des Masse- zu Ladungs-Quotienten (m/z) des Analyten über eine Zeitmessung vom Start der Ionen in der Ionenquelle bis zum Erreichen des Detektors erfolgt.

Zur Probenvorbereitung wurden 1.0 μL Dihydroxy-Benzoat (DHB)-Matrixlösung (Agilent Technologies) und 1.0 μL Probe gemischt und auf einen metallischen Probenträger pipettiert. Die kokristallisierten Proben wurden mit Hilfe eines Bruker Flex III Systems (Bruker Daltonics) analysiert.

3.3.2 HPLC-MS

Zur Trennung und Charakterisierung der in dieser Arbeit beschriebenen Substrate und Produkte wurde die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (engl. *high performance liquid chromatography mass spectrometry*) (HPLC-MS) verwendet. Dabei

wurde die so genannte reversed-phase (RP) Chromatographie angewendet, die auf hydrophoben Wechselwirkungen mit einer nicht-polaren stationären Phase (Kohlenstoff oder C_{18} beschichtetes Silikagel) beruht. Die Elution der zu untersuchenden Substanzgemische erfolgte mit dem nicht-polaren Acetonitril, das mit den adsorbierten Substanzen um die nicht-kovalenten Bindungsstellen an der stationären Phase konkurriert. Die Retentionszeiten der Analyten wurden über UV-Vis-Detektion bestimmt. Zusätzlich erlaubte die Kopplung mit einem „Single-Quadrupol-Elektrospray-Ionization“ Massendetektor (ESI) die direkte massenspektrometrische Analyse der Produkte. Zur Verbesserung der Ionisierung der Analyten wurden den Laufmitteln Nonafluorpentansäure (20 mM), Trifluoressigsäure (0.1%) oder Triethylamin (2 mM) als Ionenpaarreagenzien zugesetzt. Die Experimente wurden auf einem Agilent 1100 System durchgeführt.

Für den Peptid-Massenfingerabdruck (engl. *mass fingerprint*) von tryptischen Verdauen und für die Messung kompletter Proteine wurde eine Quadrupol-Flugzeit (QTOF)-Detektion verwendet.

3.3.3 Peptid-Massenfingerabdruck

Die Identität der produzierten rekombinanten Proteine wurde mittels Peptid-Massenfingerabdruck eines tryptischen Verdaus verifiziert. Diese Arbeiten wurden in der Routineanalytik des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg an einem Nano-Spray-HPLC-QTOF-MS-Gerät durchgeführt. Die Proteine wurden abschließend durch Vergleich des Peptid-Massenfingerabdrucks mit der MASCOT Datenbank identifiziert.

3.4 Chemische Synthesen

3.4.1 Synthese von N^{δ} -Formyl-Ornithin

Die Synthese des seitenkettenformylierten Ornithinderivats wurde nach R. G. Jones durchgeführt (Abbildung 3.1).^[181]

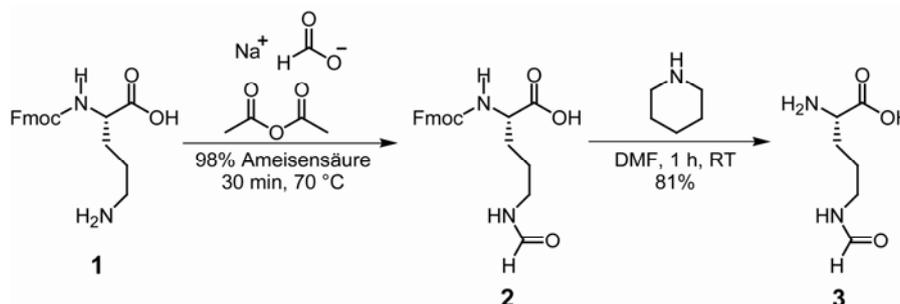


Abbildung 3.1: Synthese von N^{δ} -Formyl-Ornithin.

Stufe 1. Formylierung der Ornithin-Seitenkette.

Die N^{α} -Fmoc-geschützte Aminosäure Ornithin **1** (391 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq) wurde durch Erhitzen in 98% Ameisensäure (1.0 mL) gelöst. Nach Zugabe einer heißen Lösung von Natriumformiat (75 mg, 1.1 mmol, 1.1 eq) in 98% Ameisensäure ließ man das Gemisch abkühlen. Anschließend wurde Essigsäureanhydrid (225 μ L, 2.4 mmol, 2.4 eq) langsam zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde für 30 min auf 70 °C erhitzt. Nach Entfernung von Ameisen- und Essigsäure unter Vakuum wurde der Rückstand in Aceton (5 mL) gelöst und das Lösungsmittel wurde erneut unter reduziertem Druck entfernt.

Stufe 2. Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe.

Für die Entschützungsreaktion der formylierten Aminosäure **2** wurde diese in DMF (10 mL) gelöst. Piperidin (2.5 mL, 25 mmol, 25 eq) wurde tropfenweise bei 0 °C zugesetzt und die Lösung wurde 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter reduziertem Druck wurde der Rückstand dreimal in Toluol gelöst und jeweils wieder unter reduziertem Druck eingeengt. Das Produkt wurde mittels Druckluft-Säulenchromatographie mit Silikagel als stationäre Phase gereinigt. Als Laufmittel diente zunächst Methanol:*dd*H₂O in einem Verhältnis von 4:1. Während der Chromatographie wurde der Wasseranteil stufenweise bis auf 100% erhöht. Die Produkt enthaltenden Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie (Methanol:*dd*H₂O 4:1) identifiziert und gefriergetrocknet. Es wurden 130 mg (0.81 mmol, 81%) N^{δ} -Formyl-Ornithin **3** als gelbliches Pulver erhalten.

ESI-MS: $m/z = 161.0921$ [M+H]⁺ berechnet; $m/z = 161.0985$ [M+H]⁺ gemessen.

3.4.2 Synthese von N^δ -Hydroxy-Ornithin

Die Synthese von N^δ -hydroxyliertem Ornithin wurde nach Y.-M. Lin und M. J. Miller durchgeführt, die eine indirekte Oxidationsmethode angewandt haben.^[182]

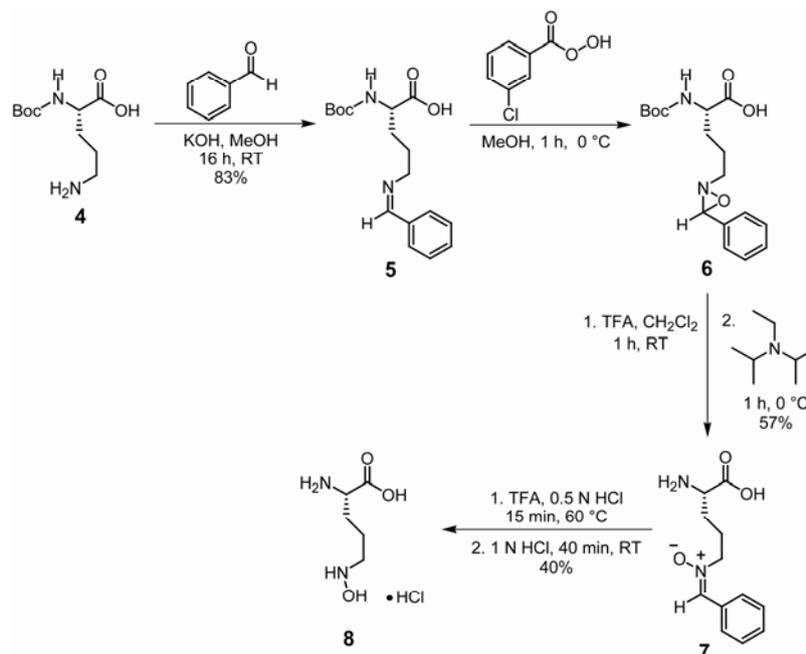


Abbildung 3.2: Synthese von N^δ -Hydroxy-Ornithin.

Stufe 1. Synthese der Imin-Zwischenstufe 5.

Zu einer Lösung von KOH (0.51 g, 9.0 mmol, 1.05 eq) in Methanol (17 mL) wurde bei Raumtemperatur die N^α -Boc-geschützte Aminosäure Ornithin **4** (2.0 g, 8.6 mmol, 1.0 eq) zugegeben. Nach Zugabe von Benzaldehyd (0.92 mL, 9.0 mmol, 1.05 eq) und 3 Å Molekularsieb wurde das Gemisch für 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abfiltrieren des Molekularsiebs wurde dieses mit Methanol gewaschen. Das Filtrat wurde unter reduziertem Druck eingedunstet, um das Imin **5** als hellgelben Schaum zu erhalten. Die Ausbeute betrug 83% (2.3 g, 7.1 mmol) und das Imin wurde ohne weitere Aufreinigung für die anschließende Synthesestufe verwendet.

ESI-MS: $m/z = 321.1814$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ berechnet; $m/z = 321.1875$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ gemessen.

Stufe 2. Oxidation des Imins 5 zu einem Oxaziridin-Rest 6.

Zu einer Lösung des Imins **5** (2.2 g, 7.0 mmol, 1.0 eq) in Methanol (13 mL) wurde bei 0 °C über einen Zeitraum von 15 min eine Lösung von *meta*-Chlorperbenzoesäure (1.2 g, 7.0 mmol, 1.0 eq) in Methanol (5 mL) zugegeben. Das Gemisch wurde 1 h bei 0 °C gerührt und entstehender Niederschlag wurde anschließend abfiltriert und mit Methanol gewaschen. Das vereinigte Filtrat wurde unter reduziertem Druck eingedunstet und der gebildete weiße

Feststoff wurde in *ddH*₂O (17 mL) und Ethylacetat (17 mL) gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mit 1 N HCl auf 2 eingestellt und nach Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und im Rotationsverdampfer eingeeengt. Das Oxaziridin **6** wurde als weißer Feststoff erhalten und direkt für die nächste Synthesestufe verwendet.

Stufe 3. Synthese der stabilen Nitron-Zwischenstufe **7**.

Das ungereinigte Oxaziridin der Vorstufe **6** wurde in Trifluoressigsäure (10 mL) gelöst. Nach Zugabe von Dichlormethan (10 mL) wurde das Reaktionsgemisch für 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Die flüchtigen Stoffe wurden anschließend unter reduziertem Druck entfernt und der Rückstand wurde in Ethylacetat (30 mL) gelöst. Mit einer THF-Lösung von Diisopropylethylamin wurde der pH-Wert des Reaktionsgemisches auf 8-9 eingestellt und die Lösung wurde für 1 h auf 0 °C gekühlt. Der daraus resultierende hellgelbe Niederschlag wurde abfiltriert und gefriergetrocknet. Anschließend wurde das Rohprodukt in *ddH*₂O gelöst (ca. 10 mL) und mittels präparativer HPLC gereinigt. Hierzu wurde eine *C*_{18ec-reversed phase}-Säule (Macherey und Nagel, 250/21, Porenweite = 100 Å, Partikelgröße = 5 µm) mit dem Laufmittel A = *ddH*₂O (0.1% TFA) und dem Laufmittel B = Acetonitril (0.1% TFA) verwendet. Der folgende Gradient wurde angelegt: 0% B für 5 min, 0-30% B in 30 min und 30-95% B in 3 min mit einer Flussrate von 20 mL/min. Das verwendete Gerät der Firma Agilent erlaubt durch einen UV-Detektor (215 nm) eine automatische Peak-Erkennung. Die so gesammelten Fraktionen wurden massenspektrometrisch identifiziert und es wurden 945 mg Nitron **7** (4.0 mmol, 57%) durch Gefriertrocknung der entsprechenden Fraktionen erhalten.

ESI-MS: $m/z = 237.1234$ [M+H]⁺ berechnet; $m/z = 237.1201$ [M+H]⁺ gemessen.

Stufe 4. Umwandlung von Nitron **7** in Hydroxylamin **8**.

Die letzte Stufe der *N*^δ-Hydroxy-Ornithin-Synthese wurde nur mit kleinen Mengen des stabilen Nitrons durchgeführt. Da das Produkt nicht sehr stabil ist, kann man bei Bedarf jederzeit frisches *N*^δ-Hydroxy-Ornithin synthetisieren, ohne die komplette Synthese wiederholen zu müssen. Es wurden 0.1 g Nitron **7** (0.4 mmol, 1.0 eq) in Hexan (0.55 mL) gelöst und mit 0.5 N HCl (1.1 mL) und TFA (0.27 mL) versetzt. Dieses Gemisch wurde unter Rückflusskühlung für 15 min auf 60 °C erhitzt. Flüchtige Komponenten wurden anschließend unter verringertem Druck entfernt und das entstandene gelbliche Öl wurde mit Dichlormethan

(1.1 mL) und 1 N HCl (1.62 mL) versetzt. Das Gemisch wurde kurz auf 40 °C erwärmt, um die Bestandteile zu lösen. Nach Rühren für 40 min bei Raumtemperatur wurde die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase wurde mit CH₂Cl₂ und Hexan extrahiert. Die wässrige Phase wurde abschließend unter Vakuum eingengt und das Produkt *N*^δ-Hydroxy-Ornithin Hydrochlorid **8** wurde mit 40% Ausbeute (30 mg, 0.16 mmol) als hellgelber Schaum erhalten.

ESI-MS: $m/z = 149.0926$ $[M+H]^+$ berechnet; $m/z = 149.1005$ $[M+H]^+$ gemessen.

3.4.3 Synthese des SNAC-aktivierten Tetrapeptids D-Orn-D-Thr-L-Orn-D-Orn

Das verzweigte Tetrapeptid D-Orn-D-Thr-L-Orn-D-Orn wurde als Analogon des Naturstoffes Coelichelin für die Untersuchung der Substratspezifität der NADPH-abhängigen Monooxygenase CchB benötigt. Dieses Produkt wurde mittels manueller Kupplungsschritte und mit Hilfe der Fmoc-basierten Peptidfestphasensynthese an einem automatisierten Peptid-Synthetisierer (Advanced ChemTech APEX396) hergestellt (Abb. 3.3).

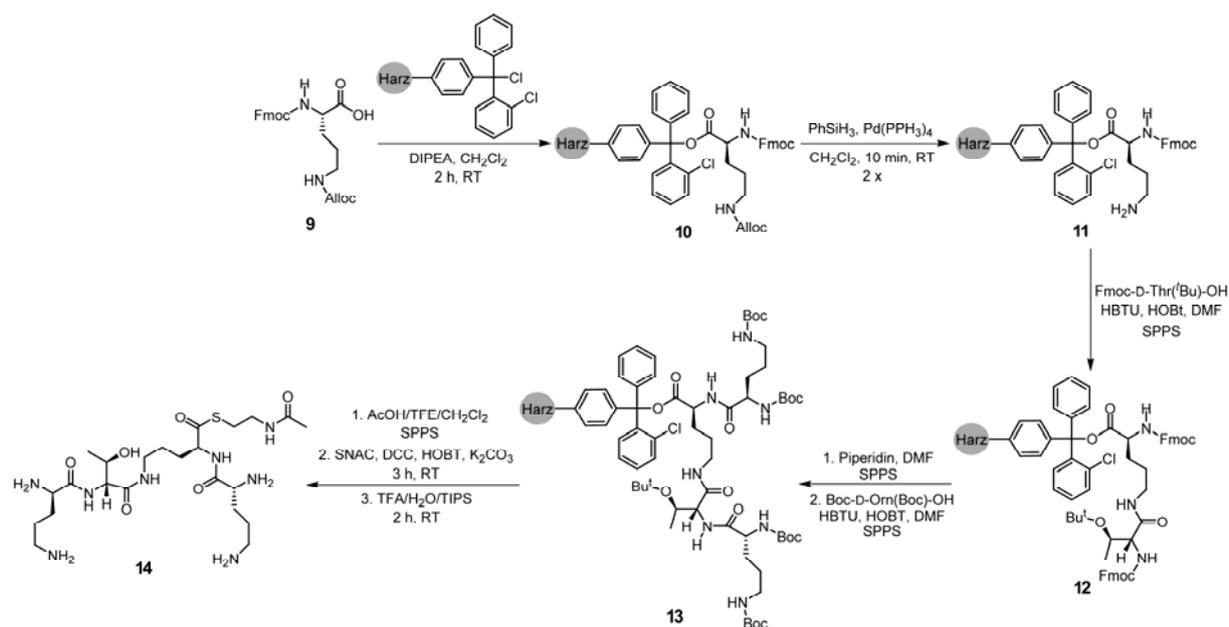


Abbildung 3.3: Synthese des SNAC-aktivierten unmodifizierten Tetrapeptids D-Orn-D-Thr-L-Orn-D-Orn.

Stufe 1. Kupplung Fmoc-Orn(Alloc)-OH an Harz.

380 mg des 2-Chlorotritylchloridharzes wurden in einer Fritte 2-3x mit Dichlormethan gewaschen und anschließend für 15 min quellen gelassen. In einem Rundkolben wurden dann das Harz, Fmoc-Orn(Alloc)-OH (438.5 mg, 1.0 mmol, 1.0 eq) und *N,N*-Diisopropylethylamin (DIPEA) (695 μ L, 4.0 mmol, 4.0 eq) mit 10 mL CH₂Cl₂ versetzt und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Waschen des Harzes mit Dimethylformamid (5 mL, 5 x) wurde dieses bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Stufe 2. Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe.

Die Alloc-Schutzgruppe wurde von der Ornithin-Seitenkette nach einer Vorschrift von N. Thieriet *et al.* durchgeführt.^[183]

Die an das Harz gekuppelte Aminosäure **10** wurde in einer Fritte 5 x mit CH₂Cl₂ gewaschen und anschließend unter Argon mit 5 mL Dichlormethan versetzt. Nach Zugabe von Phenylsilan (1.3 g, 12 mmol) und dem Katalysator Tetrakis(triphenylphosphan)-Palladium (57.8 mg, 0.05 mmol) wurde das Reaktionsgemisch 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Harz wurde dann mit CH₂Cl₂ (5 mL, 3 x) gewaschen und die Reaktion wurde erneut durchgeführt, um eine quantitative Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe zu gewährleisten.

Für die Analytik wurde eine kleine Menge der Seitenketten-entschützten Aminosäure mittels Zugabe von TFA vom Harz abgespalten und mit ESI-MS analysiert.

ESI-MS: $m/z = 355.1652$ [M+H]⁺ berechnet; $m/z = 355.1591$ [M+H]⁺ gemessen.

Stufe 3. Peptidfestphasensynthese und Abspaltung vom Harz.

Die weiteren Kupplungsschritte wurden nun mit Peptidfestphasensynthese (engl. *solid phase peptide synthesis*, SPPS) durchgeführt, die 1963 von R. B. Merrifield eingeführt wurde.^[184]

Allerdings wurde in diesem Ansatz die mildere Methode der so genannten Fmoc-basierten Peptidfestphasensynthese verwendet.

Entgegen der üblichen Kupplung am N-Terminus findet bei der Synthese des verzweigten Tetrapeptids der Kupplungsschritt zwischen dem Substrat **11** und der Aminosäure Fmoc-D-Thr(^tBu)-OH an der Seitenkette von Ornithin statt. Die Peptidfestphasensynthese wurde in einem Ansatz von 1.0 mmol mit den Aktivierungsreagenzien HBTU und HOBt durchgeführt. Nach erfolgter Kupplung wurden die N^α-Fmoc-Gruppen von Ornithin und Threonin mit Piperidin abgespalten und es erfolgte ein Doppelkupplungsschritt mit Boc-D-Orn(Boc)-OH. Abschließend wurde das geschützte Tetrapeptid **13** vom säurelabilen 2-Chlorotrylchlorid-Linker durch Zugabe eines Essigsäure/Trifluorethanol/CH₂Cl₂ (1:2:7)-Gemisches abgespalten. Unter diesen nur leicht sauren Bedingungen erfolgt zwar die Abspaltung vom Harz, jedoch nicht die Entschützung. Das Peptid wurde dann durch dreifache Ausfällung in Hexan und Verdampfung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer gereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Stufe 4. Peptidyl-SNAC-Synthese und vollständige Entschützung des aktivierten Peptids.

Die Aktivierung des Tetrapeptids (1.0 mmol) am C-Terminus erfolgte mit N-Acetylcysteamin (1.0 mL, 10 mmol, 10 eq) in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid (413 mg, 2.0 mmol,

2.0 eq) und 1-Hydroxybenzotriazol (306 mg, 2.0 mmol, 2.0 eq). Das Gemisch wurde in 20 mL Dichlormethan für 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach 30 min wurde dem Reaktionsansatz Kaliumcarbonat (276 mg, 2.0 mmol, 2.0 eq) zugefügt. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter reduziertem Druck wurde der geschützte Peptidylthioester für 2 h mit einem TFA:ddH₂O:Triisopropylsilan (TIPS) (95:2.5:2.5)-Gemisch (3 mL) bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde der entschützte Thioester **14** mit 30 mL eiskaltem Diethylether ausgefällt. Nach Zentrifugation (10 min, 4000 Upm, 4 °C) wurde der Überstand abdekantiert und der verbleibende Feststoff in 2 mL Wasser gelöst. Der Peptidylthioester wurde mittels präparativer HPLC mit einer C₁₈ec-reversed phase-Nucleodur-Säule (Macherey und Nagel, 250/21, Porenweite = 100 Å, Partikelgröße = 5 µm) aufgereinigt. Hierzu wurde ein linearer Wasser (0.1% TFA)/Acetonitril (0.1% TFA)-Gradient mit einer Flussrate von 20 mL/min verwendet. Die gesammelten Fraktionen wurden massenspektrometrisch untersucht und die Tetrapeptid-enthaltenden Fraktionen wurden gefriergetrocknet. Es wurden 200 mg (0.36 mmol, 36%) des SNAC-aktivierten Tetrapeptids **14** als weißer Feststoff erhalten.

ESI-MS: $m/z = 563.3334$ [M+H]⁺ berechnet; $m/z = 563.3415$ [M+H]⁺ gemessen.

3.4.4 Synthese eines Coenzym A-Phenylalanin-Thioesters

Bei der Synthese des CoA-Substrates wurde der C-Terminus von Phenylalanin mit Hilfe von PyBOP aktiviert. Der gebildete Aktivester kann im zweiten Reaktionsschritt von der durch zugesetzte Base deprotonierten Thiolgruppe des Coenzym A nukleophil angegriffen werden. Abschließend wurde die N^α-Boc-Schutzgruppe abgespalten (Abbildung 3.4).^[32,185] Dieses aktivierte Phenylalanin-CoA-Substrat kann direkt auf eine apo PCP-Domäne übertragen werden.

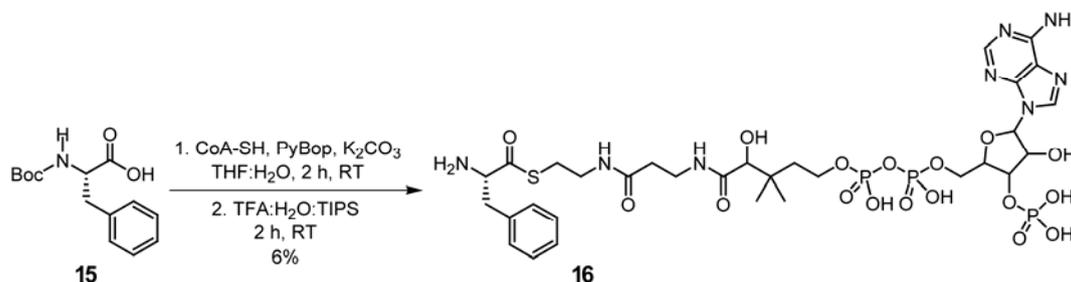


Abbildung 3.4: Synthese von Coenzym A-Phenylalanin.

Stufe 1. Kupplung von Phenylalanin und Coenzym A.

Boc-Phe-OH **15** (13.3 mg, 0.05 mmol, 1.0 eq) wurde mit CoA-SH (41.1 mg, 0.05 mmol, 1.0 eq), PyBOP (39.0 mg, 0.075 mmol, 1.5 eq) und Kaliumcarbonat (34.6 mg, 0.25 mmol,

5.0 eq) in einem THF:*ddH*₂O (1:1)-Gemisch (1.75 mL) gelöst und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend in flüssigem Stickstoff gefroren und gefriergetrocknet, um die Lösungsmittel zu entfernen.

Stufe 2. Abspaltung der Boc-Schutzgruppe.

Der geschützte Thioester wurde zur Entschützung 2 h bei Raumtemperatur in einem TFA:*ddH*₂O:TIPS (95:2.5:2.5)-Gemisch (2 mL) gerührt und dann erneut gefriergetrocknet. Der verbleibende Feststoff wurde in 2 mL Wasser gelöst und mittels präparativer HPLC gereinigt. Es wurde eine *C*₁₈*rec-reversed phase*-Nucleodur-Säule (Macherey und Nagel, 250/21, Porenweite = 100 Å, Partikelgröße = 3 µm) mit den Laufmitteln *ddH*₂O (0.1% TFA) und Acetonitril (0.1% TFA) verwendet. Es wurde folgender Gradient angelegt: 0-50% B in 30 min und 50-95% B in 3 min mit einer Flussrate von 18 mL/min. Die mit Hilfe eines UV-Detektors (215 nm) gesammelten Fraktionen wurden massenspektrometrisch identifiziert und nach Gefrierd Trocknung wurden 2.7 mg des CoA-Phe-Thioesters **16** (0.003 mmol, 6%) erhalten.

ESI-MS: $m/z = 928.1993$ $[M+H]^+$ berechnet; $m/z = 928.2041$ $[M+H]^+$ gemessen.

3.4.5 Synthese von (2*S*,3*S*)- und (2*S*,3*R*)-β-Methyl-Phenylalanin

Die gezeigte chemische Synthese der beiden Diastereomere (2*S*,3*S*)- und (2*S*,3*R*)-β-Methyl-Phenylalanin wurde von der Gruppe um Dr. Markus Oberthür an der Philipps-Universität Marburg entwickelt. Die Synthese wurde von Diplom-Chemiker Peter Schüler aus der Gruppe von Dr. Markus Oberthür durchgeführt und wird deshalb hier nur kurz beschrieben (Abb. 3.5).

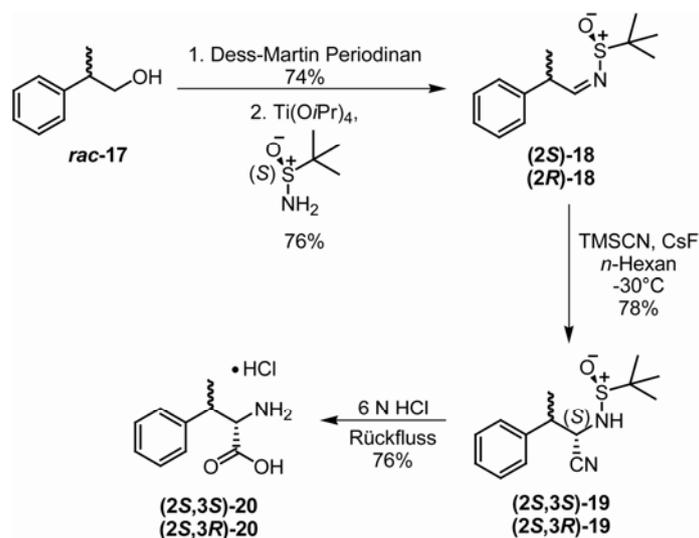


Abbildung 3.5: Chemische Synthese von (2*S*,3*S*)- und (2*S*,3*R*)-β-Methyl-Phenylalanin mittels asymmetrischer Strecker-Reaktion.

Die Synthese wurde mit Hilfe der asymmetrischen Version der Strecker-Reaktion durchgeführt.^[186] Die stereoselektive Addition von Cyanid an enantiomerenreine *tert*-Butansulfinimine wurde schon erfolgreich für zahlreiche Substrate angewendet.^[187-190]

Zunächst wurde ein racemisches Gemisch von 2-Phenyl-1-propanol **17** mit dem Reagenz Dess-Martin Periodinan oxidiert, um das racemische Gemisch des korrespondierenden Aldehyds zu erhalten. Die anschließende Titan(IV)-katalysierte Kondensation dieses Aldehyds mit einem Äquivalent von (*S*)-*tert*-Butansulfinamid liefert die Sulfinimine (**2S**)-**18** und (**2R**)-**18** mit guten Ausbeuten. Für die folgende asymmetrische Strecker-Reaktion wurde ein Gemisch von Trimethylsilylcyanid und Cäsiumfluorid bei -30 °C verwendet. Als Produkt dieser Reaktion wurde ein Gemisch der beiden Diastereomere (**2S,3S**)-**19** und (**2S,3R**)-**19** mit einem Verhältnis von 1:1 erhalten. Die Addition der Cyanidgruppe hat also stereospezifisch stattgefunden. Aufgrund von ähnlichen R_f -Werten der Diastereomere in verschiedenen Lösungsmittel-Gemischen war die Trennung der Produkte über Druckluft-Säulenchromatographie schwierig. Allerdings konnten kleine Mengen reiner Diastereomere erhalten werden. Nach Kristallisation aus einem Petrolether/THF-Gemisch konnte die Gruppe um Dr. Markus Oberthür Kristallstrukturen der beiden Diastereomere erhalten, die die absolute Stereochemie des neu entstandenen Stereozentrums belegen (Abb. 3.6).

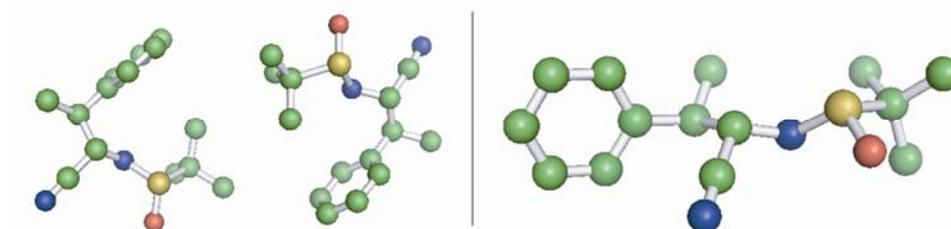


Abbildung 3.6: Kristallstrukturen der (**2S,3S**)-**19** (links) und (**2S,3R**)-**19** (rechts) Diastereomere nach der Strecker-Addition von Cyanid. Kohlenstoffatome sind grün dargestellt, Stickstoff- und Schwefelatome sind in blau bzw. gelb gezeigt und Sauerstoffatome sind rot dargestellt.

Im letzten Schritt wurde jedes Diastereomer in 6 N HCl gekocht, um die Nitrilhydrolyse durchzuführen. Gleichzeitig wurden damit auch die Sulfinamide gespalten und man erhielt die beiden gewünschten Me-Phe Diastereomere (**2S,3S**)-**20** und (**2S,3R**)-**20**, die als Referenzproben für die enzymatisch hergestellten Methyl-Phenylalanin Diastereomere verwendet wurden.

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 CchB-katalysierter Hydroxylierungsassay

Die Monooxygenase CchB katalysiert NADPH- und FAD-abhängig die Hydroxylierung der δ -Aminogruppe von L-Ornithin.

In einem typischen Reaktionsansatz wurden 5 μM rekombinante Monooxygenase CchB mit L-Ornithin (1 mM), dem Kosubstrat NADPH (2 mM) und dem Kofaktor FAD (20 μM) in 100 mM TRIS/HCl Puffer (pH 8.0) für 12 h bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von TFA (1.3% (v/v) Endkonzentration) gestoppt. Kontrollreaktionen wurden ohne das rekombinante Enzym durchgeführt. Die Assays wurden mittels RP-HPLC-ESI-MS (Agilent 1100 MSD) mit einer Hypercarb-Säule (Thermo Electron Corporation, Porenweite = 250 Å, Partikelgröße = 5 μm , 100% Kohlenstoff) analysiert. Hierzu wurden folgende Laufmittel verwendet: 20 mM wässrige Nonafluorpentansäure (NFPA) (A) und Acetonitril (B). Der angelegte Gradient lautete: 0-15% B in 15 min, 15-30% B in 10 min und 30-100% B in 3 min mit einer Flussrate von 0.2 mL/min bei 20 °C. Die Assays wurden im positiven Single-Ion Modus analysiert, in dem ausschließlich nach den Massen der Substrate und erwarteten Produkte gescreent wird.

Um die Substratspezifität von CchB zu untersuchen, wurde der beschriebene Assay mit unterschiedlichen Aminosäuren oder dem SNAC-aktivierten Tetrapeptid als Substrate und einer Inkubationszeit von 5 h durchgeführt. Allerdings wurde der Reaktionsansatz mit Tetrapeptid als möglichem Substrat mittels RP-HPLC-ESI-MS mit einer $C_{18\text{ec}}$ -Nucleodur-Säule (Macherey und Nagel, 250/2, Porenweite = 100 Å, Partikelgröße = 3 μm) mit den Laufmitteln Wasser (0.1% TFA) und Acetonitril (0.1% TFA) analysiert. Es wurde folgender Gradient verwendet: 5% B für 5 min, 5-40% B in 25 min und 40-95% B in 1 min mit einer Flussrate von 0.2 mL/min bei 45 °C.

Die Assays zur Bestimmung der kinetischen Parameter von CchB wurden wie oben beschrieben durchgeführt, allerdings wurde die L-Ornithin-Konzentration zwischen 1.0 mM und 18 mM variiert. Die kinetischen Assays wurden an einem Ultrospec 3100 pro Spektrophotometer (Amersham Biosciences) analysiert, indem die Enzymaktivität anhand der NADPH-Absorptionsabnahme bei 340 nm ($\epsilon_{340} = 6300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) berechnet wurde. Aus den Anfangsgeschwindigkeiten wurden die kinetischen Parameter mit dem ENZYME KINETICS MODUL des Programms SIGMA PLOT 8.0 berechnet.

Die pH-Abhängigkeit der CchB-Aktivität wurde ebenfalls spektrophotometrisch mit der Standard-Reaktionszusammensetzung in einem pH-Bereich von 6.0 bis 9.5 bestimmt.

Wasserstoffperoxid wurde mit einem Enzym-gekoppelten Assay detektiert, wo die Oxidation von ABTS bei 725 nm in Gegenwart der Meerrettich-Peroxidase verfolgt wurde. Der Reaktionsansatz enthielt NADPH (300 μM), FAD (10 μM), CchB (5 μM) und L-Ornithin (0-3 mM) in einem 100 mM TRIS/HCl Puffer (pH 8.0) mit einem Gesamtvolumen von 100 μL . Nach vollständiger NADPH-Oxidation (10 min), wurde 2 N HCL (2 μL) zugegeben, um einen pH von 2.0 zu erreichen und die Reaktion zu stoppen. Anschließend wurde die Lösung mit TRIS/HCl-Puffer (725 μL) verdünnt und 150 μL ABTS (0.2 mg/mL) wurden zugegeben. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 25 μL Meerrettich-Peroxidase (1.0 mg/mL) gestartet und die Absorptionsänderung durch oxidiertes ABTS wurde bei 725 nm beobachtet ($\epsilon = 14\,200\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

3.5.2 CchA-katalysierter Formylierungsassay

Es wurde postuliert, dass die Formyltransferase CchA die δ -Aminogruppe von L-Ornithin formyliert. Hierbei kommen als Formylgruppendonator zwei Kosubstrate in Frage: N^5 -Formyltetrahydrofolat (N^5 -fH₄F) oder N^{10} -Formyltetrahydrofolat (N^{10} -fH₄F). Das stabilere Kosubstrat N^5 -fH₄F ist kommerziell erhältlich, doch N^{10} -fH₄F ist instabil und muss für die Reaktion *in situ* generiert werden. Hierfür existieren zwei unterschiedliche Reaktionswege. Zum einen wurde Tetrahydrofolat (1 mM) mit NAD⁺ (80 mM), Formaldehyd (1.5 mM) und dem rekombinanten Enzym FOLD aus *Methanosarcina barkeri* (1 μM) (zur Verfügung gestellt von Dr. Georg Schönafinger) in 25 mM Hepes, 50 mM NaCl (pH 7.0) für 20 min bei 25 °C inkubiert.^[191] Die Zunahme der NADH-Konzentration während der Reaktion wurde spektrophotometrisch bei 340 nm verfolgt und die Konzentration des gebildeten N^{10} -Formyltetrahydrofolats konnte mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von NADH ($\epsilon_{340} = 6\,300\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)^[191] berechnet werden, da pro gebildetem N^{10} -fH₄F-Molekül ein Molekül NADH entsteht.

Zum anderen kann Tetrahydrofolat (1 mM) mit Hilfe der rekombinanten Formyltetrahydrofolat Synthetase (FTHFS) aus *Clostridium thermoaceticum* (5 μM) (zur Verfügung gestellt von Dr. Carl Balibar, Novartis Institutes for BioMedical Research, Massachusetts, USA) in Gegenwart von Ammoniumformiat (20 mM), Magnesiumchlorid (20 mM) und ATP (20 mM) zu N^{10} -Formyltetrahydrofolat konvertiert werden.^[192,193] Die Reaktion wurde für 10 min bei 50 °C in einem 100 mM TRIS/HCl Puffer (pH 8.0) mit β -Mercaptoethanol (150 mM) als Protein-stabilisierendem Reagenz durchgeführt. Durch Zugabe von 0.5 N HCl (doppeltes Reaktionsvolumen) wurde die Reaktion abgestoppt. Hierdurch wurde das gebildete N^{10} -fH₄F in 5,10-Methenyltetrahydrofolat umgewandelt,

dessen Absorption bei 350 nm gemessen werden konnte. Mit dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{350} = 24\,900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [194] wurde die theoretische Konzentration von N^{10} -Formyltetrahydrofolat berechnet.

Um nun die Formylierungsaktivität von CchA zu testen, wurden verschiedene Aminosäure-Substrate (200 μM) mit *in situ* generiertem Kosubstrat N^{10} -fH₄F (75 μM) oder kommerziell erhältlichem N^5 -fH₄F (75 μM) und der rekombinanten Formyltransferase CchA (5 μM) in 100 mM TRIS/HCl Puffer (pH 8.0) für 2 h bei 25 °C inkubiert. Kontrollreaktionen wurden ohne das Enzym durchgeführt und die Assays wurden mittels RP-HPLC-ESI-MS mit einer Hypercarb-Säule, wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben, analysiert.

3.5.3 C_{β} -Hydroxylierungsreaktion katalysiert durch VioC

Die nicht-Häm Fe(II)- und α -Ketoglutarat (α KG)-abhängige Monooxygenase VioC überträgt eine Hydroxygruppe auf die C_{β} -Position der Aminosäure L-Arginin sowie auf einige Derivate von L-Arg.

Das rekombinante Enzym VioC (5 μM) wurde mit verschiedenen Substraten (500 μM), dem Kosubstrat α KG (1 mM) und dem Kofaktor $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ (1.0 mM) in 10 mM TRIS/HCl Puffer (pH 8.0) für 1.5 h bei 30 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von NFPA (4% (v/v) Endkonzentration) gestoppt und Kontrollreaktionen wurden ohne VioC durchgeführt. Zur Analyse der Assays wurde RP-HPLC-ESI-MS mit einer Hypercarb-Säule (Thermo Electron Corporation, Porenweite = 250 Å, Partikelgröße = 5 μm , 100% Kohlenstoff) verwendet. Mit 20 mM aq. NFPA und Acetonitril als Laufmittel wurde folgender Gradient angelegt: 0-50% B in 10 min, 50-80% B in 10 min und 80-100% B in 3 min mit einer Flussrate von 0.2 mL/min bei 20 °C. Die Assays wurden im positiven Single-Ion Modus analysiert, in dem ausschließlich nach den Massen der Substrate und erwarteten Produkte gescreent wird.

Kinetische Untersuchungen wurden durchgeführt, indem 0.25 μM VioC mit 1 mM α KG, 1 mM $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ und Substratkonzentrationen zwischen 75 μM und 8 mM in 10 mM TRIS/HCl Puffer (pH 8.0) für 30 s bei 30 °C inkubiert wurden. Die Reaktionen wurden mit NFPA (4% (v/v) Endkonzentration) abgestoppt und mittels RP-HPLC-ESI-MS wie oben beschrieben analysiert. Die anschließende Integration der Massensignale des Edukts und des Produkts lieferten relative Umwandlungswerte, woraus die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen berechnet wurden. Hiermit war es möglich, die kinetischen Parameter für VioC mit dem ENZYME KINETICS Modul des Programms SIGMA PLOT 8.0 zu berechnen. Dabei wurde vorausgesetzt, dass VioC Michaelis-Menten Verhalten aufweist.

3.5.4 MppJ-katalysierter Methylierungsassay mit α -Ketosäuren oder Aminosäuren

Die Methyltransferase MppJ katalysiert die Übertragung einer Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin (SAM) auf das C β -Kohlenstoffatom von Phenylpyruvat. Damit ist dieses Enzym in die Biosynthese von β -Methyl-Phenylalanin involviert.

Um diese Reaktion zu untersuchen, wurden 5 μ M MppJ mit unterschiedlichen Substraten (250 μ M) in der Gegenwart des Kosubstrats SAM (500 μ M) in 25 mM Hepes, 50 mM NaCl (pH 7.0) bei 25 °C für 3 h inkubiert. Kontrollreaktionen wurden entweder ohne rekombinantes Enzym oder ohne SAM durchgeführt. Die Reaktionsprodukte wurden mittels RP-HPLC-ESI-MS mit einer C_{18ec}-Nucleodur-Säule (Macherey und Nagel, 250/2, Porenweite = 100 Å, Partikelgröße = 3 μ m) und mit folgenden Laufmitteln analysiert: 2 mM Triethylamin in Wasser (A) und 2 mM Triethylamin in Acetonitril (B). Folgender Gradient wurde bei 45 °C und einer Flussrate von 0.3 mL/min angelegt: 0-5% B in 5 min, 5-17% B in 25 min und 17-95% B in 2 min. Die Assays wurden im negativen Single-Ion Modus analysiert.

Kinetische Parameter für die Methylierungsreaktion von Phenylpyruvat wurden durch Inkubation von MppJ (5 μ M) mit SAM (500 μ M) und Substratkonzentrationen zwischen 1 μ M und 2 mM in 25 mM Hepes, 50 mM NaCl (pH 7.0) bei 25 °C für 1 min und 5 min bestimmt. Durch Zugabe eines dem Reaktionsvolumen entsprechenden Volumens von Methanol wurden die Reaktionen gestoppt und bei -20 °C über Nacht inkubiert, um die Methyltransferase aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen. Nach Zentrifugation (20 min, 13 000 Upm, 4 °C) wurde der Überstand im Vakuum eingedampft und anschließend in 25 mM Hepes, 50 mM NaCl (pH 7.0) entsprechend dem vorherigen Reaktionsvolumen gelöst. Die Assays wurden dann wie oben beschrieben mittels RP-HPLC-ESI-MS analysiert und durch Integration der Massensignale des Edukts und des Produkts wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen berechnet. Die kinetischen Parameter für MppJ wurden dann unter Voraussetzung eines Michaelis-Menten-Verhaltens mit dem ENZYME KINETICS Modul des Programms SIGMA PLOT 8.0 berechnet.

3.5.5 Methylierungsassay mit MppJ und Phe-S-PCP

Um PCP-gebundenes Phenylalanin als Substrat für die Methyltransferase MppJ testen zu können, musste zunächst rekombinantes MppA-PCP₃ (200 μ M) mit synthetischem Coenzym A-Phenylalanin-Thioester (600 μ M) (Synthese siehe Abschnitt 3.4.4) und der 4'-Phosphopantethein-Transferase Sfp (10 μ M) für 30 min bei 30 °C in 25 mM Hepes, 50 mM NaCl (pH 7.0) inkubiert werden. Anschließend wurde das Phe-S-PCP Produkt (100 μ M) mit

MppJ (5 μM) und SAM (200 μM) wie oben beschrieben inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ameisensäure (1.3% (v/v) Endkonzentration) gestoppt und die Analyse des Assays erfolgte mittels RP-HPLC-ESI-MS. Hierzu wurden die Laufmittel Wasser (0.1% TFA) (A) und Acetonitril (0.1% TFA) (B) und eine C_{18} -Nucleosil-Säule (Macherey und Nagel, 250/3, Porenweite = 120 Å, Partikelgröße = 3 μm) verwendet. Der angelegte Gradient lautete: 40-57.3% B in 27 min und 57.3-95% B in 3 min mit einer Flussrate von 0.85 mL/min bei 45 °C.

3.5.6 Gekoppelter Methylierungs- und Transaminierungsassay

Nach der Methylierung von Phenylpyruvat muss noch eine Transaminierungsreaktion stattfinden, um β -Methyl-Phenylalanin zu erhalten. Diese Reaktion wird durch so genannte Aminotransferasen katalysiert. In diesem Fall wurden die Enzyme IlvE aus *Streptomyces coelicolor* und MppQ aus *Streptomyces hygroscopicus* auf ihre Transaminierungsaktivität mit β -Methyl-Phenylpyruvat als Substrat untersucht.

Hierzu wurde zunächst Phenylpyruvat wie oben beschrieben methyliert und die Reaktion wurde durch Zugabe eines Reaktionsvolumens Methanol gestoppt. Nach Inkubation über Nacht bei -20 °C wurde das Reaktionsgemisch zentrifugiert (20 min, 13 000 Upm, 4 °C) und der Überstand wurde unter Vakuum eingedampft. Der so erhaltene Feststoff wurde dann in 50 mM Hepes (pH 7.5) mit einer theoretischen Konzentration von 250 μM β -Methyl-Phenylpyruvat gelöst. Der nun folgende Transaminierungsschritt wurde durch Inkubation des β -Methyl-Phenylpyruvats mit den rekombinanten Transaminasen IlvE oder MppQ (5 μM), dem Kosubstrat L-Valin oder anderen proteinogenen Aminosäuren (8.8 mM) und dem Kofaktor PLP (1.5 mM) bei 25 °C für 3 h durchgeführt. Die Analyse der Reaktionen erfolgte wie in Abschnitt 3.5.4 beschrieben.

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter der Transaminierungsreaktion wurden variierende Konzentrationen von enzymatisch hergestelltem β -Methyl-Phenylpyruvat (10 μM – 1 mM) mit 5 μM IlvE in Gegenwart von L-Valin (8.8 mM) und PLP (1.5 mM) in 50 mM Hepes (pH 7.5) für 5 min und 7 min bei 25 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden wiederum mit Methanol abgestoppt und nach der Probenvorbereitung, wie in Abschnitt 3.5.4 beschrieben, analysiert. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte ebenfalls wie in Abschnitt 3.5.4 beschrieben.

Um die Zeitabhängigkeit der Methylierungsreaktion zu untersuchen, wurden 250 μM Phenylpyruvat mit SAM (500 μM) und rekombinantem MppJ (5 μM) in 25 mM Hepes, 50 mM NaCl (pH 7.0) bei 30 °C inkubiert. Es wurden je 20 μL Proben zu definierten Zeitpunkten

(2 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min) entnommen und mit je 20 μL MeOH abgestoppt. Nach Inkubation bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht und nachfolgender Zentrifugation (20 min, 13 000 Upm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurden die Überstände im Vakuum eingedampft. Für die folgende Transaminierungsreaktion wurden die Rückstände in 50 mM Hepes (pH 7.5) mit einer theoretischen Konzentration von je $250\text{ }\mu\text{M}$ β -Methyl-Phenylpyruvat gelöst. Nach Zugabe von L-Valin (8.8 mM), PLP (1.5 mM) und $5\text{ }\mu\text{M}$ IlvE wurden die Reaktionsansätze für 3 h bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und mittels RP-HPLC-ESI-MS analysiert (siehe Abschnitt 3.5.4).

3.5.7 Bestimmung der Konfiguration von enzymatisch hergestelltem β -Me-Phe

Um zu bestimmen, welcher RP-HPLC-ESI-MS-Peak von enzymatisch produziertem β -Methyl-Phenylalanin welches Diastereomer repräsentiert, wurde der gekoppelte Methylierungs-Transaminierungs-Assay, wie in Abschnitt 3.5.6 beschrieben, durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde wie beschrieben massenspektrometrisch analysiert und die Retentionszeiten der beiden β -Methyl-Phenylalanin-Peaks wurden mit den Retentionszeiten der chemisch synthetisierten (2*S*,3*S*)- und (2*S*,3*R*)- β -Me-Phe-Diastereomere verglichen.

3.5.8 Untersuchung der Razemisierungsempfindlichkeit von β -Methyl-Phenylpyruvat

Mit diesem Ansatz sollte die Razemisierungsempfindlichkeit des β -Methyl-Phenylpyruvat-Zwischenprodukts untersucht werden.

Es wurde chemisch synthetisiertes (2*S*,3*S*)- β -Methyl-Phenylalanin ($500\text{ }\mu\text{M}$) durch IlvE ($5\text{ }\mu\text{M}$) mit dem Aminogruppenakzeptor 3-Methyl-2-Oxobutyrat (17 mM) und dem Kofaktor PLP (3 mM) für 1 h bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ transaminiert. Das in dieser Reaktion entstehende, theoretisch enantiomerenreine (3*S*)- β -Methyl-Phenylpyruvat wurde mittels RP-HPLC gereinigt, indem die schon beschriebenen Parameter verwendet wurden und Fraktionen der entsprechenden Retentionszeit gesammelt wurden. Die kombinierten Fraktionen wurden gefriergetrocknet, mit einer theoretischen Konzentration von $500\text{ }\mu\text{M}$ (3*S*)- β -Methyl-Phenylpyruvat in 50 mM Hepes (pH 7.5) gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde ein zweiter Transaminierungsschritt durchgeführt, um das eingesetzte β -Methyl-Phenylalanin zurückzuerhalten. Hierfür wurde das enzymatisch produzierte (3*S*)- β -Methyl-Phenylpyruvat für 1 h bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit PLP (3 mM), L-Valin (17 mM) und IlvE ($5\text{ }\mu\text{M}$) inkubiert und wie beschrieben mittels RP-HPLC-ESI-MS analysiert.

3.6 Kristallographie und Strukturaufklärung

3.6.1 Kristallisation von VioC

Kristallisationsversuche wurden bei 18 °C mit der so genannten Dampfdiffusionsmethode mit sitzendem Tropfen durchgeführt. Kristalle von VioC aus *Streptomyces vinaceus*, die das Substrat L-Arginin und den Kofaktor Fe(II) enthielten, wurden in mehreren Kristallisationsbedingungen des NeXtal Anion Suite Kits (Qiagen) mit einer Proteinkonzentration von 8 mg/mL in 25 mM Hepes, 50 mM NaCl (pH 7.0) erhalten. Die besten Kristalle entstanden in 1.2 M Kalium/Natrium-Tartrat und 100 mM TRIS/HCl (pH 8.5) ohne vorherige Zugabe von L-Arginin oder Fe(II). Der Produktkomplex wurde durch Kokristallisation von rekombinantem VioC mit (2*S*,3*S*)- β -Hydroxy-Arginin erhalten. Die enzymatische Synthese dieser Substanz wurde, wie bereits beschrieben, von Prof. Dr. Michael G. Thomas (Fachbereich Bakteriologie, Universität von Wisconsin-Madison, USA) durchgeführt.^[152] In dem Kokristallisationsexperiment wurden 11 mg/mL Proteinlösung in 25 mM Hepes, 50 mM NaCl (pH 7.0) und 3 mM hArg verwendet, um mit Hilfe des NeXtal Anion Suite Kits (Qiagen) Kristalle zu erhalten. Die besten Kristalle entstanden in 1.0 M Natriumsuccinat und 100 mM TRIS/HCl (pH 8.5) und in 0.6 M Trinatriumcitrat und 100 mM Hepes (pH 7.5). Zusätzlich wurde ein Kristall von *apo* VioC erhalten. Da er starke anisotrope Streuung zeigte, wurden die Datensätze nicht komplett verfeinert.

3.6.2 Datensammlung und Strukturbestimmung

Monokline VioC-Kristalle wurden zunächst in eine so genannte Gefrierschutzlösung transferiert, die die Komponenten der jeweiligen Mutterlösung und 30% (v/v) Glycerol enthielt. Dann wurden die Kristalle in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Datensätze des Substratkomplexes wurden an der Beamline X06SA der „Swiss Light Source (SLS)“ (Villigen, Schweiz) gesammelt und die Datensätze der Produktkomplexe wurden an der Beamline ID14-4 der „European Synchrotron Radiation Facility (ESRF)“ (Grenoble, Frankreich) aufgenommen. Die Röntgenstrahlen-Daten wurden mit Hilfe des Programms XDS integriert und mit XSCALE skaliert.^[195] Die Kristallstruktur des Substratkomplexes von VioC wurde durch die MR-Methode (engl. *molecular replacement*) mit MOLREP^[196] und einem Homologie-Modell basierend auf der Struktur von *apo* AsnO (Protein Data Bank (PDB) Code: 2OG5),^[104] dessen so genannte Deckel-Region abgeschnitten wurde (Anfangs-*R*-Faktor von 0.338, Korrelationskoeffizient von 0.720 für Daten zwischen 2.8 und 20 Å), gelöst. Weitere manuelle und automatische Verfeinerungen für diesen und die anderen

Komplexe wurden mit COOT und REFMAC5 durchgeführt (siehe Tabelle 4.8).^[197,198] Zusätzlich wurde aufgrund der atomaren Auflösung der Datensätze und einer Verringerung von R_{free} um mehr als 2% die anisotrope Verfeinerung der B -Faktoren der Produktkomplexe durchgeführt. Um Abbildungen für die Einleitung, die Ergebnisse und die Diskussion zu erstellen, die strukturelle Informationen enthalten, wurde das Programm PyMol verwendet.^[198]

4. Ergebnisse

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, weisen Naturstoffe, die durch nicht-ribosomale Peptidsynthese von Bakterien produziert werden, eine große strukturelle Vielfalt auf.^[12] Diese ist unter anderem auf die große Anzahl von unterschiedlichen Bausteinen für die Biosynthese zurückzuführen. Eine wichtige Rolle bei der Generierung dieser Bausteine spielen so genannte Modifikationsenzyme, die in *trans* Aminosäuren entweder vor, während oder nach der Synthese des Peptidgerüsts des Naturstoffes modifizieren. Man findet z.B. methylierte, glycosylierte oder halogenierte Aminosäuren in diesen Naturstoffen.^[11,66,199] Außerdem wurden schon Formylierung, Acylierung oder Phosphorylierung beobachtet.^[52,68,145] Auch die Funktionalisierung von Stickstoff- oder Kohlenstoffatomen eines Bausteins mit Hydroxygruppen spielt eine wichtige Rolle für die biologische Aktivität des entsprechenden Naturstoffes.^[71,104,105,200]

Um näheren Einblick in die Funktionsweise einiger Modifikationsenzyme zu erhalten, wurde in dieser Arbeit die N^δ -Hydroxylierung von L-Ornithin katalysiert durch die NADPH- und FAD-abhängige Monooxygenase CchB biochemisch untersucht. Außerdem sollte die Formylierung der δ -Aminogruppe von Ornithin katalysiert durch die N^{10} -F₄H-abhängige Formyltransferase CchA untersucht werden. Des Weiteren wurde die Fe(II)- und α -Ketoglutarat-abhängige Monooxygenase VioC biochemisch und strukturell charakterisiert. Dieses Enzym katalysiert die C_β -Hydroxylierung von L-Arginin in der Viomycin-Biosynthese. Als drittes an der Biosynthese eines nicht-ribosomal synthetisierten Naturstoffes beteiligtes Modifikationsenzym wurde die S-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferase MppJ biochemisch untersucht. Dieses Enzym generiert C_β -methyliertes Phenylpyruvat, aus dem β -Methyl-Phenylalanin für die Mannopeptimycin-Biosynthese hergestellt wird.

4.1 Biosynthese der N^δ -modifizierten Ornithin-Bausteine aus Coelichelin

Coelichelin, ein nicht-ribosomal, iterativ synthetisiertes Tris-Hydroxamat Tetrapeptid-Siderophor, zeichnet sich durch hohe Affinität zu Fe(III) aus. Es ist daher essentiell für die Versorgung des Produzenten *Streptomyces coelicolor* mit Fe(II). Dabei wird das Eisenion über die drei Hydroxamat-Gruppen des Siderophors komplexiert. Diese Gruppen werden durch die nicht-proteinogenen Aminosäuren N^δ -Hydroxy-Ornithin und N^δ -Hydroxyformyl-

Ornithin, das zweimal in Coelichelin enthalten ist, zur Verfügung gestellt. Um nun genauere Einblicke in die Biosynthese von Hydroxamat-Siderophoren und speziell von Coelichelin erhalten zu können, muss zunächst die Biosynthese dieser nicht-ribosomalen Peptidsynthese-Bausteine verstanden werden.

Die folgenden Abschnitte beschäftigen sich mit der biochemischen Charakterisierung der zwei Modifikationsenzyme, die für die Biosynthese der N^δ -modifizierten Ornithin-Bausteine verantwortlich sein können. Die L-Ornithin- N^δ -Monooxygenase (CchB) und die L- N^δ -Hydroxy-Ornithin- N^δ -Formyltransferase (CchA) werden durch den Biosynthesegencluster von Coelichelin codiert, wobei die chemisch anspruchsvolle Hydroxylierung der δ -Aminogruppe von Ornithin durch CchB katalysiert wird.¹ Anschließend findet vermutlich eine Formylierung der Ornithin-Seitenkette katalysiert durch CchA statt.

4.1.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung von *cchB* und *cchA*

CchB und *cchA* wurden aus der chromosomalen DNA von *Streptomyces coelicolor* A3(2) amplifiziert und in die Expressionsvektoren pCB28a(+) oder pBAD102/D-TOPO kloniert (Abschnitt 3.1.3.1). Die Expression erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) (Abschnitt 3.2.1) und die rekombinanten Proteine wurden mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie als His₆-getaggte Fusionsproteine gereinigt (Abschnitt 3.2.2). Das Protein CchA wurde außerdem durch den pBAD102/D-TOPO-Vektor mit Thioredoxin fusioniert. Die konzentrierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE analysiert, mit Coomassie Blau-Färbung visualisiert (Abb. 4.1) und es wurden folgende Proteinausbeuten pro Liter Bakterienkultur erhalten: 7.5 mg für CchB, 1.5 mg für His₆-CchA und 0.5 mg für Thioredoxin-CchA-His₆.

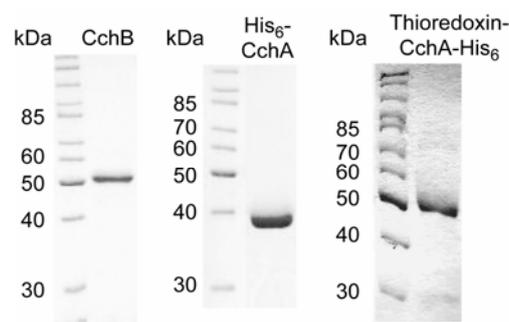


Abbildung 4.1: SDS-PAGE Analyse von gereinigtem und konzentriertem CchB (51.3 kDa), His₆-CchA (37.2 kDa) und Thioredoxin-CchA-His₆ (52.2 kDa). Als Proteinmarker diente der Fermentas PageRuler.

¹ Die biochemische Charakterisierung der Monooxygenase CchB, die in Abschnitt 4.1 beschrieben wird, wurde teilweise bereits in der Diplomarbeit von Verena Helmetag (geb. Pohlmann) mit dem Titel „Biochemische Charakterisierung von Modifikationsenzymen in der Biosynthese von Coelichelin aus *Streptomyces coelicolor*“ (Marburg 2006) veröffentlicht. Einige Inhalte von Abschnitt 4.1 sind daher redundant zu dieser Diplomarbeit. Dies war nötig, um das Verständnis der vorliegenden Arbeit zu gewährleisten und um eine vollständige Charakterisierung der Monooxygenase CchB zu präsentieren.

4.1.2 Biochemische Charakterisierung der Monooxygenase CchB

4.1.2.1 Hydroxylierungs-Aktivität von CchB

Hydroxylierung von L-Ornithin:

Sequenzvergleiche zeigen, dass diese Monooxygenase Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) als Kosubstrat und Flavinadenindinukleotid (FAD) als Kofaktor verwendet (Abschnitt 5.1.1). Außerdem wird molekularer Sauerstoff für die Katalyse benötigt. Deshalb wurde ein typischer NADPH Oxidations-Assay mit L-Ornithin als Substrat durchgeführt, um die Aktivität des rekombinanten Proteins *in vitro* zu untersuchen (Abschnitt 3.5.1). Die Analyse der Reaktionsansätze mittels RP-HPLC-ESI-MS zeigte durch CchB katalysierten quantitativen Umsatz von L-Orn zu N^{δ} -Hydroxy-Ornithin ($m/z = 149.1 [M+H]^+$ berechnet; $m/z = 149.2 [M+H]^+$ gemessen) innerhalb von 12 h (Abb. 4.2, rote Spur). Die Kontrollreaktion ohne Enzym zeigte nur das Massensignal des Substrates L-Orn ($m/z = 133.1 [M+H]^+$ berechnet; $m/z = 133.2 [M+H]^+$ gemessen) (Abb. 4.2, blaue Spur).

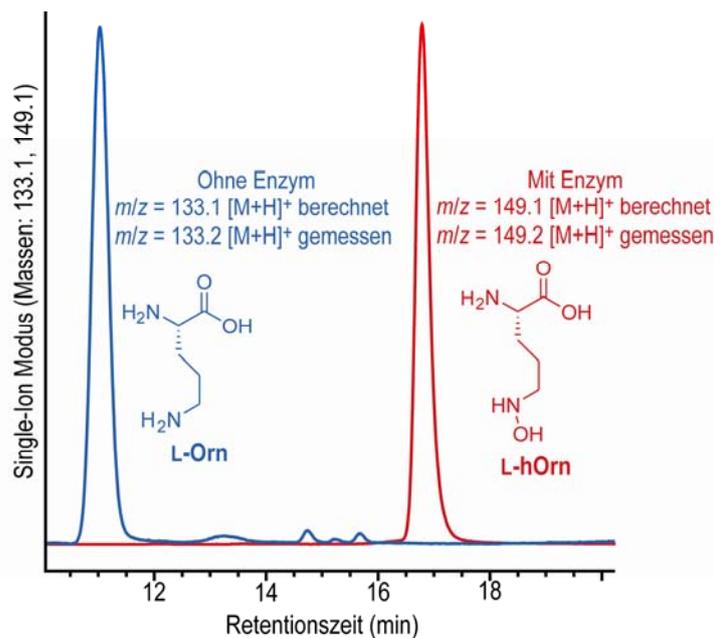


Abbildung 4.2: δ -Aminogruppen Hydroxylierung von L-Orn durch CchB. SIM-Chromatogramme der HPLC-MS Analyse (beinhaltete $[M+H]^+$ Massen: 133.1 und 149.1) des Assays ohne Enzym als Kontrollreaktion (blaue Spur) und des Aktivitätsassays (rote Spur).

Um zu validieren, dass während der enzymatischen Reaktion N^{δ} -Hydroxy-Ornithin gebildet wurde, wurde L-hOrn als Standard chemisch synthetisiert (Abschnitt 3.4.2) und mittels RP-HPLC-ESI-MS analysiert. Hierbei wurden die gleichen Parameter verwendet, die auch bei der Assay-Analyse angewendet wurden. Wie in Abbildung 4.3 zu sehen, koeluiert der chemische Standard (blaue Spur) mit einer Retentionszeit von $t_R = 16.6$ min mit dem Produkt der CchB-katalysierten Hydroxylierung von L-Orn (rote Spur, $t_R = 16.7$ min).

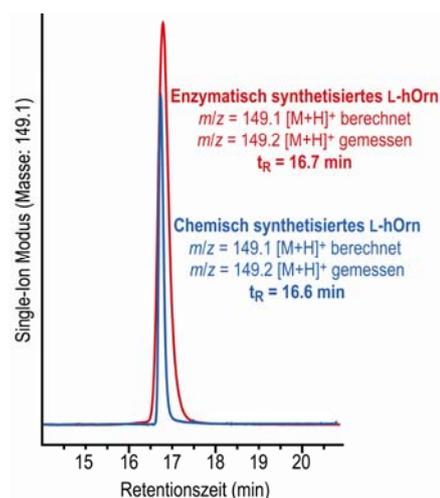


Abbildung 4.3: Retentionszeiten von chemisch (blaue Spur) und enzymatisch (rote Spur) synthetisiertem N^{δ} -Hydroxy-Ornithin. Gezeigt sind die Single-Ion Modus Chromatogramme.

Interessanterweise findet auch eine langsame NADPH-Oxidation statt, die spektrophotometrisch bei $\lambda = 340$ nm verfolgt werden kann, wenn kein L-Orn als Substrat im Reaktionsgemisch vorhanden ist. Dadurch wird FAD zu $FADH_2$ reduziert und eine Hydroperoxyflavin-Spezies wird gebildet. Diese zerfällt zu FAD und Wasserstoffperoxid.^[94] Um das gebildete H_2O_2 nachzuweisen, wurde ein gekoppelter Assay mit der Meerrettich-Peroxidase und dem Farbstoff ABTS durchgeführt, der mit entstandenem H_2O_2 zu einem stabilen Radikal reagiert, das bei 725 nm beobachtet werden kann (Abschnitt 3.5.1).^[201] Dieser Ansatz zeigte, dass tatsächlich H_2O_2 gebildet wird, wenn kein Substrat oder nur sehr geringe L-Orn-Konzentrationen (< 1 mM) im Reaktionsgemisch vorhanden sind.

Bestimmung der kinetischen Parameter:

Um die kinetischen Parameter der L-Ornithin Hydroxylierung durch CchB zu bestimmen, wurden die Startgeschwindigkeiten der Enzymreaktion bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen spektrophotometrisch bestimmt (Abschnitt 3.5.1). Die kinetischen Parameter wurden dann mit Hilfe der Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk Gleichungen sowie dem ENZYME KINETICS Modul des SIGMA PLOT 8.0 Programms bestimmt (Abb. 4.4).

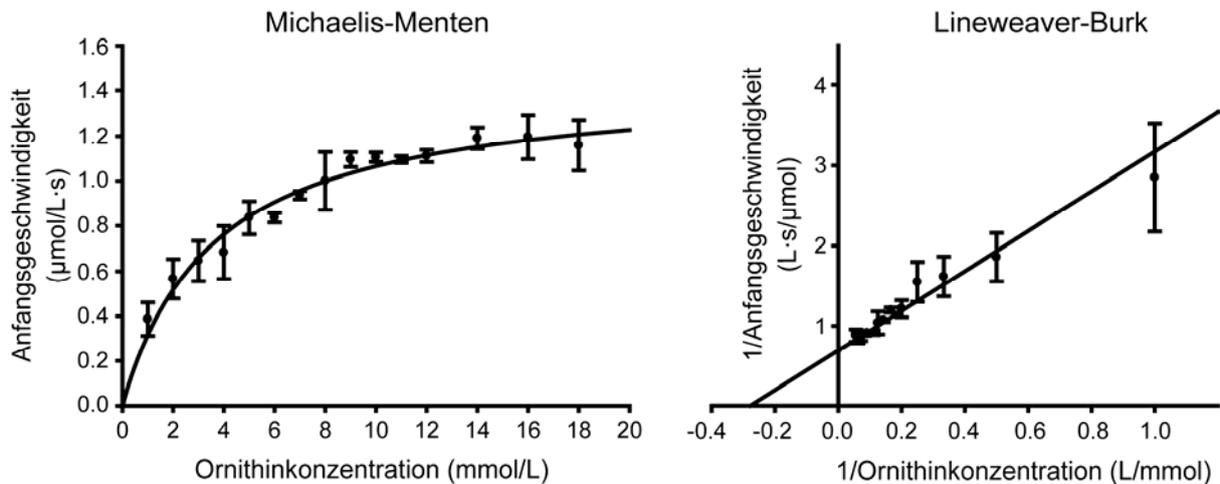


Abbildung 4.4: Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk Darstellung, um die kinetischen Parameter von CchB zu bestimmen. Die Substratkonzentration wurde für die Messungen zwischen 1 mM und 18 mM variiert und die Enzymkonzentration betrug 5 μM .

Für die Hydroxylierung von L-Orn durch CchB wurde ein beobachteter K_M -Wert von $3.6 \pm 0.58 \text{ mM}$ und ein k_{cat} -Wert von $17.4 \pm 0.87 \text{ min}^{-1}$ bestimmt. Damit ergab sich eine katalytische Effizienz für CchB von $k_{\text{cat}}/K_M = 4.83 \pm 0.64 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$.

4.1.2.2 pH-Abhängigkeit der CchB-Aktivität

Um das pH-Optimum der Hydroxylierungs-Aktivität von CchB zu bestimmen, wurde der NADPH Oxidations-Assay mit L-Ornithin als Substrat bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 6.0-9.5) durchgeführt (Abschnitt 3.5.1). Wiederum wurden die Anfangsgeschwindigkeiten spektrophotometrisch bestimmt und die höchste Aktivität von CchB wurde in einem pH-Bereich von 8.0-9.5 festgestellt (Abb. 4.5).

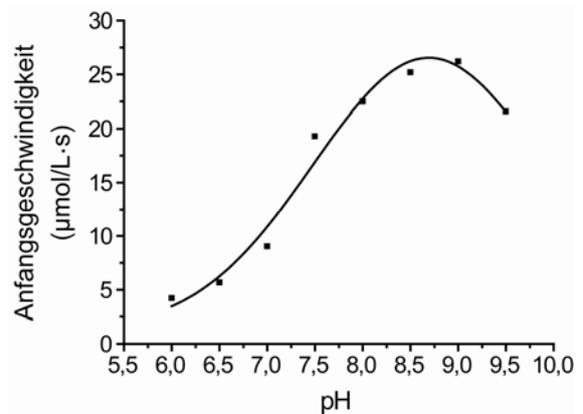


Abbildung 4.5: pH-Abhängigkeit der CchB-Aktivität.

4.1.2.3 Substratspezifität von CchB

Die Substratspezifität von CchB wurde untersucht, indem das rekombinante Protein mit verschiedenen Aminosäuren inkubiert wurde. Dabei wurden auch Vertreter unterschiedlicher Aminosäureklassen und das D-Isomer von Ornithin getestet. Außerdem wurde N^δ -Formyl-Ornithin als mögliches Substrat für CchB getestet, um zu zeigen, dass dieses Substrat nicht von CchB akzeptiert wird und die Hydroxylierung der Ornithin-Seitenkette damit den ersten Schritt in der Biosynthese der modifizierten Ornithin-Reste darstellt. Zusätzlich wurde ein

C-terminal aktiviertes Coelichelin-Analogon (Synthese siehe Abschnitt 3.4.3) getestet, um auszuschließen, dass die Hydroxylierung nach dem Aufbau des Tetrapeptid-Grundgerüsts stattfindet. Die getesteten Substrate sind in Tabelle 4.1 aufgelistet und es wird deutlich, dass CchB ausschließlich die Hydroxylierung von L-Ornithin katalysiert.

Tabelle 4.1: Bestimmung der Substratspezifität von CchB.

Substrat	m/z [M+H] ⁺ Substrat	m/z [M+H] ⁺ hydroxyliertes Produkt	m/z [M+H] ⁺ beobachtet ^a	Hydroxy- lierung
L-Ornithin	133.1	149.1	149.2	Ja
N ⁵ -Formyl-Ornithin	161.1	177.1	161.1	Nein
D-Ornithin	133.1	149.1	133.0	Nein
L-Lysin	147.1	163.1	147.2	Nein
L-Glutamat	148.0	164.0	148.1	Nein
L-Glutamin	147.1	163.1	147.1	Nein
L-Valin	118.1	134.1	118.1	Nein
SNAC-aktiviertes Tetrapeptid (D-Orn-D-Thr-L-Orn-D-Orn)	563.3	611.3	563.3	Nein

^a Mittels RP-HPLC-ESI-MS Analyse ermittelte Massen nach 5 h Inkubation von CchB mit NADPH, FAD und dem entsprechenden Substrat.

Zusätzlich wurde die Kosubstrat-Spezifität der Monooxygenase durch Inkubation mit NADH anstelle von NADPH getestet. Es konnte allerdings keine Aktivität von CchB festgestellt werden. Außerdem wurde FMN als Kofaktor eingesetzt, doch auch mit diesem Ansatz konnte keine Hydroxylierung von L-Orn detektiert werden.

4.1.3 Biochemische Charakterisierung der putativen Formyltransferase CchA

Die Sequenz der putativen Formyltransferase weist ein N¹⁰-Formyltetrahydrofolat-Bindungsmotiv auf. Daher wurde angenommen, dass dies das Kosubstrat der Formylierungsreaktion darstellt. Um die Aktivität des rekombinanten Enzyms *in vitro* zu untersuchen, wurden beide Formyltransferasenkonstrukte (His₆-CchA und Thioredoxin-CchA-His₆, siehe Abschnitt 3.1.3) zum einen mit dem kommerziell erhältlichen Kosubstrat N⁵-fH₄F und verschiedenen Aminosäuren als Substrat inkubiert und zum anderen wurde das *in situ* herzustellende Kosubstrat N¹⁰-fH₄F als Formylgruppendonator getestet (Tabelle 4.2; Abschnitt 3.5.2). Für die Synthese von N¹⁰-fH₄F stehen zwei mögliche Reaktionswege zur Verfügung. Man kann Tetrahydrofolat mit NAD⁺, Formaldehyd und dem rekombinanten

Enzym FldD inkubieren, um N^{10} -Formyltetrahydrofolat zu erhalten oder man setzt Tetrahydrofolat mit Ammoniumformiat, $MgCl_2$ und ATP in Gegenwart der Formyltetrahydrofolat Synthetase FTHFS um (Abschnitte 3.5.2 und 5.1.2). Als mögliche Akzeptoren der Formylgruppe wurden Vertreter unterschiedlicher Aminosäuregruppen gewählt (Tabelle 4.2). Außerdem wurde chemisch synthetisiertes N^δ -Hydroxy-Ornithin (Synthese siehe Abschnitt 3.4.2) als Substrat gewählt, da bereits gezeigt wurde, dass die Hydroxylierung der Ornithin-Seitenkette den ersten Schritt in der Coelichelin-Biosynthese darstellt. Die Reaktionsgemische wurden mittels RP-HPLC-ESI-MS analysiert, es konnte allerdings kein Umsatz von hOrn ($m/z = 149.1 [M+H]^+$ berechnet; $m/z = 149.2 [M+H]^+$ gemessen) zu N^δ -Hydroxyformyl-Ornithin beobachtet werden (Abb. 4.6).

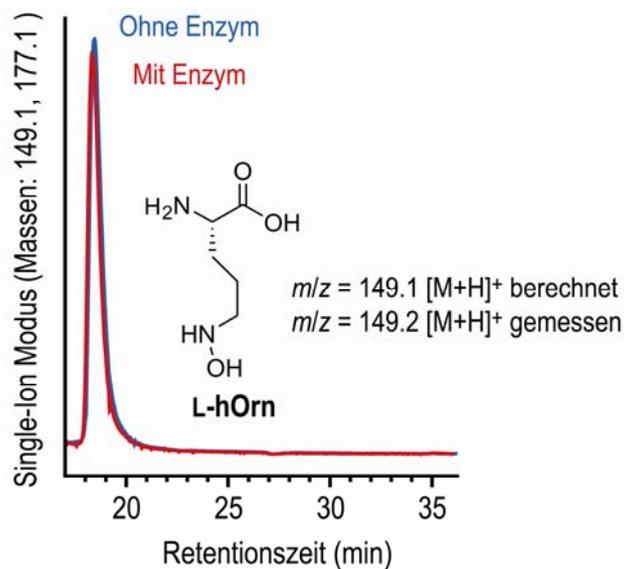


Abbildung 4.6: Aktivitätsassay der Formyltransferase CchA. SIM-Chromatogramme der HPLC-MS Analyse (beinhaltete $[M+H]^+$ Massen: 149.1 und 177.1) der Kontrollreaktion (blaue Spur) und der Reaktion von L-hOrn mit N^{10} -fH₄F und CchA bei 25 °C (rote Spur).

Auch mit den anderen getesteten Substraten konnte keine Reaktion beobachtet werden (Tabelle 4.2). Es wurde außerdem ein gekoppelter Hydroxylierungs-Formylierungsassay durchgeführt, um eventuell für die Aktivität der Formyltransferase CchA benötigte Enzym-Enzym-Interaktionen mit der Monooxygenase CchB zu ermöglichen. Hierfür wurde zunächst L-Orn, wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben, hydroxyliert und anschließend wurde direkt der Formylierungs-Assay durchgeführt. Doch auch mit diesem Ansatz konnte keine Aktivität von CchA beobachtet werden. Während der Untersuchungen konnten kein PCP-gebundenes L-Ornithin oder N^δ -Hydroxy-Ornithin als Substrate getestet werden, da die benötigte Aktivierung als Thioester mit Coenzym A (siehe Abschnitt 3.4.4 und 3.5.5) zu einer Zyklisierung der Ornithin-Seitenkette mit dem C-Terminus der Aminosäure führte (Abb. 4.7).

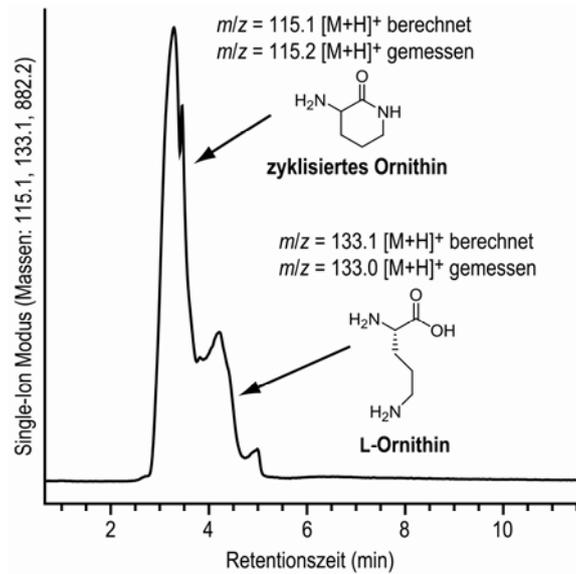


Abbildung 4.7: SIM-Chromatogramm der HPLC-MS Analyse der Orn-CoA-Synthese (beinhaltete $[M+H]^+$ Massen: 133.1 (Orn), 882.2 (Orn-CoA) und 115.1 (zyklisches Ornithin)). Das Chromatogramm wurde mit einer Nucleodur 100-3 C18ec-Säule aufgenommen und es konnte nur freies L-Ornithin und zyklisiertes Ornithin detektiert werden.

Tabelle 4.2: Getestete Substrate für die Formylierungsreaktion mit CchA.

Substrat	m/z $[M+H]^+$ Substrat	m/z $[M+H]^+$ formyliertes Produkt	m/z $[M+H]^+$ beobachtet ^a	Formylierung
L-Ornithin	133.1	161.1	133.0	Nein
N^{δ} -Hydroxy-Ornithin (chemisch synthetisiert)	149.1	177.1	149.1	Nein
N^{δ} -Hydroxy-Ornithin (enzymatisch synthetisiert)	149.1	177.1	149.2	Nein
D-Ornithin	133.1	161.1	133.1	Nein
L-Lysin	147.1	175.1	147.2	Nein
L-Glutamin	147.1	175.1	147.1	Nein
L-Glutamat	148.1	176.1	148.2	Nein
L-Valin	118.1	146.1	118.1	Nein

^a Mittels RP-HPLC-ESI-MS Analyse ermittelte Massen nach 2 h Inkubation von CchA mit N^{δ} -fH₄F oder N^{10} -fH₄F und dem entsprechenden Substrat.

4.2 Strukturelle Erklärung für die *erythro* Stereospezifität der Monooxygenase VioC

Die nicht-Häm Fe(II)-abhängige Monooxygenase VioC aus *Streptomyces vinaceus*, die zur Familie der Clavaminat Synthase (CAS)-ähnlichen Oxygenasen gehört, ist in die Biosynthese des Vorläufermoleküls (2*S*,3*R*)-Capreomycinidin involviert. Dieser Rest wird durch nicht-ribosomale Peptidsynthese in das Tuberactinomycin Antibiotikum Viomycin eingebaut und ist essentiell für die antimikrobielle Aktivität gegen *Mycobacterium tuberculosis*. Das Enzym VioC katalysiert in diesem Biosyntheseweg die Fe(II)- und α -Ketoglutarat-abhängige C _{β} -Hydroxylierung von L-Arginin, wodurch (2*S*,3*S*)- β -Hydroxy-Arginin (hArg) gebildet wird.^[152,162] Es handelt sich hierbei um das *erythro* Diastereomer von C _{β} -hydroxyliertem Arginin, obwohl für andere CAS-ähnliche Enzyme meistens nur die Bildung von *threo* Diastereomeren beobachtet wurde.^[71,103,104]

In den folgenden Abschnitten werden die Untersuchung der Substratspezifität und die Bestimmung der kinetischen Parameter von VioC dargestellt. Außerdem wurden die Kristallstrukturen von VioC als Substrat- und Produktkomplex mit einer Auflösung von 1.1 bzw. 1.3 Å erhalten. Anhand dieser strukturellen Informationen wurde die Zugehörigkeit von VioC zur Familie der CAS-ähnlichen Monooxygenasen gezeigt und ihre Substrat- und Stereospezifität erklärt.

4.2.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung von *vioC*

Das für VioC codierende Gen aus *S. vinaceus* wurde in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert (Abschnitt 3.2.1) und mittels Ni²⁺-NTA-Affinitäts- und Gelfiltrationschromatographie mit einem His₆-Tag gereinigt (Abschnitt 3.2.2). Das Protein, mit einer molekularen Masse von 41.6 kDa, wurde konzentriert und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 4.8). Pro Liter Bakterienkultur wurden 1.3 mg rekombinantes VioC erhalten.

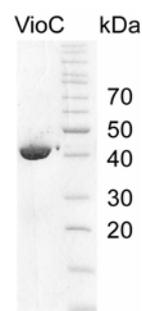


Abbildung 4.8: SDS-PAGE Analyse von gereinigtem und konzentriertem VioC (41.6 kDa). Als Proteinmarker diente der Fermentas PageRuler.

4.2.2 Substratspezifität und kinetische Parameter von VioC

Untersuchung der Substratspezifität:

Wie bereits erwähnt wurde die C_β-Hydroxylierungsaktivität von VioC bereits durch Inkubation des rekombinanten Enzyms mit L-Arginin, FeSO₄ und αKG gezeigt.^[152] Außerdem wurde auch die Stereochemie dieser Hydroxylierungs-Reaktion mittels NMR Analyse des Produktes und durch Vergleich der Retentionszeiten des Produktes und synthetischer Standards mittels RP-HPLC untersucht.^[152,162] Zusätzlich wurde bereits die Aktivität von VioC mit den beiden alternativen Substraten D-Arginin und N^G-Methyl-L-Arginin getestet. Allerdings konnte dabei keine Hydroxylierung durch RP-HPLC Analyse beobachtet werden.^[162]

Um die Substratspezifität der Monooxygenase VioC detaillierter beschreiben zu können, wurde das Enzym in dieser Untersuchung mit einigen L-Arginin Derivaten und mit Aminosäuren unterschiedlicher Klassen inkubiert (Tabelle 4.3). Als Kosubstrat wurde αKG verwendet und der Kofaktor Fe(II) wurde durch (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ zur Verfügung gestellt (Abschnitt 3.5.3). Die Analyse der Reaktionsansätze mittels RP-HPLC-ESI-MS zeigte zum einen die Fähigkeit von VioC L-Arg ($m/z = 175.1 [M+H]^+$ berechnet; $m/z = 175.1 [M+H]^+$ gemessen) nahezu quantitativ zu hydroxylieren ($m/z = 191.1 [M+H]^+$ berechnet; $m/z = 191.2 [M+H]^+$ gemessen) (Abb. 4.9 (A), rote Spur). Zum anderen wurde deutlich, dass die Arginin-Derivate L-Homoarginin und L-Canavanin als Substrate akzeptiert wurden und dass Hydroxylierung stattfindet (Abb. 4.9 (B) und (C), jeweils rote Spur; Tabelle 4.3). Kontrollreaktionen ohne VioC zeigen nur das Massensignal des jeweiligen Substrates (Abb. 4.9, jeweils blaue Spur).

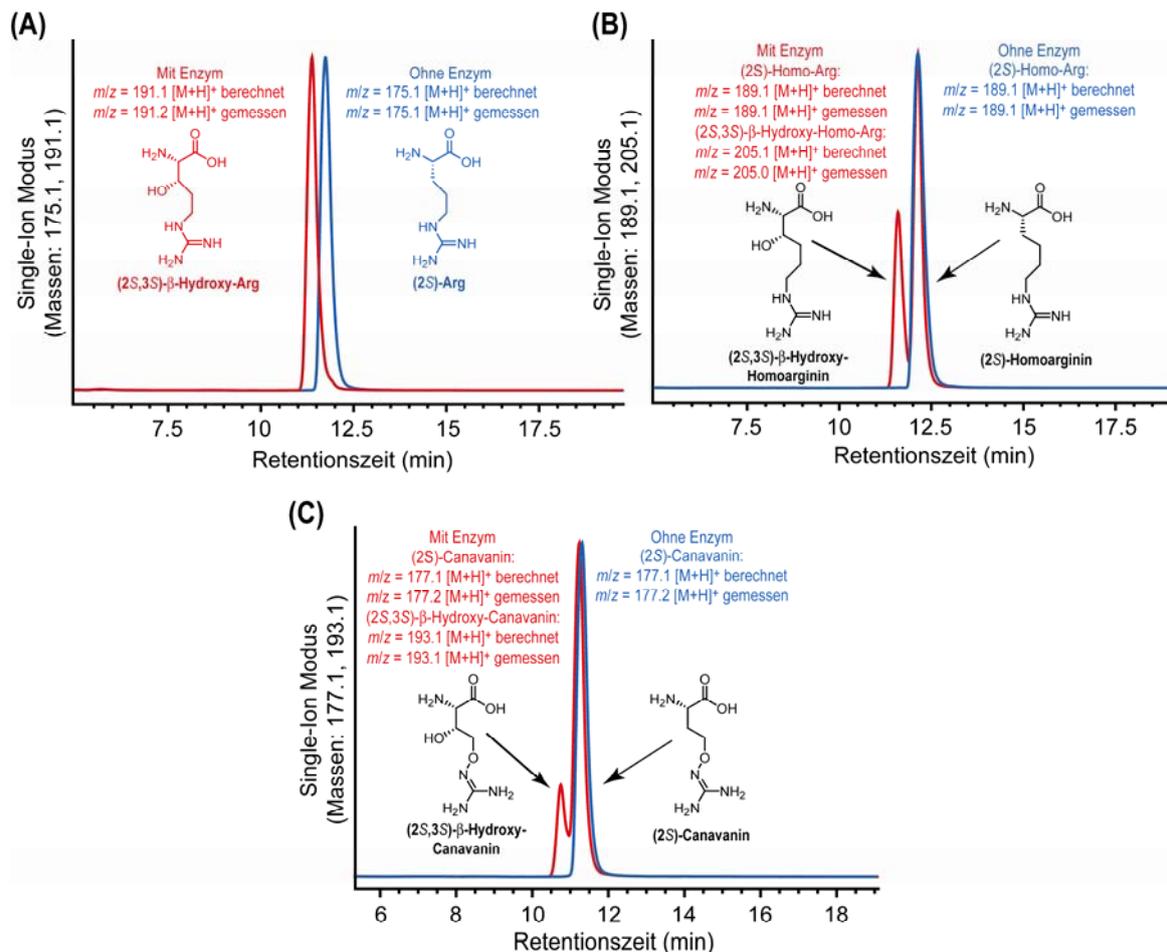


Abbildung 4.9: Substratspezifität von VioC. (A) C_{β} -Hydroxylierung von L-Arg. SIM-Chromatogramme der HPLC-MS Analyse ($[M+H]^+$ Massen: 175.1 und 191.1) des Assays ohne Enzym als Kontrolle (blaue Spur) und des Aktivitätsassays (rote Spur). (B) Hydroxylierung von L-Homo-Arg. SIM-Chromatogramme des Assays ohne Enzym (blaue Spur) und des Assays mit VioC (rote Spur). (C) C_{β} -Hydroxylierung von L-Canavanin. SIM-Chromatogramme (beinhaltete $[M+H]^+$ Massen: 177.1 und 193.1) des Assays ohne Enzym als Kontrolle (blaue Spur) und des Assays mit Monoxygenase (rote Spur).

Das Enzym akzeptiert einige Substrate mit einer leicht modifizierten Arginin-Seitenkette, aber das Arginin-Derivat N^G -Hydroxy-Nor-L-Arginin wurde nicht hydroxyliert (Tabelle 4.3). Außerdem wurde keine andere getestete Aminosäure durch VioC hydroxyliert (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Bestimmung der Substratspezifität von VioC. Folgende L-Aminosäuren wurden als mögliche Substrate getestet: Gln, Phe, Leu, Ile, Trp, Lys, Orn und Asp.

Substrat	m/z [M+H] ⁺ Substrat	m/z [M+H] ⁺ hydroxyliertes Produkt	m/z [M+H] ⁺ beobachtet ^a	Hydroxy- lierung
L-Arginin	175.1	191.1	191.2	Ja
D-Arginin	175.1	191.1	175.1	Nein
L-Homoarginin	189.1	205.1	205.0	Ja
L-Canavanin	177.1	193.1	193.1	Ja
N ^G -Hydroxy-Nor-L-Arginin	177.1	193.1	177.2	Nein
N ^G -Methyl-L-Arginin	189.1	205.1	189.0	Nein

^a Mittels RP-HPLC-ESI-MS Analyse ermittelte Massen nach 1.5 h Inkubation von VioC mit Fe(II), α KG und dem entsprechenden Substrat.

Bestimmung der kinetischen Parameter:

Um die kinetischen Parameter für die Hydroxylierung von L-Arg und zwei L-Arg-Derivaten durch VioC zu bestimmen, wurden die Reaktionen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen durchgeführt. Nach der RP-HPLC-ESI-MS Analyse wurden die Massensignale des Edukts und Produkts integriert und aus den relativen Umwandlungswerten wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen berechnet (Abschnitt 3.5.3). Mit Hilfe der Michaelis-Menten Gleichung sowie dem ENZYME KINETICS Modul des SIGMA PLOT 8.0 Programms wurden dann die kinetischen Parameter für die Umsetzung von L-Arg, L-Homo-Arg und L-Canavanin bestimmt (Abb. 4.10).

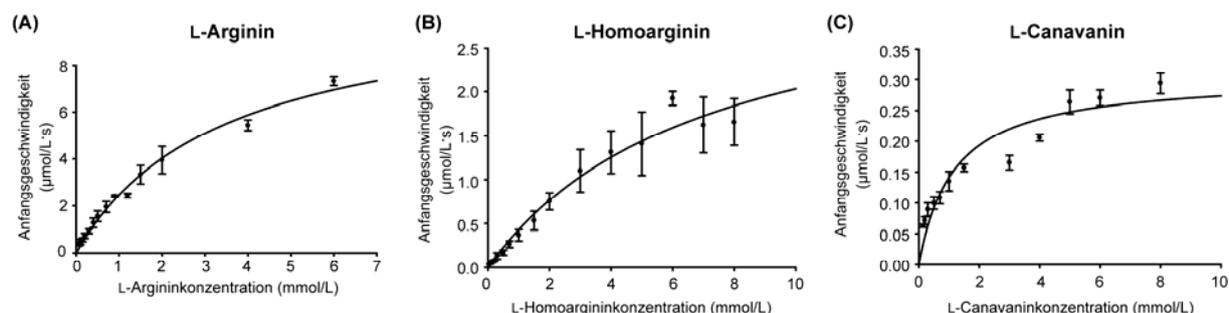


Abbildung 4.10: Michaelis-Menten Darstellung zur Bestimmung der kinetischen Parameter von VioC. Bei einer Enzymkonzentration von 0.25 μ M wurde die jeweilige Substratkonzentration zwischen 75 μ M und 8 mM variiert. (A) Bestimmung für L-Arg als Substrat. (B) Bestimmung der kinetischen Parameter für L-Homoarginin als Substrat. (C) Michaelis-Menten Darstellung mit L-Canavanin als Substrat.

Für die Hydroxylierung des nativen Substrats L-Arg durch VioC wurde ein beobachteter K_M -Wert von 3.4 ± 0.45 mM und ein k_{cat} -Wert von 2611 ± 196 min⁻¹ erhalten. Daraus ergab sich eine katalytische Effizienz für VioC von $k_{cat}/K_M = 767 \pm 183$ min⁻¹·mM⁻¹ (Tabelle 4.4). Das Enzym zeigt eine 6.5-fach geringere katalytische Effizienz bei der Hydroxylierung von

L-Homoarginin ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 118 \pm 47.1 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$) und mit einer katalytischen Effizienz von $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 63.3 \pm 17 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ ist die Effizienz der Hydroxylierung von L-Canavanin noch geringer (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: Kinetische Parameter für VioC-katalysierte Hydroxylierungsreaktionen.

Substrat	K_{M} (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (min ⁻¹ ·mM ⁻¹)
L-Arginin	3.40 ± 0.45	2611 ± 196	767 ± 183
L-Homoarginin	7.05 ± 2.35	831 ± 166	118 ± 47.1
L-Canavanin	1.16 ± 0.20	73.2 ± 3.9	63.3 ± 17

4.2.3 Kristallstruktur von VioC

4.2.3.1 Allgemeine Strukturbeschreibung

Die Kristalle von VioC wurden wie beschrieben gezüchtet und die Kristallstruktur des Substratkomplexes (VioC•L-Arginin•Tartrat•Fe(II)) wurde mit einer Auflösung von 1.3 Å durch „molecular replacement“ mit der Struktur von AsnO^[104] als Model gelöst (Abschnitt 3.6).² Dabei wurde Tartrat als Analogon des natürlichen Kosubstrats α -Ketoglutarat im aktiven Zentrum des Enzyms koordiniert, da Tartrat in hoher Konzentration in der Kristallisationsbedingung vorlag und α KG nicht hinzugegeben wurde. Jede asymmetrische Einheit enthielt ein VioC-Molekül, das von V21-G356 definiert war, und das VioC-Kristallgitter konnte der Raumgruppe C2 zugeordnet werden. Die verfeinerte Struktur von VioC besteht aus einem Kern von neun β -Strängen (A-I) (Tabelle 4.5), wovon acht die so genannte „jelly roll“-Faltung einnehmen, die auch in Strukturen anderer Mitglieder der CAS-ähnlichen Oxygenasen-Familie gefunden wurde.^[96] Das größere Faltblatt dieser Struktur wird durch fünf β -Stränge (B, G, D, I und C) gebildet und das kleinere Faltblatt wird durch die drei β -Stränge F, E und H aufgebaut (Abb. 4.11 (A)). Dieses strukturelle Kernmotiv ist zwischen zwei α -helikalen Regionen platziert. Die N-terminale Region (V21-L80) beinhaltet drei Helices (α 1- α 3) und einen β -Strang (A) parallel zu dem ersten β -Strang (B) des „jelly roll“-Motivs. Die Verbindung zwischen dem vierten (E) und fünften (F) β -Strang wird durch drei Helices (α 5- α 7; V199-L296) hergestellt. Zusätzlich findet man in dieser Verbindung zwei flexible Schleifenregionen (F213-R237 und R249-E279). Eine weitere Schleife, die das aktive Zentrum abgrenzt, befindet sich zwischen den β -Strängen C und D (V146-D179) (Abb. 4.11 (A)).

² Die Aufklärung der Kristallstrukturen von VioC und die Analyse und Interpretation der erhaltenen strukturellen Informationen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Lars-Oliver Essen (Philipps-Universität Marburg) durchgeführt.

Tabelle 4.5: Zuordnung der Sekundärstrukturelemente in VioC.

β -Stränge	Reste	α -Helices	Reste	3_{10} -Helix	Reste
A	S25-F27	α_1	P31-R47	3_{10}	L341-A347
B	A86-R90	α_2	P54-E66		
C	T144-V146	α_3	R69-L80		
D	D179-L186	α_4	P112-L128		
E	T194-G198	α_5	E206-F213		
F	Y297-L299	α_6	R237-D248		
G	G304-D310	α_7	E279-S295		
H	A314-R318				
I	W331-T338				
X	D130-W134				

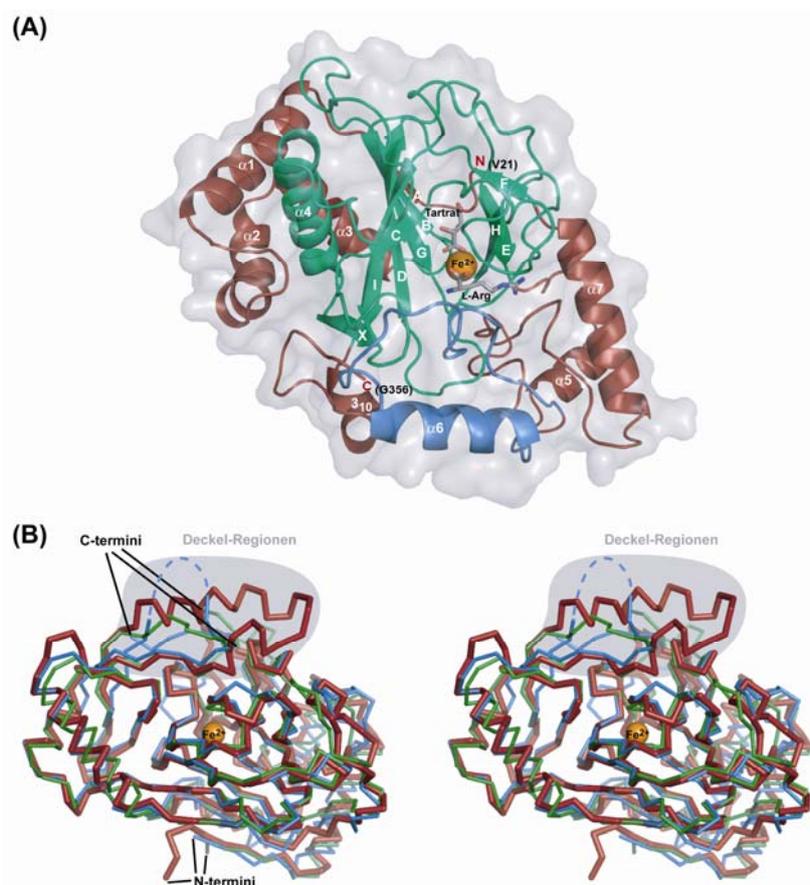


Abbildung 4.11: (A) Gesamtstruktur des Substratkomplexes VioC•L-Arginin•Tartrat•Fe(II). Die flexible Deckel-Region ist in blau gezeigt, das gebundene Fe(II) in orange und das Substrat und das Kosubstrat-Analogen sind grau dargestellt. (B) Stereodiagramm einer Überlagerung der Bänderdiagramme des VioC•L-Arginin•Tartrat•Fe(II)-Komplexes (rot), eines AsnO•hAsn•Succinat•Fe(II)-Komplexes (grün) (PDB Code: 2OG7) und von CAS (blau) (PDB Code: 1DRY). Die Position des Eisenions ist als orange Kugel markiert. Die Deckel-Regionen (VioC, F217-P250; AsnO, F208-E223; CAS, M197-G207; ungeordnete Teile sind dargestellt als gestrichelte Linie) sind grau unterlegt.

Ein Vergleich der Kristallstrukturen von CAS,^[103] AsnO^[104] und VioC (Abb. 4.11 (B)) zeigt die hohe strukturelle Ähnlichkeit dieser Enzyme mit Gesamt-Standardabweichungs-Werten von 1.32 Å für 169 C_α-Positionen zwischen VioC und AsnO und 1.36 Å für 236 C_α-Positionen zwischen VioC und CAS (Tabelle 4.6). Diese Werte wurden durch ein SSM (engl. *secondary structure matching*)-Alignment mit VioC als Referenz erhalten und spiegeln die hohe strukturelle Verwandtschaft der CAS-ähnlichen Oxygenasen wieder (Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: „Secondary structure matching“-Alignment von VioC. Strukturelle Alignments wurden mit Hilfe des SSM Servers (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/cgi-bin/ssmserver>) mit Standardeinstellungen durchgeführt.

Protein	Organismus	PDB	Standard-Abweichung (Å)	N_{align}^a	$\%_{\text{seq}}^b$	Substrat	Katalysierte Reaktion
VioC	<i>Streptomyces</i> sp. ATCC11861	2WBO	0.0	358	100	L-Arg	C _β -Hydroxylierung
AsnO	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	2OG7 ^[104]	1.55	292	36	L-Asn	C _β -Hydroxylierung
Clavaminat Synthase	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	1DRY ^[103]	1.74	284	33	Proclavaminat	Hydroxylierung/ Oxidative Zyklisierung und Dehydrierung
GAB Protein	<i>Escherichia coli</i>	1JR7 ^[202]	2.75	252	15	Nicht bestimmt	Nicht bestimmt
Taurine/αKG Dioxygenase TauD	<i>Escherichia coli</i>	1OTJ ^[107]	2.49	212	15	Taurin	Oxidative Spaltung
Carbapenem Synthase	<i>Erwinia carotovora</i>	1NX8 ^[203]	2.46	198	19	Carbapenam	Epimerisierung/ Dehydrierung
Alkylsulfatase ATSK	<i>Pseudomonas putida</i> S-313	1VZ4 ^[204]	2.14	189	18	Alkylsulfat	Oxidative Spaltung
AT3G21360	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1Y0Z ^[205]	2.87	212	14	Nicht bestimmt	Nicht bestimmt
2636534	<i>Bacillus subtilis</i>	1VRB	3.95	152	11	Nicht bestimmt	Nicht bestimmt

^a N_{align} (Länge des Alignments) beschreibt die Zahl der Reste der Sequenz, die für das Alignment verwendet wurden.

^b $\%_{\text{seq}}$ (Sequenzidentität) ist der Quotient der identischen Reste (N_{ident}) zu allen verglichenen Resten (N_{align}) in Prozent:

$$\%_{\text{seq}} = N_{\text{ident}}/N_{\text{align}}$$

4.2.3.2 Aktives Zentrum von VioC

Die Struktur des Substratkomplexes von VioC wurde mit einer Auflösung von 1.3 Å in Gegenwart von Kalium/Natrium-Tartrat erhalten. Die Positionen des Fe(II)-Kofaktors, des Substrats L-Arginin und des Kosubstrat-Analogons werden deutlich durch eine Differenz-Elektronendichte Abbildung des aktiven Zentrums dargestellt (Abb. 4.12 (A)). Mit einer

Auflösung von 1.1 Å wurde außerdem eine Struktur erhalten, in der kein Fe aber (2*S*,3*S*)- β -Hydroxy-Arginin im aktiven Zentrum koordiniert ist (Abb. 4.12 (B)). Als dritte Struktur wurde der Produktkomplex VioC•hArg•Succinat•Fe(II) durch Kokristallisation von VioC mit dem Reaktionsprodukt mit einer Auflösung von 1.16 Å gelöst. Auch hier wird das aktive Zentrum durch die vorhandene Elektronendichte deutlich definiert (Abb. 4.12 (C)).

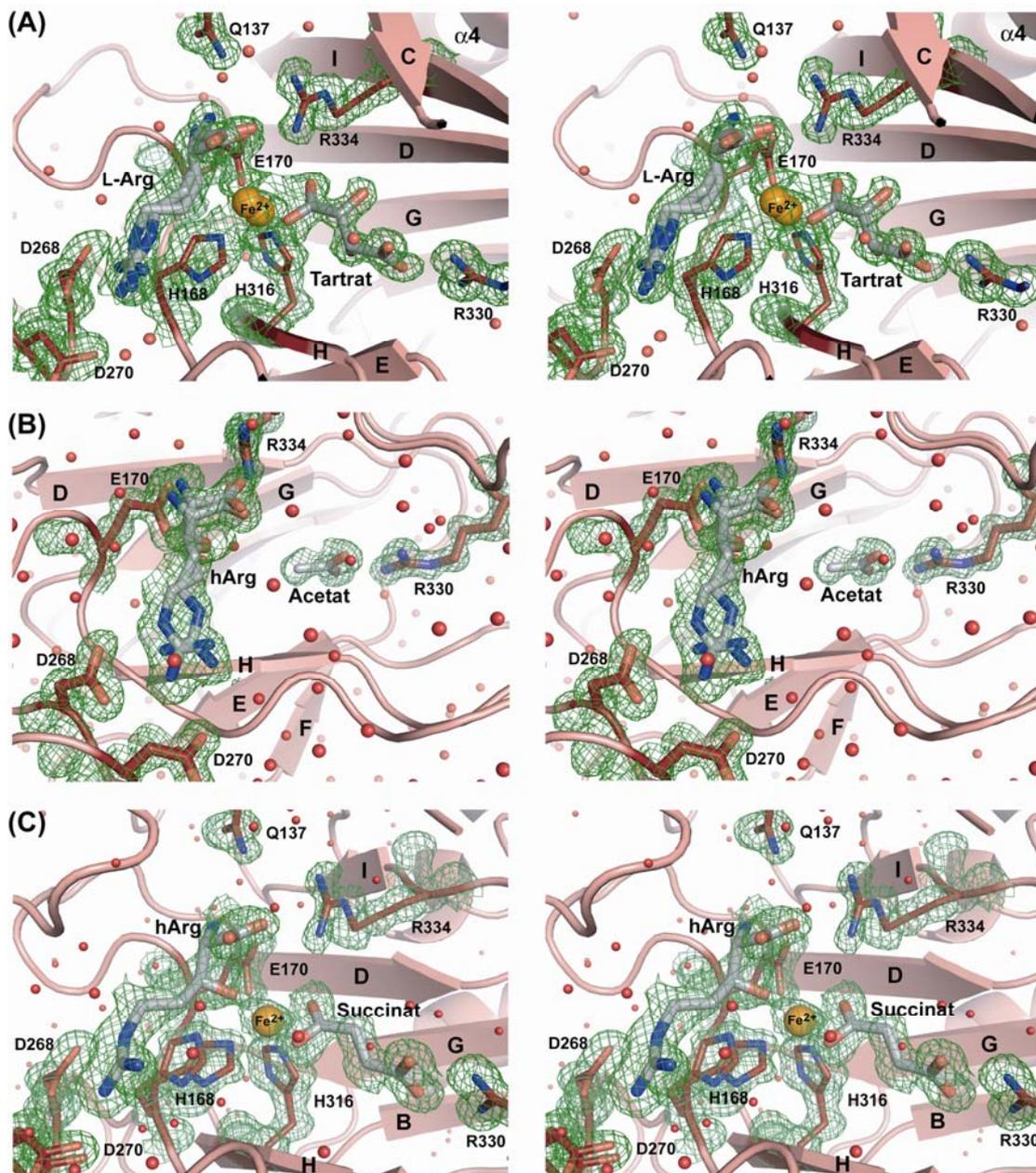


Abbildung 4.12: Aktives Zentrum von VioC. (A) Stereodiagramm des aktiven Zentrums vom Substratkomplex. Die $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Elektronendichte (Konturierungs-Level $1.0\sigma \equiv 0.39 \text{ e}/\text{\AA}^3$) zeigt das gebundene Eisen (orange), Tartrat und L-Arginin (grau). Das Substrat und Eisen werden im aktiven Zentrum in zwei verschiedenen Konformationen mit jeweils 75% und 25% Besetzung koordiniert. (B) Stereodiagramm der Koordination von hArg im aktiven Zentrum des VioC•hArg-Komplexes mit einer Gesamtbesetzung von 80% für hArg (grau), wobei jedes gebundene Konformer 40% Besetzung aufweist. Außerdem wird durch die $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Elektronendichte (Konturierungs-Level $0.8\sigma \equiv 0.35 \text{ e}/\text{\AA}^3$) ein Acetat-Ion an der Bindungsstelle des Kosubstrates α KG abgebildet. (C) Stereodiagramm des aktiven Zentrums vom VioC•hArg•Succinat•Fe(II)-Komplex mit Eisen (orange), hArg und Succinat (grau). Die $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Elektronendichte wurde mit einem Konturierungs-Level von $0.8\sigma \equiv 0.35 \text{ e}/\text{\AA}^3$ berechnet. Wassermoleküle sind als rote Kugeln dargestellt.

Anhand des VioC•L-Arg•Tartrat•Fe(II)-Komplexes wird deutlich, dass das Fe(II)-Ion durch eine Carboxylgruppe von Tartrat und die so genannte 2-His-1-Carboxylat-Triade pentakoordiniert wird (Abb. 4.12 (A) und 4.13 (A)). Dieses Eisen-bindende Motiv (HXD/E...H) ist in nahezu allen bekannten nicht-Häm Eisen-abhängigen Oxygenasen konserviert.^[206] Im Fall von VioC wird dieses Motiv durch die Reste H168, E170 und H316 gebildet und liegt in der Nähe des kleineren β -Faltblatts der „jelly roll“-Faltung. Anstelle des natürlichen Kosubstrats α KG ist im Substratkomplex ein Tartratmolekül gebunden. Als Analogon des Kosubstrats koordiniert eine Carboxylgruppe einzählig das Fe(II)-Ion und die andere Carboxylgruppe wird von VioC durch eine Salzbrücke mit der Guanidiniumgruppe von R330 gebunden (Abb. 4.12 (A) und 4.13 (A)). Das Eisenion nimmt eine verzerrt oktaedrische Konformation ein und zeigt konformationelle Heterogenität (Abb. 4.12 (A)). Es wird in zwei Positionen mit ca. 75% und 25% Besetzung gefunden, wobei das Vorhandensein einer Fe-O-Spezies ausgeschlossen werden kann, da die beiden Positionen nur um 1.1 Å voneinander abweichen. Interessanterweise wird diese Heterogenität auch von dem gebundenen L-Arginin übernommen. Das Substrat nimmt zwei verschiedene Konformationen mit einem Verhältnis von $\sim 3:1$ im aktiven Zentrum von VioC ein (Abb. 4.13 (A), Tabelle 4.7). Beide Arginin-Konformere weisen eine gespannte Geometrie auf, da sie ekliptische Rotamere entlang der χ_2 und χ_3 Torsionswinkel bilden (Tabelle 4.7).

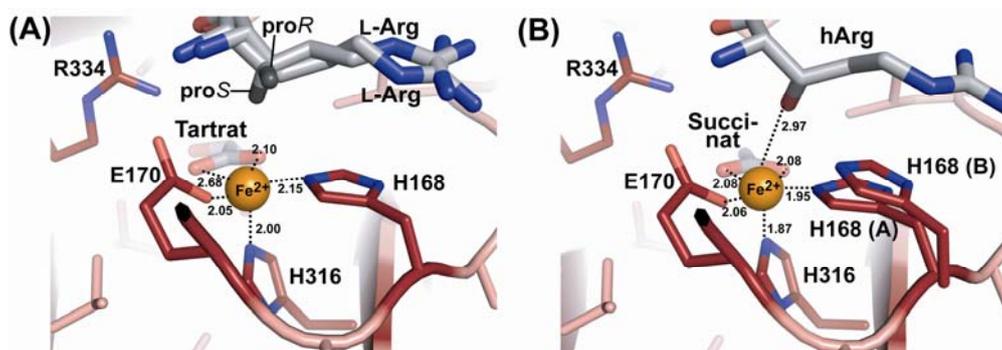


Abbildung 4.13: Interaktionen im aktiven Zentrum von VioC. (A) Koordination des Fe(II)-Ions im Substratkomplex VioC•L-Arg•Tartrat•Fe(II). Das Eisenion ist in orange dargestellt und L-Arg und Tartrat sind in grau gezeigt. (B) Koordination des Eisenions im Produktkomplex VioC•hArg•Succinat•Fe(II) mit dem Produkt hArg und dem Koprodukt Succinat in grau und dem Fe(II)-Ion in orange. Abstände sind in Å dargestellt.

Tabelle 4.7: Rotamere von gebundenem L-Arginin und hArg in VioC.

Komplex	χ_1 (°)	χ_2 (°)	χ_3 (°)	χ_4 (°)	Besetzung ^a
VioC•L-Arg•Tartrat•Fe(II)	173.9	126.3	168.8	-153.5	0.75
	-159.9	73.7	118.9	76.4	0.25
VioC•hArg	-168.6	159.9	148.4	177.2	0.40
	-163.0	90.0	121.7	71.5	0.40
VioC•hArg•Succinat•Fe(II)	-160.0	91.2	126.6	60.8	0.70

^a Die Besetzungen wurden unter Berücksichtigung fehlender $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ Elektronendichte und übereinstimmender *B*-Faktoren mit den umgebenden Resten bestimmt.

Die Struktur des VioC•hArg•Succinat•Fe(II)-Komplexes zeigt, dass Succinat als Koprodukt der Hydroxylierungsreaktion im aktiven Zentrum von VioC ebenso zweifach koordiniert vorliegt wie Tartrat im Substratkomplex (Abb. 4.12 (C) und 4.13 (B)). Die bei 1.16 Å Auflösung berechnete Differenzelektronendichte zeigt erneut konformationelle Heterogenität an der Eisen-bindenden Stelle. In diesem Fall liegt die Seitenkette des H168-Restes in zwei alternativen Konformationen vor. Zusammen mit der 1.1 Å Struktur des VioC•hArg-Komplexes konnte die zuvor chemisch bestimmte (2*S*,3*S*)-Stereochemie des Hydroxylierungs-Produktes hArg bestätigt werden.^[152,162] Die Distanz zwischen der hydroxylierten C_β-Methylengruppe und dem katalytischen Eisen beträgt 4.2 Å. Im Substratkomplex sind beide beobachteten L-Arg-Konformere so orientiert, dass das pro*S*-Wasserstoffatom der C_β-Gruppe in Richtung des katalytischen Eisens zeigt. Mit einem Fe-OH-Abstand von 2.97 Å zeigt die Struktur des Produktkomplexes eine eher schwächere Koordination des Produktes zu dem katalytischen Eisenion (Abb. 4.12 (C) und 4.13 (B)). Eine ausführlichere Diskussion der Stereospezifität der Monooxygenase VioC befindet sich in Abschnitt 5.2.2 im Diskussionsteil dieser Arbeit.

Im Bezug auf die Erkennung von L-Arginin als Substrat und (2*S*,3*S*)-β-Hydroxy-Arginin als Produkt durch VioC zeigen die Strukturen zwei konservierte Koordinationsstellen für die α-Aminogruppe von L-Arg (Abb. 4.12). Die Reste Q137 und E170 bilden eine Wasserstoffbrückenbindung und eine Salzbrücke mit der α-Aminogruppe aus, obwohl die Carboxylgruppe von E170 auch in die Koordination des katalytischen Eisenions involviert ist. Außerdem bildet die Carboxylgruppe von L-Arginin eine Salzbrücke mit der Seitenkette von R334 und eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Peptidgruppe von S158 aus. Zusätzlich wird die Guanidiniumgruppe der L-Arg-Seitenkette mit Salzbrücken durch die Seitenketten der sauren Reste D268 und D270 gebunden (Abb. 4.12). Anhand der Koordination von L-Arg im aktiven Zentrum von VioC kann auch die Substratspezifität der Monooxygenase erklärt werden (Abschnitt 5.2.2, Diskussionsteil dieser Arbeit).

4.2.3.3 Deckel-Region von VioC

Nach der Substratbindung verschließt eine flexible, Deckel-ähnliche Region (F217-P250) das aktive Zentrum von VioC. Diese Region ist in der *apo* Form des Enzyms vollständig ungeordnet (R220-E251), ordnet sich aber nach der Komplexierung von Eisen und L-Arginin. Der Produktkomplex von VioC weist die gleiche Organisation dieser Deckel-Region auf wie der Substratkomplex, aber ein Vergleich mit der Deckel-Region von AsnO zeigt eine deutlich längere Deckel-Region für VioC, wo Teile dieser Region als Helix α_6 organisiert sind (Abb. 4.14).

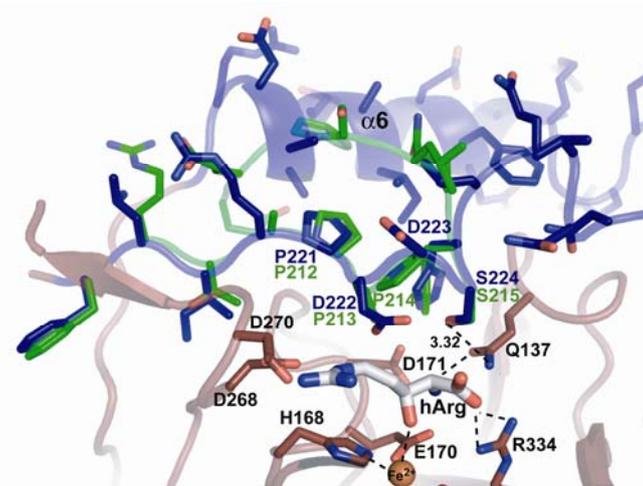


Abbildung 4.14: Deckel-Kontrolle der Substratbindung. Vergleich der Deckel-Region von VioC (blau) und AsnO (grün). Die Seitenkette von S224 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Rest Q137 aus, der wiederum die α -Aminogruppe von hArg koordiniert (Abstand angegeben in Å). Die Reste, die das aktive Zentrum verschließen, sind markiert.

Im Gegensatz zu AsnO, wo das aktive Zentrum durch drei hydrophobe Prolin-Reste verschlossen wird, ist das aktive Zentrum von VioC nur durch einen Prolin-Rest (P221) und zwei Aspartat-Reste (D222 und D223) begrenzt. Die Seitenkette von D222 stabilisiert offenbar die Guanidiniumgruppe des Substrats durch weit reichende elektrostatische Interaktionen. Eine weitere Interaktion zwischen dem aktiven Zentrum und der Deckel-Region von VioC findet als Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Hydroxylgruppe der S224-Seitenkette und der Carboxamidgruppe der Seitenkette von Q137 statt. Eine nähere Diskussion zur Deckel-Region von VioC befindet sich in Abschnitt 5.2.2 dieser Arbeit.

4.2.3.4 Datenstatistik der VioC-Strukturen

Die Kristallstrukturen und Strukturdaten von VioC wurden in der Proteindatenbank PDB mit folgenden Zugangsnummern hinterlegt: 2WBO für den VioC•L-Arg•Tartrat•Fe(II)-Komplex, 2WBQ für den VioC•hArg-Komplex und 2WBP für den VioC•hArg•

Succinat•Fe(II)-Komplex. Die Datenstatistiken für die Datensätze befinden sich in Tabelle 4.8.

Tabelle 4.8: Datensammlung und Verfeinerung.

	VioC•L-Arg• Tartrat•Fe(II)	VioC•hArg	VioC•hArg• Succinat•Fe(II)
Datenverarbeitung			
Beamline	XO6SA, SLS	ID14-4, ESRF	ID14-4, ESRF
Wellenlänge (Å)	0.9794	0.9755	0.9795
Detektor	PILATUS-6M	ADSC 315r	ADSC 315r
Raumgruppe	C2	C2	C2
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å); β (°)	80.63, 67.34, 62.42; 108.83	80.91, 66.83, 62.73; 109.16	80.77, 66.93, 62.90; 109.16
Auflösung (Å)	20.0-1.3	20.0-1.10	20.0-1.16
Gesamtreflexe	329 984	448 872	293 649
Unabhängige Reflexe	76 258	123 576	99 570
Vollständigkeit ^a (%)	98.3 (90.2)	97.0 (84.9)	91.3 (65.7)
$\langle I \rangle / \sigma \langle I \rangle$ ^a	10.1 (2.6)	14.1 (1.5)	10.6 (2.1)
R_{merge} ^b	0.080 (0.631)	0.040 (0.571)	0.063 (0.249)
Wilson <i>B</i> -Faktor (Å ²)	12.4	9.07	9.62
Verfeinerung			
R_{work} ^{a,c}	0.161 (0.305)	0.143 (0.293)	0.132 (0.252)
R_{free} ^{a,d}	0.212 (0.304)	0.178 (0.336)	0.171 (0.293)
Verwendete Reflexe	74 865	121 303	97 778
Mittlerer <i>B</i> -Faktor (Å ²)	17.52	14.18	13.98
Anzahl der Atome	2 954	3 232	3 170
Anzahl der Wassermoleküle	288	451	381
Anzahl der heterogenen Atome	13	10	12
Standardabweichung vom Ideal			
Bindungslänge (Å)	0.008	0.011	0.010
Bindungswinkel (°)	1.13	1.45	1.36
Torsionswinkel (°)	7.54	6.79	7.20

^a Werte in Klammern entsprechen der höchsten Auflösungsschale.

^b $R_{\text{merge}} = \sum_{\text{hkl}} \sum_i (I_i(\text{hkl}) - \langle I(\text{hkl}) \rangle) / \sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl})$

^c $R_{\text{work}} = \sum (F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}) / \sum(F_{\text{obs}})$

^d R_{free} : Kristallographischer *R*-Faktor basierend auf 5.1% der Daten, die von der Verfeinerung für die Vergleichsprüfung zurückgehalten wurden.

4.3 Biosynthese des β-Methyl-Phenylalanin-Bausteins aus Manno-peptimycin

Die strukturelle Vielfalt von nicht-ribosomal synthetisierten Peptiden zeigt sich auch in der Struktur des Glykopeptid-Antibiotikums Manno-peptimycin, das von *Streptomyces hygroscopicus* in Form von fünf Derivaten produziert wird und antibakterielle Aktivität gegen z.B. Vancomycin-resistente Enterokokken aufweist. Neben der unnatürlichen Aminosäure β-Hydroxy-Enduracididin findet man C_β-methyliertes Phenylalanin im Peptidgrundgerüst, das vermutlich durch die dritte Adenylierungs-Domäne der NRPS MppA aktiviert wird. Auch im

Fall der Mannopeptimycin-Biosynthese werden diese Vorläufermoleküle durch modifizierende Enzyme synthetisiert.

Die folgenden Abschnitte beschäftigen sich mit der Aufklärung des Biosynthesewegs, der zu β -Methyl-Phenylalanin führt. Durch den Biosynthese-Gencluster von Mannopeptimycin wird eine SAM-abhängige Methyltransferase (MppJ) codiert, die vermutlich nicht stereospezifisch die Methylierung der C_{β} -Position von Phenylpyruvat katalysiert. Diese α -Ketosäure wird anschließend transaminiert, wobei zwei im Gencluster codierte Aminotransferasen (MppP und MppQ) für die Katalyse dieser Reaktion in Frage kamen. Außerdem wurde gezeigt, dass die Aminotransferase IlvE aus dem Primärmetabolismus von *Streptomyces coelicolor* A3(2) PLP-abhängig die Transaminierungsreaktion katalysiert. Der (2*S*,3*S*)- β -Methyl-Phenylalanin-Baustein wird vermutlich anschließend durch die NRPS MppA aktiviert und in die Peptidkette eingebaut.³ Zeitgleich zu diesen durchgeführten Arbeiten wurde der Biosyntheseweg von β -Methyl-Phenylalanin in *Streptomyces hygroscopicus* durch Y.-T. Huang *et al.* untersucht und im September 2009 veröffentlicht.^[207]

4.3.1 Rekombinante Expression und Aufreinigung von *mppJ*, *mppP*, *mppQ*, *mppA-PCP₃* und *IlvE*

Die Gene *mppJ*, *mppP*, *mppQ* und das Genfragment *mppA-PCP₃* aus *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 30439 und das Gen *ilvE* aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) wurden in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert (Abschnitt 3.2.1) und anschließend mit Hilfe der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie als His₆-Tag-Fusionsproteine gereinigt (Abschnitt 3.2.2). Die konzentrierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE analysiert und mit Coomassie Blau-Färbung visualisiert (Abb. 4.15). Dabei stellte sich heraus, dass das rekombinante Protein MppP mit der molekularen Masse 33.7 kDa nicht gereinigt werden konnte, da das Protein unlöslich war und deshalb nach dem Zellaufschluss im Pellet verblieb. Die anderen Proteine konnten mit folgenden Ausbeuten pro Liter Bakterienkultur erhalten werden: 10 mg für MppJ, 1.0 mg für MppQ, 3.6 mg für MppA-PCP₃ und 6.0 mg für IlvE.

³ Die Herstellung und biochemische Charakterisierung der in diesem Abschnitt beschriebenen rekombinanten Enzyme wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Christoph Mahlert (Bayer, Deutschland) durchgeführt.

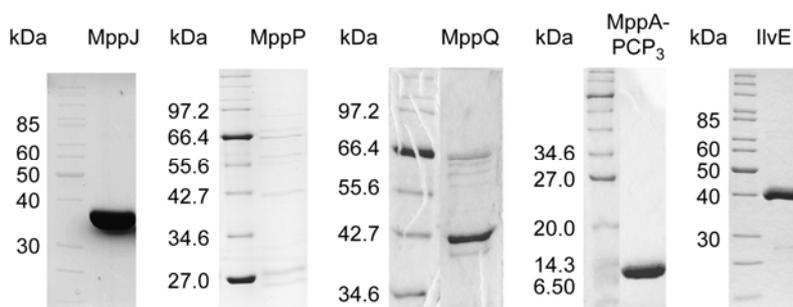


Abbildung 4.15: SDS-PAGE Analyse von gereinigtem und konzentriertem MppJ (38.7 kDa), MppQ (45.6 kDa), MppA-PCP₃ (13.9 kDa) und IlvE (40.8 kDa). Das Protein MppP (33.7 kDa) konnte nicht löslich erhalten werden. Als Proteinmarker diente der Fermentas PageRuler für MppJ und IlvE. Bei den anderen SDS-PAGE Analysen wurde der NEB Protein Marker Broad Range (2-212 kDa) verwendet.

4.3.2 Methylierungs-Aktivität von MppJ

MppJ-vermittelte Methylierung von Phenylpyruvat:

Da ein Sequenzalignment von MppJ das in vielen *S*-Adenosylmethionin (SAM)-abhängigen Methyltransferasen konservierte SAM-Bindungsmotiv GxGxG zeigte (Abschnitt 5.3.1), wurde die Methylierungs-Aktivität von MppJ in Gegenwart von SAM getestet. Da bereits für die SAM-abhängige Methyltransferase GlmT aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) gezeigt wurde, dass anstelle von L-Glutamat die entsprechende α -Ketosäure als Substrat diente,^[124] wurde dieser Reaktionsweg auch für β -Methyl-Phenylalanin in Betracht gezogen. Daher wurde MppJ *in vitro* mit Phenylpyruvat, das die α -Ketosäure von Phenylalanin darstellt, inkubiert und der Reaktionsansatz wurde mittels RP-HPLC-ESI-MS analysiert (Abschnitt 3.5.4). Der Assay mit Enzym (Abb. 4.16, rote Spur) zeigte eine deutliche Umsetzung von Phenylpyruvat ($m/z = 163.1$ [M-H]⁻ berechnet; $m/z = 163.2$ [M-H]⁻ gemessen) zu β -Methyl-Phenylpyruvat ($m/z = 177.1$ [M-H]⁻ berechnet; $m/z = 177.0$ [M-H]⁻ gemessen). Im Gegensatz dazu zeigte die Kontrollreaktion ohne rekombinante Methyltransferase ausschließlich das Massensignal des Substrats Phenylpyruvat ($m/z = 163.1$ [M-H]⁻ berechnet; $m/z = 163.2$ [M-H]⁻ gemessen) (Abb. 4.16, blaue Spur).

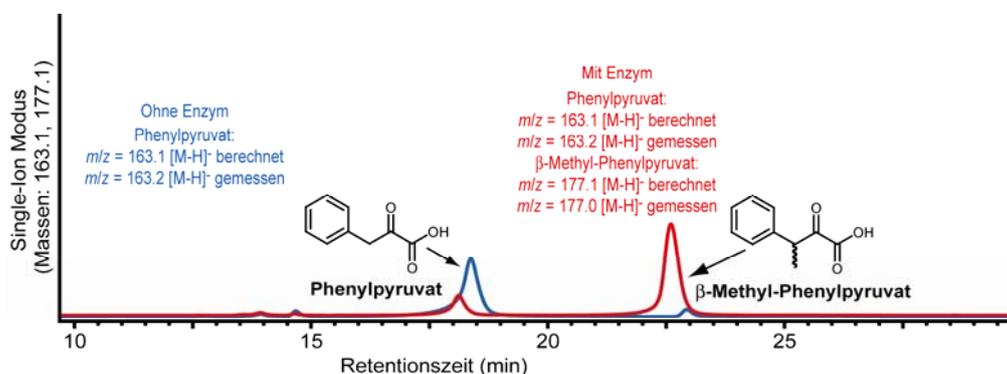


Abbildung 4.16: C_β-Methylierung von Phenylpyruvat durch MppJ. SIM-Chromatogramme der HPLC-MS Analyse (detektierte [M-H]⁻ Massen: 163.1 und 177.1) des Ansatzes ohne Enzym als Kontrollreaktion (blaue Spur) und des Assays mit MppJ (rote Spur).

Bestimmung der kinetischen Parameter:

Um die kinetischen Parameter für die Methylierung von Phenylpyruvat durch MppJ zu bestimmen, wurde die Reaktion bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen durchgeführt und nach definierten Zeitpunkten durch Zugabe von Methanol abgestoppt (Abschnitt 3.5.4). Nach der Probenvorbereitung wurden die Assays mittels RP-HPLC-ESI-MS analysiert und die Massensignale des Edukts und Produkts wurden integriert, um relative Umwandlungswerte zu erhalten. Nach Berechnung der Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen wurden die kinetischen Parameter mit Hilfe der Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk Gleichung sowie dem ENZYME KINETICS Modul des SIGMA PLOT 8.0 Programms bestimmt (Abb. 4.17).

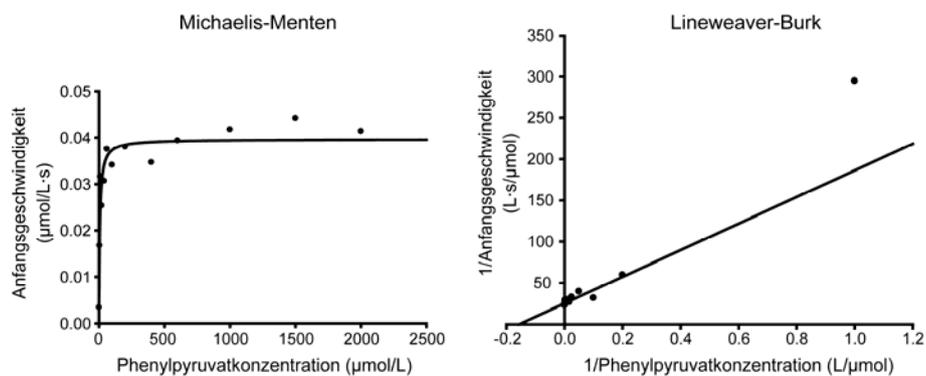


Abbildung 4.17: Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk Darstellung für die Bestimmung der kinetischen Parameter von MppJ. Die Substratkonzentration wurde für die Messungen zwischen 1 μM und 2 mM variiert und die Enzymkonzentration betrug 5 μM .

Für die C_{β} -Methylierung von Phenylpyruvat durch MppJ wurde ein beobachteter K_M -Wert von $0.006 \pm 0.002 \text{ mM}$ und ein k_{cat} -Wert von $0.5 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$ erhalten. Hieraus ergab sich eine katalytische Effizienz für MppJ von $k_{\text{cat}}/K_M = 83.3 \pm 19.3 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$.

4.3.3 Substratspezifität von MppJ

Um die Substratspezifität von MppJ zu untersuchen, wurde das rekombinante Enzym mit weiteren α -Ketosäuren inkubiert und die Reaktionen wurden mittels RP-HPLC-ESI-MS analysiert. Außerdem wurde freies L-Phenylalanin als Substrat getestet (Tabelle 4.9, Abschnitt 3.5.4), um den zuvor postulierten Biosyntheseweg von β -Methyl-Phenylalanin zu bestätigen, wonach nicht L-Phe sondern Phenylpyruvat durch MppJ methyliert wird. Außerdem wurde L-Phe gebunden an rekombinantes *holo* MppA-PCP₃ als mögliches Methylierungssubstrat getestet (Tabelle 4.9, Abschnitt 3.5.5). Damit soll ausgeschlossen werden, dass die Methylierungsreaktion während der Mannopeptimycin Biosynthese an PCP-gebundenem Substrat stattfindet. Leider konnte vollständig synthetisiertes Desmethyl-Mannopeptimycin nicht als Substrat für die Methyltransferase MppJ getestet werden, da die

chemische Synthese des Peptidgrundgerüsts sehr anspruchsvoll ist und bisher nicht vervollständigt werden konnte. Diese Substrattests zeigen, dass MppJ spezifisch für Phenylpyruvat ist und keine anderen getesteten Substrate methyliert wurden (Tabelle 4.9).

Tabelle 4.9: Bestimmung der Substratspezifität von MppJ.

Substrat	m/z [M-H] ⁻ Substrat	m/z [M-H] ⁻ methyliertes Produkt	m/z [M-H] ⁻ beobachtet ^a	Methylierung
Phenylpyruvat	163.1	177.1	177.0	Ja
L-Phenylalanin	164.1	178.1	164.1	Nein
Pyruvat	87.0	101.0	87.1	Nein
α -Ketobutyrat	101.0	115.0	101.0	Nein
α -Ketoglutarat	145.0	159.0	145.1	Nein
Oxalacetat	131.0	145.0	131.0	Nein
Phe-S-MppA-PCP ₃	14336 ^b	14350 ^b	14336 ^b	Nein

^a Mittels RP-HPLC-ESI-MS Analyse ermittelte Massen nach 3 h Inkubation von MppJ mit SAM und dem entsprechenden Substrat.

^b m/z [M+H]⁺

4.3.4 Transaminierung von enzymatisch hergestelltem β -Methyl-Phenylpyruvat

Transaminierungsreaktion mit MppQ:

Der nächste Schritt in der Synthese von β -Methyl-Phenylalanin als Vorläufer für die Mannopectimycin-Biosynthese ist die Transaminierung von β -Methyl-Phenylpyruvat. Es ist denkbar, dass eine der beiden im Mannopectimycin-Biosynthese-Gencluster codierten Aminotransferasen für den Aminogruppentransfer von einem Donor auf β -Methyl-Phenylpyruvat verantwortlich ist. Allerdings konnte die Aminotransferase MppP nicht als lösliches, rekombinantes Protein erhalten werden. Deshalb wurde nur die Aktivität von MppQ untersucht. Hierzu wurde das rekombinante Enzym in einem gekoppelten Assay mit enzymatisch produziertem β -Methyl-Phenylpyruvat, PLP und allen natürlichen Aminosäuren als

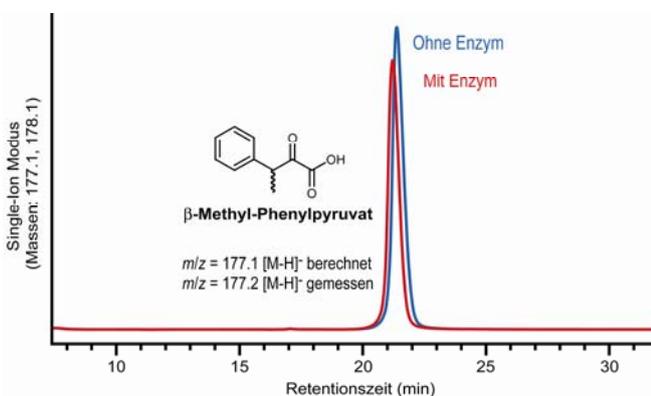


Abbildung 4.18: Aktivitätsassay mit MppQ. SIM-Chromatogramme der HPLC-MS Analyse (beinhaltete [M-H]⁻ Massen: 177.1 und 178.1) des Ansatzes ohne Enzym als Kontrollreaktion (blaue Spur) und des Assays mit MppQ (rote Spur).

Aminogruppendonor inkubiert und mittels RP-HPLC-ESI-MS analysiert (Abschnitt 3.5.6). Es konnte keine Aminotransferasen-Aktivität festgestellt werden. Sowohl im Assay mit Enzym (Abb. 4.18, rote Spur) als auch im Kontrollassay ohne MppQ (Abb. 4.18, blaue Spur) wurde ausschließlich die Masse von β -Methyl-Phenylpyruvat beobachtet ($m/z = 177.1$ $[M-H]^-$ berechnet; $m/z = 177.2$ $[M-H]^-$ gemessen).

Transaminierungsreaktion mit IlvE:

Wie bereits für die Aminotransferase IlvE aus *Streptomyces coelicolor* mit der β -Methyl-Glutamat-Bildung in der CDA-Biosynthese gezeigt wurde,^[124] können auch Aminotransferasen aus dem Primärmetabolismus in die Biosynthese von Sekundärmetaboliten involviert sein. Allerdings ist das Genom von *Streptomyces hygroscopicus* noch nicht vollständig sequenziert und daher wäre es sehr aufwendig, Gene zu identifizieren, die für putative Aminotransferasen codieren. Deshalb wurde auch in dieser Arbeit das rekombinante Enzym IlvE aus *S. coelicolor* für einen gekoppelten Methylierungs-Transaminierungs-Assay verwendet. Enzymatisch hergestelltes β -Methyl-Phenylpyruvat wurde mit IlvE, PLP und L-Valin inkubiert und mittels RP-HPLC-ESI-MS analysiert (Abschnitt 3.5.6). Hierbei wurde deutlich, dass IlvE die Transaminierungsreaktion von β -Methyl-Phenylpyruvat ($m/z = 177.1$ $[M-H]^-$ berechnet; $m/z = 177.0$ $[M-H]^-$ gemessen) zu β -Methyl-Phenylalanin ($m/z = 178.1$ $[M-H]^-$ berechnet; $m/z = 178.2$ $[M-H]^-$ gemessen) katalysiert (Abb. 4.19, rote Spur). Da zwei Massenpeaks für das Produkt β -Methyl-Phenylalanin detektiert wurden, lässt sich daraus schließen, dass zwei Diastereomere entstanden sind. Da bereits gezeigt wurde, dass IlvE stereoselektiv L-Aminosäuren generiert,^[124] müssen während der Methylierungsreaktion von Phenylpyruvat die zwei Enantiomere (3*S*)- und (3*R*)- β -Methyl-Phenylpyruvat entstanden sein, die dann zu den Diastereomeren (2*S*,3*S*)- und (2*S*,3*R*)- β -Methyl-Phenylalanin transaminiert wurden. Zusätzlich kann man die Bildung von L-Phenylalanin beobachten, da im ersten Reaktionsschritt Phenylpyruvat nicht vollständig methyliert wurde und nun die Transaminierung von freiem Phenylpyruvat stattfindet (Abb. 4.19, rote Spur). Als Kontrollreaktion wurde ein Ansatz ohne IlvE analysiert, der keine Transaminierung zeigt (Abb. 4.19, blaue Spur).

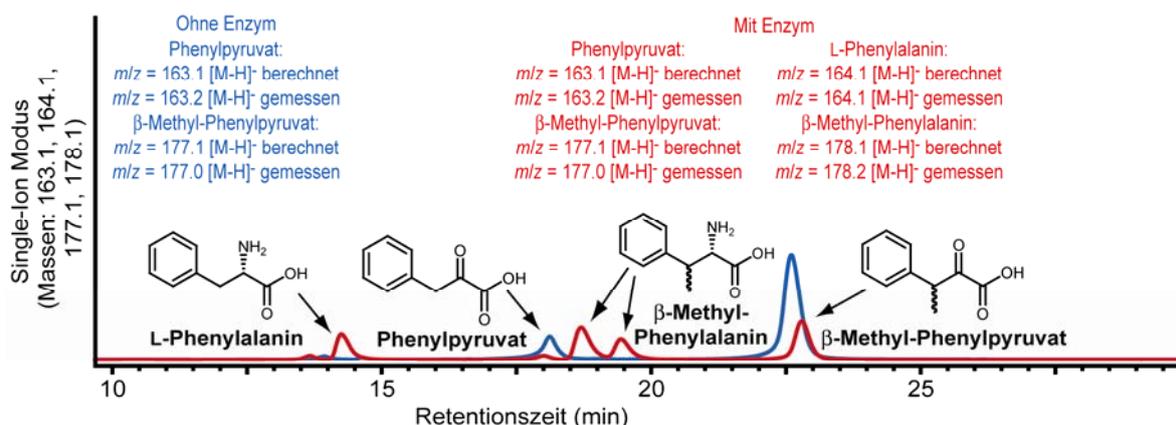


Abbildung 4.19: Aktivitätsassay mit der Aminotransferase IlvE. SIM-Chromatogramme der HPLC-MS Analyse (beinhaltete [M-H]⁻ Massen: 163.1, 164.1, 177.1 und 178.1) des Aktivitätsassays (rote Spur) und der Kontrollreaktion ohne IlvE (blaue Spur).

Bestimmung der kinetischen Parameter von IlvE-vermittelter Transaminierung:

Auch für die durch IlvE katalysierte Transaminierungsreaktion wurden kinetische Parameter bestimmt. Hierfür wurde die Reaktion mit unterschiedlichen Konzentrationen von enzymatisch hergestelltem β-Methyl-Phenylpyruvat durchgeführt und durch Zugabe von Methanol gestoppt (Abschnitt 3.5.6). Nach Analyse mittels RP-HPLC-ESI-MS wurden die Anfangsgeschwindigkeiten erhalten und die kinetischen Parameter konnten mit Hilfe der Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk Gleichung sowie dem ENZYME KINETICS Modul des SIGMA PLOT 8.0 Programms bestimmt werden (Abb. 4.20).

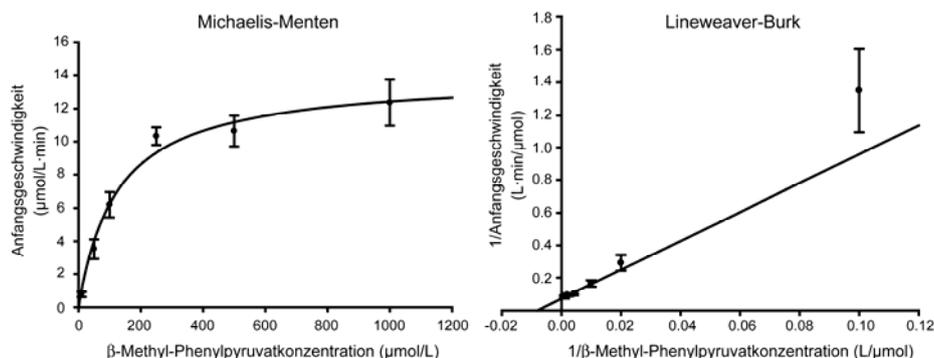


Abbildung 4.20: Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk Darstellung für die Bestimmung der kinetischen Parameter für IlvE. Die Substratkonzentration wurde für die Messungen zwischen 10 μM und 1 mM variiert und die Enzymkonzentration betrug 5 μM.

Für die Transaminierung von β-Methyl-Phenylpyruvat durch IlvE wurde ein beobachteter K_M -Wert von 0.123 ± 0.028 mM und ein k_{cat} -Wert von 2.8 ± 0.2 min⁻¹ erhalten. Daraus ergab sich eine katalytische Effizienz für IlvE von $k_{cat}/K_M = 22.8 \pm 3.4$ min⁻¹·mM⁻¹.

4.3.5 Bestimmung der Konfiguration von enzymatisch gebildetem β -Me-Phe

Um die absolute Konfiguration des β -Methyl-Phenylalanin-Produkts zu belegen und um die zwei HPLC-MS-Peaks dem entsprechenden Diastereomer zuordnen zu können, wurden chemische Standards von der Arbeitsgruppe um Dr. Markus Oberthür (Philipps Universität Marburg) synthetisiert (Synthese siehe Abschnitt 3.4.5). Anschließend wurden die Retentionszeiten der enzymatisch produzierten β -Me-Phe-Diastereomere mit den Retentionszeiten der chemisch synthetisierten Standards verglichen (Abschnitt 3.5.7). Diese RP-HPLC-ESI-MS Analyse zeigte die Koelution eines enzymatisch hergestellten β -Me-Phe-Diastereomers ($t_R = 16.7$ min) mit dem Standard (2*S*,3*R*)- β -Methyl-Phenylalanin ($t_R = 16.6$ min) (Abb. 4.21, rote und grüne Spur). Im Gegensatz dazu koeluiert das zweite enzymatisch produzierte Diastereomer ($t_R = 17.4$ min) mit dem Standard (2*S*,3*S*)- β -Me-Phe ($t_R = 17.5$ min) (Abb. 4.21, rote und blaue Spur).

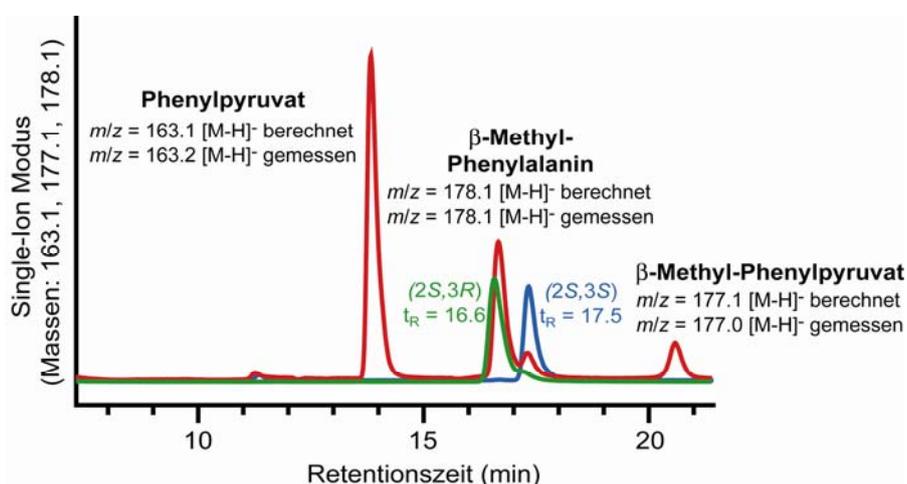


Abbildung 4.21: Zuordnung der Peaks von enzymatisch produzierten β -Methyl-Phenylalanin-Diastereomeren. SIM-Chromatogramme der HPLC-MS Analysen (detektierte [M-H]⁻ Massen: 163.1, 177.1 und 178.1). Grüne Spur: Synthetischer Standard von (2*S*,3*R*)- β -Me-Phe eluiert nach 16.6 min. Blaue Spur: Synthetischer Standard von (2*S*,3*S*)- β -Me-Phe eluiert nach 17.5 min. Rote Spur: Das erste enzymatisch produzierte β -Me-Phe-Diastereomer wird nach 16.7 min beobachtet und koeluiert damit mit (2*S*,3*R*)- β -Me-Phe. Der zweite Produktpeak ($t_R = 17.4$ min) kann dem (2*S*,3*S*)- β -Me-Phe-Diastereomer zugeordnet werden.

Das (2*S*,3*R*)- β -Me-Phe-Diastereomer wird während der enzymatischen Reaktion in einem ca. 2.5-fachen Überschuss gebildet, obwohl ausschließlich das (2*S*,3*S*)- β -Me-Phe-Diastereomer in das Manno-peptimycin-Peptidgerüst eingebaut wird.^[168] Um auszuschließen, dass sich die beiden gebildeten β -Methyl-Phenylalanin-Diastereomere in Lösung ineinander umwandeln, wurde die Reaktionsmischung 12 h bei Raumtemperatur gelagert und erneut mittels RP-HPLC-ESI-MS analysiert. Das erhaltene Chromatogramm stimmte mit dem in Abbildung 4.21 (rote Spur) gezeigten Chromatogramm überein, dass nach einer Inkubationszeit von 3 h aufgezeichnet wurde. Dies zeigte, dass die β -Me-Phe-Diastereomere stabil sind und sich nicht ineinander umwandeln.

4.3.6 Zeitabhängigkeit der MppJ-katalysierten Methylierungsreaktion

Um zu bestimmen, ob während der Methylierungsreaktion von Anfang an mehr (2*S*,3*R*)- β -Me-Phe gebildet wird, wurde die Reaktion zu definierten Zeitpunkten mit Methanol gestoppt und nach erfolgter Transaminierung wurden die Ansätze mittels RP-HPLC-ESI-MS analysiert (Abb. 4.22, Abschnitt 3.5.6). Die Chromatogramme zeigen, dass während der gesamten untersuchten Reaktionszeit die beiden β -Me-Phe-Diastereomere ((2*S*,3*R*):(2*S*,3*S*)) in einem Verhältnis von ca. 2.5:1 gebildet werden. Dies bedeutet, dass die nichtstereospezifische Methyltransferase MppJ die Methylierung von Phenylpyruvat katalysiert, wobei scheinbar die Bildung von (3*R*)-Methyl-Phenylpyruvat begünstigt ist.

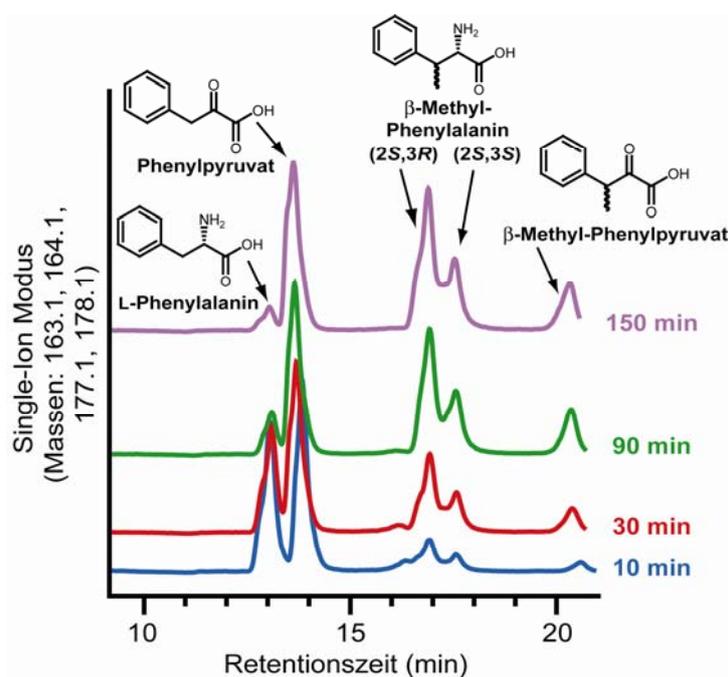


Abbildung 4.22: Zeitabhängigkeit der Methylierungsreaktion durch MppJ. Die SIM-Chromatogramme der HPLC-MS Analysen (beinhaltete [M-H]⁻ Massen: 163.1, 164.1, 177.1 und 178.1) zeigen den Reaktionsverlauf nach 10 min (blaue Spur), nach 30 min (rote Spur), nach 90 min (grüne Spur) und nach 150 min (violette Spur).

4.3.7 Untersuchung der Razemisierungssensitivität von (3*S*)- β -Methyl-Phenylpyruvat

Um zu untersuchen, ob die Methyltransferase MppJ wirklich unterschiedliche Mengen an Diastereomeren generiert und dieses Verhältnis der β -Me-Phe-Diastereomere nicht durch Razemisierung nach der Methylierungsreaktion entsteht, wurde der chemisch synthetisierte Standard von (2*S*,3*S*)- β -Me-Phe mit Hilfe der Transaminase IlvE und dem Aminogruppenakzeptor 3-Methyl-2-Oxobutyrat transaminiert. Das entstandene (3*S*)- β -Methyl-Phenylpyruvat wurde 12 h bei Raumtemperatur gelagert, um eventuell eintretende Razemisierung zu erlauben. Anschließend wurde erneut transaminiert und das Reaktionsgemisch mit Hilfe von RP-HPLC-ESI-MS analysiert (Abb. 4.23, Abschnitt 3.5.8). Die SIM-Chromatogramme der einzelnen Reaktionsschritte zeigen, dass mit dem ersten

Transaminierungsschritt quantitativ β -Methyl-Phenylpyruvat ($m/z = 177.1$ $[M-H]^-$ berechnet; $m/z = 177.0$ $[M-H]^-$ gemessen) erhalten wurde. Der zweite Transaminierungsschritt verlief auch nahezu quantitativ und es wurden die beiden β -Methyl-Phenylalanin-Diastereomere erhalten ($m/z = 178.1$ $[M-H]^-$ berechnet; $m/z = 178.2$ $[M-H]^-$ gemessen). Es zeigte sich, dass ca. 19% des Produktes als $(2S,3R)$ - β -Me-Phe-Diastereomer vorliegt. Dies bedeutet, dass $(3S)$ - β -Methyl-Phenylpyruvat in Lösung zu $(3R)$ - β -Methyl-Phenylpyruvat konvertiert werden kann.

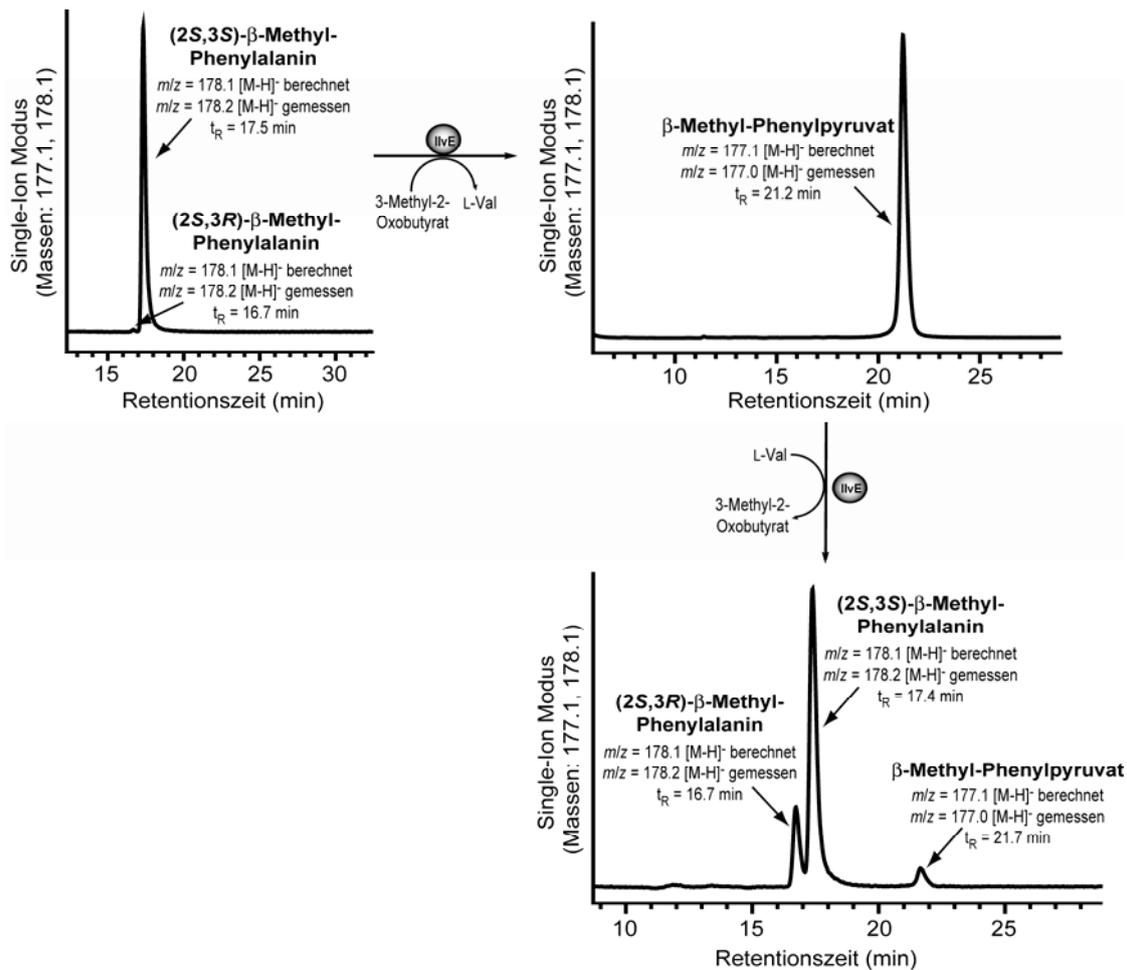


Abbildung 4.23: Untersuchung der Razemisierungssensitivität von β -Methyl-Phenylpyruvat. Chemisch synthetisiertes $(2S,3S)$ - β -Me-Phe wurde durch IlvE zu $(3S)$ - β -Methyl-Phenylpyruvat transaminiert. Nach 12 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut mit IlvE transaminiert. Die SIM-Chromatogramme der HPLC-MS Analyse (beinhaltete $[M-H]^-$ Massen: 177.1 und 178.1) zeigen, dass $(3S)$ - β -Methyl-Phenylpyruvat teilweise razemisiert ist, da auch $(2S,3R)$ - β -Me-Phe im Reaktionsgemisch detektiert wurde.

5. Diskussion

5.1 Biosynthese der N^{δ} -modifizierten Ornithin-Bausteine aus Coelichelin

Viele Organismen benötigen Eisen für zahlreiche Stoffwechselwege, allerdings wird freies Fe(II) häufig spontan zu Fe(III) oxidiert, das stabile Hydratkomplexe ausbildet und dann den Mikroorganismen nicht mehr zur Verfügung steht. Um trotzdem Eisen aus der Umgebung aufnehmen zu können, produzieren viele Prokaryoten und Eukaryoten Siderophore, die eine hohe Affinität zu Fe(III) und eine große strukturelle Vielfalt aufweisen.^[8] Mit Hilfe dieser kleinen Moleküle kann den Zellen Fe(II) zur Verfügung gestellt werden. Eine Gruppe dieser Naturstoffe bilden die Hydroxamat-Siderophore. Mit den Hydroxamat-Gruppen, wie sie auch in dem Siderophor Coelichelin aus *Streptomyces coelicolor* enthalten sind,^[61] kann Eisen komplexiert und somit in die Zellen transportiert werden.^[8] In die Biosynthese dieser Hydroxamat-Siderophore sind meistens Flavin-abhängige Monooxygenasen involviert, die die Hydroxylierung von aliphatischen und somit nukleophilen Amin-Substraten katalysieren.^[74] Diese Enzymklasse gehört der großen Gruppe von so genannten Modifikationsenzymen an, die *in trans* nicht-ribosomal synthetisierte Peptide modifizieren oder in die Biosynthese von Bausteinen für die NRP Synthese involviert sind.^[66] Man findet z.B. in *Rhizobium etli* CFN42 die FAD-abhängige Monooxygenase VbsO, die die N^{δ} -Aminogruppe von L-Ornithin während der Biosynthese des zyklischen Trihydroxamat-Siderophors Vicibactin hydroxyliert.^[145] Außerdem ist die L-Ornithin hydroxylierende Monooxygenase PvdA in die Biosynthese von Pyoverdin aus *Pseudomonas aeruginosa* involviert^[72] und die Monooxygenase IucD aus *Escherichia coli* katalysiert die Hydroxylierung der N^{ϵ} -Aminogruppe von L-Lysin, das in das Siderophor Aerobactin eingebaut wird.^[77] Eine weitere Modifikation, die an diesen hydroxylierten Aminosäure-Bausteinen stattfinden kann, ist eine Formylierungsreaktion katalysiert durch so genannte Formyltransferasen. Bisher konnte allerdings nur gezeigt werden, dass die putative Formyltransferase PvdF für die Biosynthese von Pyoverdin benötigt wird. Eine biochemische Charakterisierung dieses Enzyms wurde noch nicht durchgeführt.^[73] Allerdings wurde die Aktivität von Methionyl-tRNA Formyltransferasen, die in die Initiation der Proteinbiosynthese involviert sind, *in vitro* gezeigt.^[208]

Mit dieser Arbeit konnte der Biosyntheseweg des N^{δ} -Hydroxy-Ornithin-Bausteins aufgeklärt werden, der über nicht-ribosomale Peptidsynthese in das Siderophor Coelichelin eingebaut

wird. Die Monooxygenase CchB katalysiert, NADPH- und FAD-abhängig, spezifisch die Hydroxylierung von freiem L-Orn, wodurch gezeigt werden konnte, dass die Hydroxylierung dieser Aminosäure den ersten Schritt in der Biosynthese von Coelichelin darstellt. Für diese Reaktion wurden auch die kinetischen Parameter bestimmt.

Im Bezug auf die putative Formyltransferase CchA, die die vermutlich N^{10} -fH₄F-abhängige anschließende Formylierung der N^{δ} -Aminogruppe von N^{δ} -Hydroxy-Ornithin katalysiert, konnte trotz verschiedener Ansätze keine Aktivität des rekombinanten Proteins *in vitro* gefunden werden, wodurch dieser Biosyntheseschritt noch ungeklärt ist.

5.1.1 Biochemische Charakterisierung der Monooxygenase CchB

Sequenzanalyse:

Durch den Sequenzvergleich von CchB mit den bekannten FAD- und NADPH-abhängigen Monooxygenasen VbsO,^[209] IucD^[210] und PvdA^[200] (Abb. 5.1), konnte das *cchB* Gen aus dem Biosynthese-Gencluster von Coelichelin als putative FAD-abhängige Monooxygenase identifiziert werden, die vermutlich in die N^{δ} -Hydroxy-Ornithin-Synthese involviert ist.^[148]

VbsO	MTVAFTRRDALNEPLDLA	GIGIGF	SNLSLACLESVP-----EVRSRF	43
IucD	-----MKKSVD	IGVGTGF	FNLSIAALSHQIE-----ELDCLF	33
PvdA	--MTQAT--ATAVVHDLI	GIGFGF	SNIALAIALEERARTQG---ELQVLF	43
CchB	--MSQVLPADSTLVHDLI	GIGFGF	SNVAMAIAIREHNAQAGQEELDARF	48
		*: *:* ** *:::*	..	*: *
VbsO	FERRGAFDWHPGMMMPGVELQSSFLKDLVTPVLP		TSRWSFVSYLVAHKRL	93
IucD	FDEHPHFSWHPGMLVPDCHMQTVFLKDLVSAVAPTNPYSFVN		YLKHKKF	83
PvdA	LDKQADYRWHGNTLV		SQSELQISFLKDLVSLRNPTSPYSFVN	93
CchB	FEQQPRFGWHRGMLIDDATMQV		SFLKDLVTLRNPASRYSFLCYLQSRGRL	98
	::: : ** . :	:* *****:	*: . :**:	** : ::
VbsO	YAFLNANYDAVPRQEFARYLAWVANGVDGLR----		YATDIHDVEHRDDR-	138
IucD	YRFLTSRLRTVSREEFSDYLRWAAEDMNNLY----		FSHTVENIDFDKRR	129
PvdA	VDFINLGTFFPCRMEFNDYLRWVAGHFAEQSRYGEEVLS		VEPMLVERKVE	143
CchB	IDFINHKNLFPLRVEFHDFEWAAAKVDDMVSYGHEV		GVGAPVVRDGVVD	148
	*: .	* *: *: *.*	:	:
VbsO	-FVLRFDNGQEE-----AKNLVI	GTGSSP	FVPDWA	181
IucD	LFLVQTSQGEYF-----ARNICL	GTGKQ	FYLPPCVK-HMT-QSCFHASEM	172
PvdA	ALRVTSRNAEGEELV		RTTRSVVVSAGGTR	193
CchB	HLEVTVRSGEGL		EVHR-ARNLVVTGLR	194
	: :	: :	::: ::* * :*	. : * *
VbsO	KSRLKDLRAAR-----IVVVG		GGQSGGE-VVEALLGTPDAMKELI	225
IucD	NLRRPDL		SGKR-----ITVVG	217
PvdA	LERMLKQPCVNGQ		PMKVAIIGGGQSAAEAFIDLNDSYP--SVQVDLILRG	241
CchB	LSRVD		TLEGTS--PSRFVVV	240
	:	:::*.***.:	.	:: :

VbsO	HNFEPIINDTFFSNQVFSPEYVQAYLKLSGEQKQAALKNSILTS DGLSIST	275
IucD	NNFNALDEAAFADEYFTPEYISGFSGLEEDIRHQLLDEQKMTSDGITADS	267
PvdA	SALKPADDSFPVNEVFAPEFTDLIYNQEGAERERLVREYHNTNYSVVDID	291
CchB	YGYSPADDSAFANRIFDPAAVDDYFTAPDGVKQRLMDYHGNTNYSVVDID	290
	.. : : : * : . * * . : . : * . : :	
VbsO	IHSIYRRLYALRYLDQSTLTASLSPNRDVIQMERDGNAYRLIVRNHFDGG	325
IucD	LLTIYRELYHRFEVLRKPRNIRLLPSRSVTTLLESSGPGWKLMEHHLDQG	317
PvdA	LIERIYGIIFYRQKVSQVPR-HAFRSLRSVEKATAGAEGIELALRNTANGE	340
CchB	LIDDLYRQMYREKVLGTER-LRFLNVSRLSDVKETPDRVRATVTSLVTGE	339
	: : : : : : . :	
VbsO	IEVLHADAVVLATGYRFRLP-DALGSLSERISLDRNGYPTLNDDYTMQWT	374
IucD	RESLES DVVIFATGYRSALP-QILPSLMLPLITMHDKNTFKVRDDFTLEWS	366
PvdA	LSVQRYDLVILATGYERQLHRQLLLEPMAD-----YLGDFEVDNRNYRLITD	385
CchB	ESHLDADVVVLATGYGPADPLGLLGEVADRCLRDDEGRVVRVERDYRVTTD	389
	* * : : * * * * * * : . : : :	
VbsO	GPRTNRLFAQNAGRYSHGIADSQSLMAWRS AKIVNTLLGRQHFD AEPDN	424
IucD	GPKENNIFVFNASMQTHGIAEPQLSLMAWRSARILNRVMGRDLFDLSMPP	416
PvdA	QRCQASIYMQGFCQASHGLSDTLLSVLPVRAEEISGSLYQHLKPGT-AA	433
CchB	PALRCGIYLGQGETEHTHGITSSLLSNTAVRVGEIILESLLDRGLESASDEV	439
	: : . : * * : : . * . * : :	
VbsO	AQLVWATEAASAMPHQLRAGYS DGLLSS	452
IucD	ALIQRSGT-----	425
PvdA	RALHEHALAS-----	443
CchB	RTVADGTGTGAR-----	451
	: :	

Abbildung 5.1: ClustalW Sequenzvergleich von CchB mit bekannten Flavin-abhängigen Monooxygenasen. Das konservierte FAD-Bindungsmotiv ist rot unterlegt und die konservierte NADPH-Bindungsstelle ist grün unterlegt. Zusätzlich wurde der konservierte Teil der Substratbindestelle blau dargestellt. Die in allen gezeigten Sequenzen konservierten Positionen sind mit einem Stern markiert und Positionen mit konservierten Substitutionen sind mit zwei Punkten markiert. An mit einem Punkt markierten Positionen werden halb-konservierte Substitutionen beobachtet.

Die N^{δ} -Ornithin-Monooxygenasen VbsO, PvdA und PsbA und die N^{ϵ} -Lysin-Monooxygenase IucD weisen Sequenzidentitäten zu CchB von 31%, 39%, 38% und 34% auf. Diese Werte demonstrieren die große Homologie dieser Monooxygenasen. Sie weisen drei konservierte Regionen auf, wovon zwei als Nukleotid-Bindungsstellen bezeichnet werden. Die N-terminale Nukleotid-Bindungsstelle (GXGXXG) komplexiert FAD und die zweite konservierte Region (GXGXXG) ist für die Bindung von NADPH verantwortlich.^[211] Dabei ist auffällig, dass in allen bekannten *N*-hydroxylierenden Enzymen, die in Siderophor-Biosynthesen involviert sind, der jeweils letzte Glycin-Rest durch ein Prolin ersetzt wurde (Abb. 5.1).^[212] Die dritte konservierte Region in der Nähe des C-Terminus der Proteine (DXXXL/FATGYXXXXP) ist wahrscheinlich in die Substratbindung involviert, wobei das Kernmotiv L/FATGY eine hydrophobe Tasche bildet. Der konservierte Aspartat-Rest dieses Motivs könnte als Base agieren und so die Reaktivität der zu hydroxylierenden Aminogruppe des Substrats steigern.^[212]

Katalysemechanismus:

Es konnte gezeigt werden, dass CchB in Gegenwart von NADPH, FAD und O₂ die Hydroxylierung der N^δ-Aminogruppe von L-Orn katalysiert und so der Baustein N^δ-Hydroxy-Ornithin generiert wird (Abb. 4.2 und 4.3). Folgender Reaktionsmechanismus kann für die Hydroxylierung angenommen werden (Abb. 5.2):

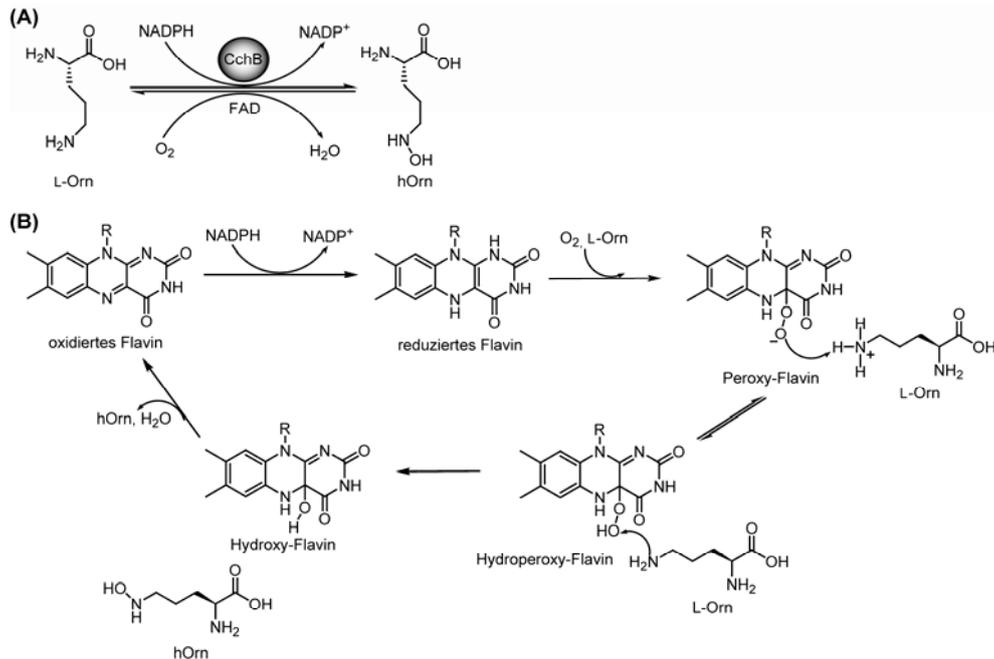


Abbildung 5.2: Möglicher Reaktionsmechanismus für die CchB-katalysierte Hydroxylierung von L-Ornithin. (A) Darstellung der katalysierten Reaktion. (B) Detaillierter Mechanismus mit den während des Katalysezyklus gebildeten Flavin-Spezies, wobei nur die katalytisch interessante Region von FAD dargestellt ist. R = FAD-Molekül-Rest (komplette Darstellung in Abb. 1.6 in Abschnitt 1.2.1)

Im ersten Reaktionsschritt wird durch die Oxidation von NADPH zu NADP⁺ das FAD zu FADH₂ reduziert. Mit molekularem Sauerstoff wird dann eine Peroxy-Flavin-Spezies gebildet, die eventuell durch Deprotonierung des Substrats L-Ornithin in eine Hydroperoxy-Flavin-Spezies umgewandelt wird.^[94] Anschließend findet der nukleophile Angriff der Seitenketten-Aminogruppe auf ein Sauerstoffatom dieser Flavin-Spezies statt. Diese Reaktion bringt die hydroxylierte Aminosäure und ein Hydroxy-Flavin-Molekül hervor. Durch Dissoziation des Produkts und eines Wassermoleküls wird der katalytische Zyklus vollendet und FAD wird regeneriert.^[74]

Wie in Abschnitt 4.1.2.1 erwähnt, muss das zu hydroxylierende Substrat nicht an CchB gebunden sein, um die Reduktion von FAD durch NADPH zu initiieren. Dies wurde auch für die N^δ-L-Ornithin-Monooxygenase PvdA beobachtet, die genau wie CchB H₂O₂ freisetzt, wenn kein Substrat vorhanden ist.^[94] Diese Beobachtung bestätigt die Annahme, dass während der Hydroxylierungsreaktion eine Hydroperoxy-Flavin-Spezies gebildet wird, die entweder zu FAD und H₂O₂ zerfällt oder eine Hydroxy-Gruppe auf die Seitenkette von L-Orn

überträgt. Wie in Abschnitt 1.2.1 der Einleitung gezeigt, existieren zwei mögliche Mechanismen für Hydroxylierungsreaktionen durch Flavin-abhängige Monooxygenasen. So muss im Fall der *p*-Hydroxybenzoat-Monooxygenase (PHBH) aus *Pseudomonas fluorescens* das Substrat am Enzym gebunden vorliegen, damit die Reduktion von FAD stattfindet.^[90] Im Gegensatz dazu wurde für die Flavin-enthaltende Monooxygenase (FMO) aus Leber Mikrosomen beobachtet, dass die NADPH-vermittelte FAD-Reduktion auch in Abwesenheit des Substrats stattfindet. Hierbei wurde außerdem festgestellt, dass die gebildete Hydroperoxy-Flavin-Spezies mit einer Halbwertszeit von ca. 2 h relativ stabil ist und so auf die Substratbindung „warten“ kann.^[91] Die Monooxygenase CchB gehört also zu der Enzymklasse, die auch ohne Substratbindung NADPH-Oxidations-Aktivität aufweist. Aufgrund dieser mechanistischen Gegebenheiten und der Sequenzanalyse kann CchB der Klasse B von Flavoprotein-Monooxygenasen zugeordnet werden (siehe Abschnitt 1.2.1). Auch in der Enzymklasse der Fe(II)-/ α KG-abhängigen Oxygenasen wurde für einige Enzyme beobachtet, dass das Kosubstrat in Abwesenheit des Substrats umgesetzt wird. So zersetzt z.B. die Prolyl-4-Hydroxylase in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff das gebundene α KG. Außerdem wird für diese Reaktion Ascorbat benötigt, um das Eisenzentrum für einen neuen Katalysezyklus zu regenerieren.^[101]

Substratspezifität und kinetische Parameter:

Die rekombinante Monooxygenase CchB weist eine hohe Substratspezifität auf. Es wird nur L-Ornithin hydroxyliert und weder das D-Isomer von Orn noch N^{δ} -Formyl-Ornithin werden als Substrate akzeptiert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ein SNAC-aktiviertes Tetrapeptid als Coelichelin-Analogon kein Substrat für CchB-vermittelte Hydroxylierung ist (Tabelle 4.1). Damit konnte gezeigt werden, dass die Hydroxylierung von L-Orn als erster Schritt in der Biosynthese von Coelichelin stattfinden muss. Auch viele andere Flavin-abhängige Monooxygenasen weisen eine hohe Substratspezifität auf. So hydroxyliert z.B. IucD spezifisch L-Lysin^[210] und VbsO^[145] und PvdA^[213] akzeptieren nur L-Ornithin als Substrat. Außerdem ist die PHBH spezifisch für *p*-Hydroxybenzoat.^[214] Bezüglich der Kosubstrat- und Kofaktorspezifität wurde festgestellt, dass CchB nur dann Aktivität aufweist, wenn NADPH und FAD anwesend sind. NADH und FMN werden nicht akzeptiert. Dies wurde auch bei der Monooxygenase PvdA beobachtet.^[213] Im Gegensatz dazu findet die IucD-katalysierte Hydroxylierung von L-Lysin auch dann statt, wenn NADH anstatt NADPH als Kosubstrat verwendet wird.^[215]

Die erhaltenen kinetischen Parameter für CchB sind vergleichend mit denen anderer Flavin-abhängiger Monooxygenasen in Tabelle 5.1 dargestellt.

Tabelle 5.1: Kinetische Parameter für CchB, VbsO, PvdA und IucD.

Enzym	Substrat	K_M (mM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{min}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$)
CchB	L-Ornithin	3.6 ± 0.58	17.4 ± 0.87	4.83 ± 0.64
VbsO ^[145]	L-Ornithin	0.305 ± 0.024	108 ± 2	354.10
PvdA ^[72]	L-Ornithin	0.593 ± 0.012	26.4 ± 0.4	44.52
IucD ^[210]	L-Lysin	0.11	n.b. ^a	n.b. ^a

^a n.b.: nicht bestimmt

Der K_M -Wert von CchB für L-Orn ist um eine Zehnerpotenz größer als die bekannten Werte von PvdA und VbsO für L-Orn und von IucD für L-Lys, liegt aber trotzdem in der gleichen Größenordnung. Dies bedeutet, dass CchB eine etwas geringere Affinität zu dem Substrat aufweist. Auch die katalytische Effizienz von CchB ist im Vergleich zu VbsO und PvdA um etwa das hundert- bzw. zehnfache verringert. Man muss allerdings beachten, dass alle hier gezeigten Werte *in vitro* erhalten wurden und deshalb nicht vollständig die Situation *in vivo* widerspiegeln können.

5.1.2 Biochemische Charakterisierung der putativen Formyltransferase CchA

Sequenzanalyse:

Das *cchA* Gen aus dem Biosynthese-Gencluster von Coelichelin konnte durch Sequenzvergleich mit Formyltransferasen als putative N^{10} -fH₄F-abhängige Formyltransferase identifiziert werden. Die Sequenzen einer bekannten Methionyl-tRNA Formyltransferase (MTF) aus Rinderleber,^[208] einer putativen Formyltransferase aus *Pseudomonas aeruginosa* (PvdF)^[73] und einer putativen Formyltransferase aus *Mycobacterium smegmatis* (FxbA)^[216] wurden mit der Aminosäuresequenz von CchA verglichen (Abb. 5.3).

FxbA	-----MWGSLKPPPNLP-----ESWVF	17
CchA	-----	
MTF	MRVLLRCCCGHLPVGGGAGRRSNPRWRALARLSASPGWEDGQGARVREKP	50
PvdF	-----	
FxbA	PVRVVMFGYQTWGHRITLQALLKSRHEVCLVVTHPTSDHAYESIWADSVED	67
CchA	-MRVVMFGYQTWGHRITLRALLDSEHDVVLVVTHPRSEHAYEKIWSDSVAD	49
MTF	PWRVLFVFGNDQFARETLRALHAAR-----ENKEEELIEKLEVVTVPVS	92
PvdF	-----MKKRKLAYIWSLR-----NAAADKAGQYVPY	26
	: . . * : *	

FxbA	LARGAGIEVLLAKRTTP-ELVER--VRELAPDVGVANNWRTRLPRELFSEI	114
CchA	LAEEHGVPLIRNRPDDDELFER--LKDADPDIIVANNWRTWIPPRIFGL	97
MTF	PSP-KGLPVKQYAVQSQLPVYEWPDVGSGEYDVGVVASFGRLLSEAFILK	141
PvdF	KGEERYMKSVLLESLVEG---LNQTSLGEAYELVGVYDDDAGLPRDQEKI	73
	. : : : * . :	
FxbA	PKYGTVNLHDSLLPKFTGFSFVWISLISGAGQTGLTAHFMD-DELDTGDI	163
CchA	PRHGTNLNVHDSLLPKYAGFSPLIWALINGETEVEGVTAHMMN-DELDAGDI	146
MTF	FPYGI LVHPSCLPRWRG PAPIIHTILHGDTIAGVTIMQIKPRRFVDVGP	191
PvdF	RDYG-FAYRPGQQWFYPADLQVQKTLN-DLLLSVPSTYRRYPRGTPEHV	121
	:* . : . : . : : : . : . :	
FxbA	LLQRSVEITPTSTGTSLVYDTLDLIPDVLEDALDAIENGTATPVPQDLSQ	213
CchA	VRQEAVPVGPADTATDLFHKTVDLIAPVTVGALGLIASGQTEFTKQDRSR	196
MTF	LKQETVPVPPKSTSKLEAVLSRLGANMLISVLKNLPESLNNGRQQPAEG	241
PvdF	AGKSDFERRLHDTLVLELGADVVDLDG-----LLVILDELVRPGAPFARRI	166
	: . * * * * : .	
FxbA	RTFFHKRSRDRSLVDWSWP-AADIERFIRALSDPYPNAYTYFRGETATPD	262
CchA	ASFFHKRSAEDIRIDWNWP-AEDLERLVRAQSEPYPSAFTFHRGR-----	240
MTF	VTHAPKISAATSCIKWEEQTSEQIFRLYRAVGNIIPLQTLWMDNT-----	286
PvdF	MNIHPGVTTREDSFYERRGA-YATLDALYGARGEKVVVDWSTLEKVA-----	210
	. : . : : * . :	
FxbA	LCPRLEMHLRWHARTCVHRRRERYGDRRGRRRVPRKVTGSGSRRGAHRRR	312
CchA	---RLEILAAVVS-----EARYGGTPG-RIFYREGEDVVIVAGADARR	279
MTF	--IKLLDLVEVDNSILSDSKLTGQAVIPGSVIYHKQSQILLVCKDDWIG	334
PvdF	-----VEPLYWTGASFHYVDNGIDSGEVFDVLT	240
	. :	
FxbA	HRPLGTRLLRARWRIPDRHTGIRYRLTTRA-CRDARGTIRGVPGLAGRR-	360
CchA	GRNHGLAITRVRTEDGRELAATEYFTSMGG-YLTAR-----P-----	315
MTF	VRSMMLKKTLTATDFYNGYLHPWYQKNSQAQPSQCRFQTLRLPPKKKQKK	384
PvdF	EISPEDTILELRWNNFNNSLFPALHEGLALLAEKG-----	275
FxbA	-----	
CchA	-----	
MTF	KIVAMQ	390
PvdF	-----	

Abbildung 5.3: ClustalW Sequenzvergleich von CchA mit bekannten und putativen N^{10} -Formyltetrahydrofolat-abhängigen Formyltransferasen. Das nahezu konservierte Formyltetrahydrofolat-Bindemotiv ist rot unterlegt. In der Sequenz von PvdF kann dieses Motiv allerdings nicht identifiziert werden. Die in allen gezeigten Sequenzen konservierten Positionen sind mit einem Stern markiert und Positionen mit konservierten Substitutionen sind mit zwei Punkten markiert. An mit einem Punkt markierten Positionen werden halb-konservierte Substitutionen beobachtet.

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen NADPH- und FAD-abhängigen Monooxygenasen (Abschnitt 5.1.1) zeigen die Sequenzvergleiche der Formyltransferasen eine geringere Homologie. CchA weist Sequenzidentitäten zu den N-terminalen Domänen von FxbA und MTF von ca. 50% und 25% auf. In der Sequenz von CchA konnte das für Formyltransferasen vorgeschlagene Kernmotiv INV/LHXSLLPXXRG identifiziert werden (Abb. 5.3).^[217] Dieses beinhaltet das bekannte Formyltetrahydrofolat-Bindemotiv SLLP im N-terminalen Teil des

Proteins.^[218] Daher kann angenommen werden, dass CchA als Formyltransferase N^{10} -fH₄F-abhängig in die Biosynthese von N^{δ} -Hydroxyformyl-Ornithin involviert ist.^[148] Allerdings konnte für die Formylierungsdomäne LgrA₁-F, eine NRPS-assoziierte Formylierungsdomäne aus dem Gramacidin-Biosynthese-Gencluster, gezeigt werden, dass die Formylierungsreaktion auch mit N^5 -fH₄F als Kosubstrat stattfindet.^[52]

Untersuchungen zur CchA-Aktivität:

Für die Übertragung der Formylgruppe auf N^{δ} -Hydroxy-Ornithin wird Formyltetrahydrofolat benötigt (Abb. 5.4 (A)). Neben dem kommerziell erhältlichen N^5 -fH₄F ist N^{10} -fH₄F der in der Natur häufiger vorkommende Formylgruppendonor. Um dieses Kosubstrat verwenden zu können, musste es *in situ* hergestellt werden. Zwei Möglichkeiten für diese Reaktion wurden in dieser Arbeit in Betracht gezogen. Zum einen wurde mit dem rekombinanten Enzym FoID aus *Methanosarcina barkeri* aus Tetrahydrofolat mit NAD⁺ und Formaldehyd das Kosubstrat hergestellt und zum anderen wurde N^{10} -fH₄F aus Tetrahydrofolat, Ammoniumformiat und ATP mit Hilfe der Formyltetrahydrofolat Synthetase (FTHFS) aus *Clostridium thermoaceticum* generiert (Abb. 5.4 (B)).^[191,192,194,219]

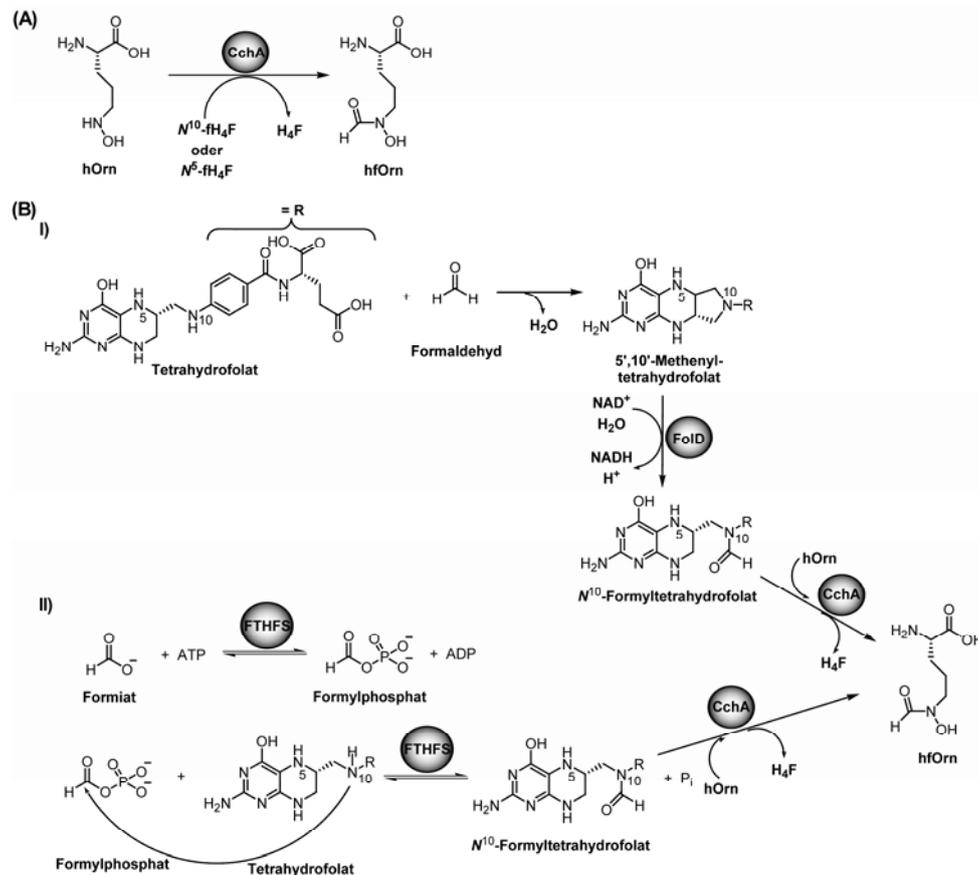


Abbildung 5.4: CchA-katalysierte Reaktion und *in situ* Generierung des benötigten Kofaktors. (A) Vermutete Formylierungsreaktion von hOrn zu hfOrn katalysiert durch CchA. (B) I) Enzymatische Synthese von N^{10} -Formyltetrahydrofolat durch das rekombinante Enzym FoID. II) Synthese von N^{10} -fH₄F durch die Formyltetrahydrofolat Synthetase.

Während dieser Arbeit wurden beide Synthesewege für die Herstellung von N^{10} -Formyltetrahydrofolat angewendet. Außerdem wurde das stabilere N^5 -fH₄F in den Aktivitätsassays von CchA eingesetzt und es wurden mehrere Aminosäuren als Substrate getestet, doch es konnte keine Aktivität von CchA detektiert werden. Neben dem chemisch synthetisierten Vorläufer N^5 -Hydroxy-Ornithin wurde auch enzymatisch hergestelltes hOrn als Substrat für CchA eingesetzt. Mit diesem gekoppelten Hydroxylierungs-Formylierungs-Assay sollten eventuell benötigte Protein-Protein-Interaktionen zwischen der Monooxygenase CchB und der Formyltransferase CchA ermöglicht werden. Dies wurde bereits in der Biosynthese von Pyocyanin aus *Pseudomonas aeruginosa* beobachtet, wo die SAM-abhängige Methyltransferase PhzM nur in Anwesenheit der Flavin-abhängigen Monooxygenase PhzS Aktivität zeigt.^[220] Allerdings konnte auch mit diesem Ansatz kein Umsatz von hOrn zu hfOrn beobachtet werden. Es ist auch denkbar, dass die Formyltransferase CchA nur PCP-gebundenes hOrn als Substrat akzeptiert, da auch einige Modifikationsenzyme bekannt sind, die PCP-gebundene Aminosäuren modifizieren.^[62,71] Dies konnte allerdings nicht überprüft werden, da N^8 -Hydroxy-Ornithin zunächst mit Coenzym A als Thioester aktiviert werden musste, bevor die Aminosäure auf *holo* CchH-PCP₁ geladen werden konnte (siehe Abschnitt 3.4.4 und 3.5.5). Die Aktivierung des C-Terminus als labiler Thioester führte zu einer sofortigen Zyklisierung der Ornithin-Seitenkette mit dem Carbonyl-Kohlenstoffatom und einer Spaltung der Thioesterbindung (Abb. 4.7). Daher konnte hOrn-S-CchH-PCP₁ nicht als Formylgruppenakzeptor getestet werden. Bezüglich der Aktivität von Formyltransferasen, die Seitenketten-Aminogruppen von Aminosäuren formylieren, ist bisher nur für PvdF mit zellfreien Extrakten gezeigt worden, dass dieses Enzym die Formylierung von hOrn katalysiert. Rekombinantes, gereinigtes Protein wurde bisher noch nicht auf Aktivität getestet.^[73] Allerdings wurde gezeigt, dass das rekombinante Initiationsmodul der Gramacidin-Synthetase LgrA₁ Formylierungsaktivität aufweist. Hierbei wird jedoch die α -Aminogruppe von PCP-gebundenem Valin durch eine Formylierungsdomäne formyliert.^[52] Auch Methionyl-tRNA Formyltransferasen konnten *in vitro* als aktive Enzyme erhalten werden. Diese Beispiele zeigen, dass bisher nur wenige N^{10} -fH₄F-abhängige Formyltransferasen *in vitro* Aktivität aufweisen. Ein Problem hierbei könnte das instabile Kosubstrat N^{10} -fH₄F sein, das nicht lange genug stabil bleibt, um die Reaktion zu gewährleisten.

5.1.3 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Hydroxylierung der Ornithin-Seitenkette als erster Schritt in der Biosynthese von Coelichelin stattfindet. Durch die

Charakterisierung der Monooxygenase CchB wurde bewiesen, dass CchB selektiv L-Orn hydroxyliert und dass als Kosubstrat nur NADPH und als Kofaktor nur FAD akzeptiert werden. Vom chemischen Standpunkt aus betrachtet ist die Hydroxylierung von Aminogruppen durchaus möglich, allerdings zeigt z.B. die in dieser Arbeit verwendete Synthese (Abschnitt 3.4.2), dass mehrere Stufen für diese Funktionalisierung notwendig sind.^[182] Durch die Anwendung des rekombinanten Enzyms CchB kann diese Synthese unter milden Bedingungen in wässriger Lösung in einem Schritt durchgeführt und damit erheblich erleichtert werden.

Zwar konnte die sich anschließende Formylierung der Ornithin-Seitenkette *in vitro* nicht gezeigt werden, trotzdem kann die Biosynthese der N^δ -modifizierten Ornithin-Bausteine postuliert werden (Abb. 5.5). Außerdem war es nicht möglich, die Adenylierungsdomänen der NRPS CchH in löslicher Form als rekombinante Proteine durch Produktion in *E. coli* zu erhalten. Daher konnte die Spezifität der A-Domänen nicht *in vitro* untersucht werden. Allerdings konnten jeweils die acht spezifitätsvermittelnden Aminosäurereste zwischen den Kernmotiven A3 und A6 identifiziert werden.^[21] Durch Vergleich mit den Sequenzen von A-Domänen bekannter Spezifität, wie z.B. einer N^δ -Hydroxy-Ornithin-aktivierenden A-Domäne aus *Thermobifida fusca*^[221] (siehe auch Übersicht über Modifikationsreaktionen, Abschnitt 7), konnten die Bausteine, die von CchH aktiviert werden, identifiziert werden. Danach sollte die A-Domäne CchH-A₁, die das Motiv DINYWGGI aufweist, N^δ -Hydroxyformyl-Ornithin aktivieren und die A-Domäne CchH-A₃ (DMENLGLI) sollte für den Einbau von N^δ -Hydroxy-Ornithin verantwortlich sein.^[148] Der Sequenzunterschied dieser beiden A-Domänen legt nahe, dass sie unterschiedliche Substrate aktivieren und damit ist folgende Biosynthese für die N^δ -modifizierten Ornithin-Derivate plausibel (Abb. 5.5).

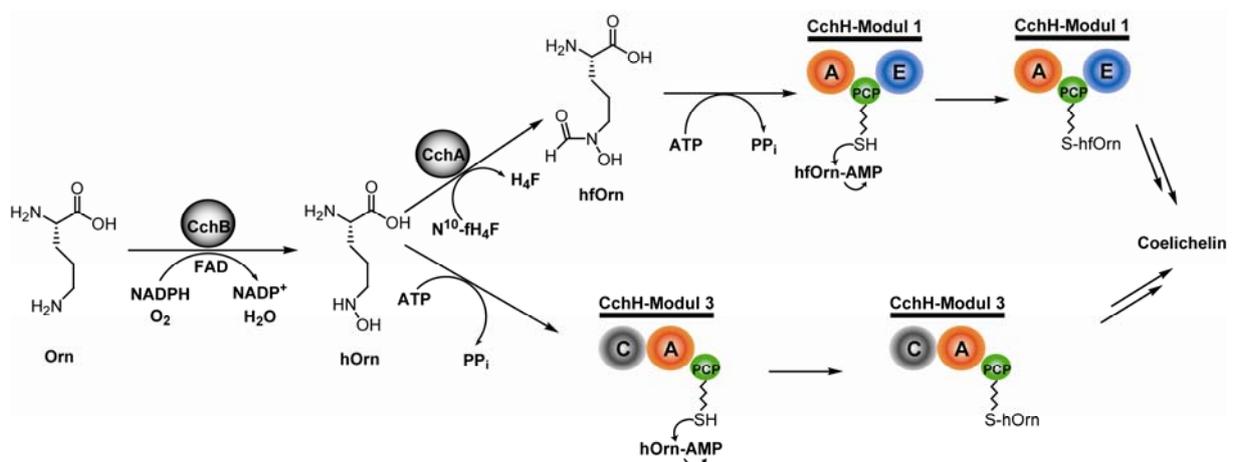


Abbildung 5.5: Schema zur Biosynthese von hOrn und hfOrn. Gezeigt sind neben den Reaktionen katalysiert durch Modifikationsenzyme auch die mögliche Aktivierung durch die Coelichelin NRPS CchH.

Nach der CchB-katalysierten Hydroxylierung von L-Orn wird N^{δ} -Hydroxy-Ornithin entweder durch die Formyltransferase CchA weiter funktionalisiert oder direkt durch die A-Domäne des dritten CchH-Moduls als hOrn-AMP aktiviert. Der N^{δ} -Hydroxyformyl-Ornithin-Baustein wird durch die Adenylierungsdomäne des ersten CchH Moduls als hfOrn-AMP aktiviert. Es ist allerdings auch denkbar, dass diese A-Domäne hOrn aktiviert und auf das PCP überträgt. Dann würde die CchA-katalysierte Formylierungsreaktion an PCP-gebundenem hOrn stattfinden. Diese Möglichkeit konnte allerdings aufgrund der Instabilität von CoA-aktiviertem hOrn in dieser Arbeit nicht untersucht werden (siehe Abschnitt 5.1.2). Wie bereits erwähnt werden die modifizierten Aminosäuren nach der Aktivierung durch die A-Domänen von dem entsprechenden PCP durch Thioesterbildung mit dem PCP-Kofaktor 4'-Phosphopantethein gebunden. Der Baustein hOrn wird dann durch die Kondensationsdomäne erkannt und Peptidbindungsbildung wird katalysiert. Der hfOrn-Baustein wird zunächst zu der Epimerisierungsdomäne transferiert, die den Baustein von der L- in die D-Konfiguration konvertiert. Dann wird auch dieser Rest von der folgenden C-Domäne erkannt und in die Peptidkette eingebaut. Nach der vollständigen Synthese des Peptidgrundgerüsts wird dieses von der Synthetase abgespalten und Coelichelin wird erhalten.

5.2 Strukturelle Erklärung für die *erythro* Stereospezifität der Monooxygenase VioC

Das nicht-ribosomal synthetisierte zyklische Pentapeptidantibiotikum Viomycin aus *Streptomyces vinaceus* gehört zur Familie der Tuberactinomycin-Antibiotika, die unter anderem antimikrobielle Aktivität gegen *Mycobacterium tuberculosis* aufweisen. Entscheidend für diese Aktivität ist der (2*S*,3*R*)-Capreomycin-Rest, der ausgehend von L-Arginin synthetisiert wird.^[155,156,222] Anhand von Sequenzvergleichen wurden zwei Gene im Biosynthese-Gencluster von Viomycin identifiziert, die für Modifikationsenzyme codieren, die die Bildung von (2*S*,3*R*)-Capreomycin katalysieren. Hierbei handelt es sich zum einen um die nicht-Häm Fe(II)- und α -Ketoglutarat-abhängige Monooxygenase VioC und zum anderen um die PLP-abhängige Aminotransferase VioD.^[158] Die von VioC-katalysierte C_{β} -Hydroxylierung von L-Arg und die anschließende Zyklisierung zu (2*S*,3*R*)-Capreomycin katalysiert von VioD wurden *in vitro* gezeigt.^[152,162,163] Außerdem konnte gezeigt werden, dass die A-Domäne der NRPS VioG selektiv (2*S*,3*R*)-Capreomycin aktiviert.^[159]

Das Enzym VioC kann zur Familie der Clavaminat Synthase (CAS)-ähnlichen Oxygenasen gezählt werden. Es zeigt hohe Sequenzidentitäten zu z.B. der nicht-Häm Eisen Oxygenase AsnO (36%) aus *Streptomyces coelicolor* A3(2),^[104] die in die Biosynthese des Calcium-abhängigen Antibiotikums (CDA) involviert ist. Außerdem findet man 33% Identität zu der Clavaminat Synthase aus *Streptomyces clavuligerus*, die die Hydroxylierung eines β -Laktam-Vorläufers katalysiert.^[223] Die nicht-Häm Eisen(II)- und α KG-abhängigen Oxygenasen katalysieren zahlreiche Reaktionen, wobei die hier untersuchte Hydroxylierung einer unreaktiven Methylengruppen nur ein Beispiel darstellt.^[95,224] Interessanterweise führt die C_β -Hydroxylierung von L-Arg durch VioC zu dem *erythro* Diastereomer (2*S*,3*S*)- β -Hydroxy-Arginin, obwohl in der Klasse der CAS-ähnlichen Oxygenasen zuvor meist die Bildung von *threo* Diastereomeren beobachtet wurde.^[103,104]

In dieser Arbeit wurde die Substratspezifität der Fe(II)-/ α KG-abhängigen Monooxygenase VioC untersucht und kinetische Parameter für die Hydroxylierungsreaktionen wurden bestimmt. Außerdem konnte anhand der erhaltenen Kristallstrukturen eines Substrat- und Produktkomplexes mit einer Auflösung von 1.1 Å bzw. 1.3 Å die zuvor bestimmte Stereochemie des Reaktionsprodukts bestätigt werden und die beobachtete ungewöhnliche Substrattoleranz von VioC konnte anhand der Koordination des Substrats im aktiven Zentrum erklärt werden.

5.2.1 Biochemische Charakterisierung der Monooxygenase VioC

Katalysemechanismus:

Für die C_β -Hydroxylierung von L-Arginin und L-Arginin-Derivaten durch VioC in Gegenwart von Fe(II), α KG und O₂ (Abb. 4.9) kann folgender Mechanismus postuliert werden (Abb. 5.6):

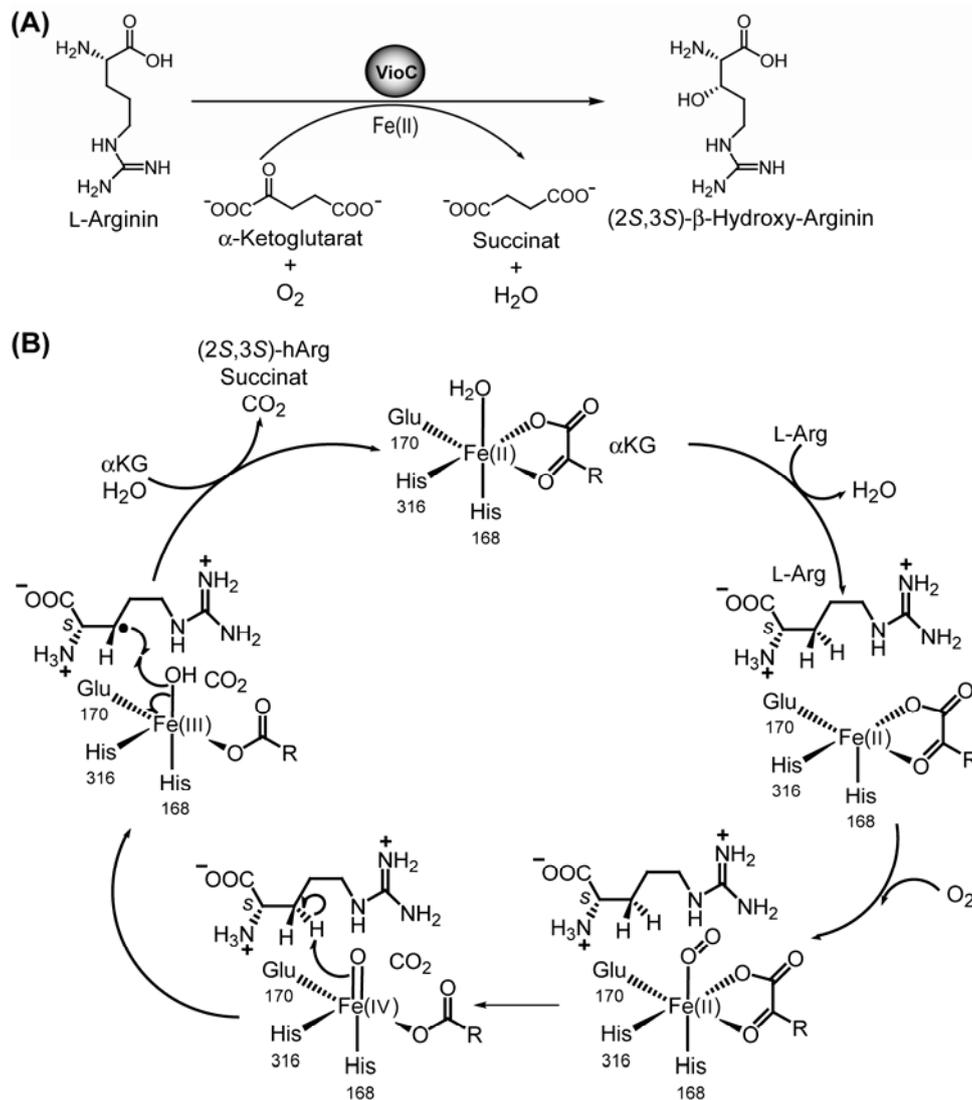


Abbildung 5.6: Möglicher Reaktionsmechanismus für die VioC-katalysierte Hydroxylierung von L-Arginin. (A) Darstellung der katalysierten Reaktion. (B) Detaillierter Mechanismus mit den in die $Fe(II)$ -Koordination involvierten Aminosäureresten und den während des Katalysezyklus gebildeten Eisen-Sauerstoff-Spezies.

Der katalytische Mechanismus von $Fe(II)$ -/ α KG-abhängigen Monooxygenasen wurde intensiv mit Hilfe der Röntgenstrahlen-Kristallographie und mit spektroskopischen Methoden untersucht.^[95,96,225] Diese Studien zeigten, dass Eisen durch Substratkoordination im aktiven Zentrum des zuvor gebildeten $Fe(II)$ • α KG•Enzym-Komplexes aktiviert wurde, um molekularen Sauerstoff zu binden. Das $Fe(II)$ •Sauerstoff-Addukt bildet dann eine $Fe(III)$ -Superoxo-Spezies, die wiederum die 2-Ketogruppe des Kosubstrates α -Ketoglutarat angreift. Durch den folgenden oxidativen Zerfall von α KG werden Succinat und CO_2 gebildet und die entstandene $Fe(IV)$ -Oxo-Spezies abstrahiert ein Wasserstoffradikal von der unaktivierten C_β -Methylengruppe des Substrates.^[102,106] Anschließend wird durch radikalische Rekombination eine Hydroxylgruppe auf das Substrat übertragen und $Fe(II)$ wird generiert, um den katalytischen Zyklus erneut starten zu können.^[95]

Substratspezifität und kinetische Parameter:

Die C β -Hydroxylierungsaktivität von VioC wurde bereits mit L-Arginin als Substrat, α KG und O $_2$ als Kosubstrate und Fe(II) als Kofaktor gezeigt (Abb. 4.9 (A)).^[152] In dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass auch die beiden L-Arg-Derivate L-Homoarginin und L-Canavanin von VioC hydroxyliert werden (Abb. 4.9 (B) und (C), Tabelle 4.3). Allerdings kann man beobachten, dass im Gegensatz zur quantitativen Umsetzung von L-Arg nur ca. 35% L-Homoarginin in 1.5 h umgesetzt werden. L-Canavanin wird sogar nur zu ca. 20% hydroxyliert. Diese Ergebnisse zeigen, dass das rekombinante Enzym Veränderungen der Arginin-Seitenkette toleriert, es können aber nur spezifische Atome verändert werden. So werden das D-Isomer von Arginin, N^G-Methyl-L-Arginin und N^G-Hydroxy-nor-L-Arginin nicht als Substrate von VioC erkannt (Tabelle 4.3). Eine genauere Diskussion der beobachteten Substratspezifität findet sich in Abschnitt 5.2.2, wo die Kristallstrukturen von VioC näher betrachtet werden.

Die erhaltenen kinetischen Parameter für die VioC-katalysierten Hydroxylierungen werden in Tabelle 5.2 mit den kinetischen Daten anderer Monooxygenasen verglichen, die ebenso wie VioC kleine Moleküle als Substrate akzeptieren.

Tabelle 5.2: Kinetische Parameter für VioC, AsnO, CAS, RdpA und PtlH.

Enzym	Substrat	K_M (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_M (min ⁻¹ ·mM ⁻¹)
VioC	L-Arginin	3.40 ± 0.45	2611 ± 196	767 ± 183
VioC	L-Homoarginin	7.05 ± 2.35	831 ± 166	118 ± 47.1
VioC	L-Canavanin	1.16 ± 2.35	73.2 ± 3.9	63.3 ± 17
AsnO ^[104]	L-Asparagin	0.48	299	620
CAS ^[226]	(2S,3S)-Pro-Clavaminat	0.19	46	240
RdpA ^[227]	2-(4-Chloro-2-methylphenoxy)-propionsäure	0.38	252	660
PtlH ^[228]	1-Deoxypentalensäure	0.57	252	442

Bezüglich der kinetischen Parameter von VioC für die Hydroxylierung von verschiedenen Substraten fällt auf, dass die K_M -Werte, und damit die Affinitäten zu den Substraten, in der gleichen Größenordnung liegen. Allerdings stellt man fest, dass die katalytische Effizienz von VioC für die Hydroxylierung von L-Arg am größten ist, da L-Arg das natürliche Substrat von VioC ist. Die katalytische Effizienz von VioC für die Hydroxylierung von L-Homoarginin ist ca. 6.5-fach niedriger und für die Reaktion mit L-Canavanin kann man eine 12-fach geringere

katalytische Effizienz im Vergleich zur Reaktion mit L-Arg feststellen. Auch die Zahl der pro Minute umgesetzten Substratmoleküle (k_{cat}) folgt diesem Trend. Danach wird L-Arg am schnellsten und L-Canavanin am langsamsten umgesetzt (Tabelle 5.2, Abb. 4.9). Diese Daten zeigen, dass das natürliche Substrat L-Arg am besten akzeptiert und umgesetzt wird, aber auch zwei Arginin-Derivate mit guten Umsatzraten hydroxyliert werden.

Die beobachteten K_M -Werte von VioC für die oben genannten Substrate sind etwa um eine Zehnerpotenz größer als die K_M -Werte anderer Fe(II)- und α KG-abhängigen Monooxygenasen (Tabelle 5.2). Damit ist die Affinität zu den Substraten in VioC etwas geringer. Bezüglich der Geschwindigkeit der Enzyme zeigt VioC die mit Abstand höchste Umsatzrate mit ca. 2600 umgesetzten L-Arg-Molekülen pro Minute. Die katalytischen Effizienzen der hier diskutierten Monooxygenasen weisen jedoch keine größeren Unterschiede auf und zeigen, dass die Mitglieder dieser Enzymklasse recht ähnliche katalytische Effizienzen besitzen.

5.2.2 Kristallstrukturen von VioC

Allgemeine Struktur:

Das Vorhandensein der „jelly roll“-Faltung in VioC, die durch acht β -Stränge gebildet wird, zeigt die Zugehörigkeit dieser Monooxygenase zu der Familie der Fe(II)-/ α KG-abhängigen Oxygenasen. Die acht β -Stränge bilden zwei antiparallele β -Faltblätter aus, die in allen bekannten CAS-ähnlichen Oxygenasen gleich angeordnet sind.^[229] Diese Beobachtung spiegelt sich auch in dem Vergleich der Sekundärstrukturelemente von VioC mit den Strukturen anderer Fe(II)-/ α KG-abhängiger Enzyme wie z.B. AsnO, CAS, TauD oder ATSK wieder (Tabelle 4.6, Abb. 4.11 (B)). Diese Enzyme weisen alle die „jelly roll“-Faltung und zwei α -helikale Subdomänen, die die β -Faltblätter „umranden“, auf und zeigen so eine sehr hohe strukturelle Verwandtschaft.^[96] Dieses für die Katalyse wichtige „jelly roll“-Zentrum findet man allerdings auch in Fe(II)-abhängigen Enzymen, die nicht α -Ketoglutarat als Kosubstrat verwenden.^[230] Als Beispiel kann man die Isopenicillin N Synthase (IPNS) nennen, die das gleiche strukturelle Kernmotiv aufweist, aber eine Vier-Elektronen-Oxidation in der Biosynthese von Penicillin katalysiert, ohne α KG zu benötigen.^[231]

Koordination von Kofaktor und Kosubstrat im aktiven Zentrum von VioC:

Im aktiven Zentrum von VioC kann das konservierte 2-His-1-Carboxylat-Bindemotiv (HXD/E...H) beobachtet werden (Abb. 4.12 und 4.13), das unter anderem für die Eisen-Koordination verantwortlich ist und in nahezu allen nicht-Häm Eisen-abhängigen Oxygenasen gefunden wird.^[96,206] In VioC wird diese Triade durch die Reste H168, E170 und

H316 gebildet und befindet sich damit zum einen in der Schleife, die die β -Stränge C und D verbindet (H168 und E170) und zum anderen auf dem β -Strang H (H316). Dies zeigt, dass das Eisenbindemotiv in der Nähe des kleineren β -Faltblatts der „jelly roll“-Faltung positioniert ist.

Aufgrund der Kristallisationsbedingungen ist im Substratkomplex von VioC kein α KG sondern ein Tartratmolekül an der Koordinationsstelle des Kosubstrates gebunden. Dieses Tartratmolekül fungiert als Analogon von α KG und ist auf die gleiche Weise im aktiven Zentrum koordiniert, wie bereits zuvor beschrieben.^[95,96] Die Koordination der 1-Carboxylgruppe von α KG ist entweder *trans* zu dem proximalen Histidin (H168) oder *trans* zu dem distalen Histidin (H316) zu finden.^[96] In VioC koordiniert diese Carboxylgruppe *trans* zum distalen Histidin einzähnig das Fe(II)-Ion (Abb. 4.13). Die andere Carboxylgruppe von α KG wird vom aktiven Zentrum über eine Salzbrücke von der Guanidiniumgruppe von R330 gebunden (Abb. 4.12 und 4.13). Dieser Rest ist konserviert in den meisten Fe(II)-/ α KG-abhängigen Oxygenasen und befindet sich normalerweise 14-22 Reste hinter dem distalen Histidin-Rest der Eisen-bindenden Triade.^[95] In VioC ist dieser Arginin-Rest 14 Positionen hinter H316 zu finden. Wie bereits erwähnt, findet man in vielen CAS-ähnlichen Oxygenasen für das Koprodukt der Hydroxylierungsreaktion, Succinat, die gleiche Koordination im aktiven Zentrum wie für α KG. Dies ist auch bei VioC der Fall, wo Succinat ebenfalls zweifach koordiniert vorliegt (Abb. 4.12 (C) und 4.13 (B)).

Deckel-Region von VioC:

Die flexible, Deckel-ähnliche Region von VioC (F217-P250) ordnet sich nach Eisen- und Substratbindung und verschließt das aktive Zentrum von VioC. Verglichen mit der Deckel-Region von AsnO weist VioC eine deutlich längere Deckel-Region auf, die sogar teilweise als Helix $\alpha 6$ organisiert ist (Abb. 4.14). Diese Helix dichtet zusätzlich zu der Schleifen-Region das aktive Zentrum von VioC ab. Im Gegensatz zu AsnO, wo das aktive Zentrum durch drei hydrophobe Prolin-Reste verschlossen wird, übernehmen in VioC die Reste P221, D222 und D223 diese Aufgabe. Dabei stabilisiert offenbar die Seitenkette des D222-Rests die Guanidiniumgruppe des Substrats über weit reichende elektrostatische Interaktionen, wodurch die korrekte Orientierung von L-Arginin im aktiven Zentrum unterstützt wird. Außerdem wird der Q137-Rest für die Wechselwirkung mit der α -Aminogruppe des Substrates optimal durch eine Wasserstoffbrückenbindung positioniert. Diese wird zwischen der Hydroxylgruppe der S224-Seitenkette und der Carboxamidgruppe von Q137 ausgebildet und wurde auch in der AsnO-Struktur beobachtet (Abb. 4.14).^[104] Dies zeigt, dass eine konservierte Region in die

Abgrenzung des aktiven Zentrums involviert ist, obwohl große konformationelle Unterschiede in den Deckel-Regionen von VioC und AsnO beobachtet wurden. Interessanterweise scheint die Unordnung der Deckel-Region im Produktkomplex größer zu sein als im Substratkomplex. Im VioC•hArg-Komplex ist ein kurzer Teil der Peptidkette (T232-Q235), der ca. 19 Å vom gebundenen hArg entfernt liegt, in der Elektronendichte nicht definiert. Das gleiche Phänomen wurde im VioC•hArg•Succinat•Fe(II)-Komplex beobachtet, wo A233-G236 fehlen und wo zusätzlich die anderen Reste der Deckel-Region (R220-D248) nur etwa 80% Besetzung in der Differenzelektronendichte aufweisen. Zusammenfassend kann man sagen, dass bereits kleine Veränderungen im aktiven Zentrum Effekte auf die Beweglichkeit der Deckel-Region haben.

Wie bereits für mehrere Oxygenasen beobachtet, kann das aktive Zentrum von nicht-Häm Eisen(II)-abhängigen Enzymen durch eine flexible Deckel-Region nach der Substratbindung verschlossen werden. Bei der Clavaminat-Synthase bleibt diese Schleifen-Region teilweise ungeordnet, obwohl Fe(II), α KG und das Substrat im aktiven Zentrum gebunden sind (Abb. 4.11 (B)).^[103] Im Gegensatz hierzu wurde für AsnO gezeigt, dass sich die Deckel-Region nach Fe(II)-Bindung ordnet. Außerdem grenzt die Deckel-Region von AsnO das aktive Zentrum in Gegenwart des Produkts (2S,3S)- β -Hydroxy-Asparagin (hAsn) ab, um Lösungsmittelmoleküle vom aktiven Zentrum fernzuhalten.^[104] Das nicht-Häm Eisen Enzym Tryptophan Oxygenase vom Huhn zeigt ein ähnliches Verhalten nach der Bindung von Tryptophan als Substrat. Die Substratbindung löst konformationelle Veränderungen aus, die zu einer geschlosseneren Topologie führen, wobei zwei Schleifenregionen das aktive Zentrum verschließen.^[232] Ein weiteres Beispiel für die Abdeckung des aktiven Zentrums findet man bei der Fe(II)-/ α KG-abhängigen Dioxygenase PtlH aus *Streptomyces avermitilis*. Dieses Enzym verschließt das aktive Zentrum nach der Substratbindung durch eine α -Helix, die das gebundene Substrat stabilisiert.^[228]

Substratspezifität von VioC:

Bezüglich der Erkennung von L-Arginin als Substrat und hArg als Produkt findet man einige spezifische Interaktionen zwischen dem Proteingerüst von VioC und dem Substrat. So wird die α -Aminogruppe durch eine Wasserstoffbrückenbindung von Q137 und eine Salzbrücke von E170 koordiniert. Zusätzlich wird die Carboxylgruppe von Substrat und Produkt über eine Salzbrücke mit der Seitenkette von R334 verbunden und über eine Wasserstoffbrückenbindung durch die Peptidgruppe von S158 koordiniert. Außerdem koordinieren die sauren

Reste D268 und D270 die Guanidiniumgruppe der Arginin-Seitenkette (Abb. 4.12 und 5.7 (A)).

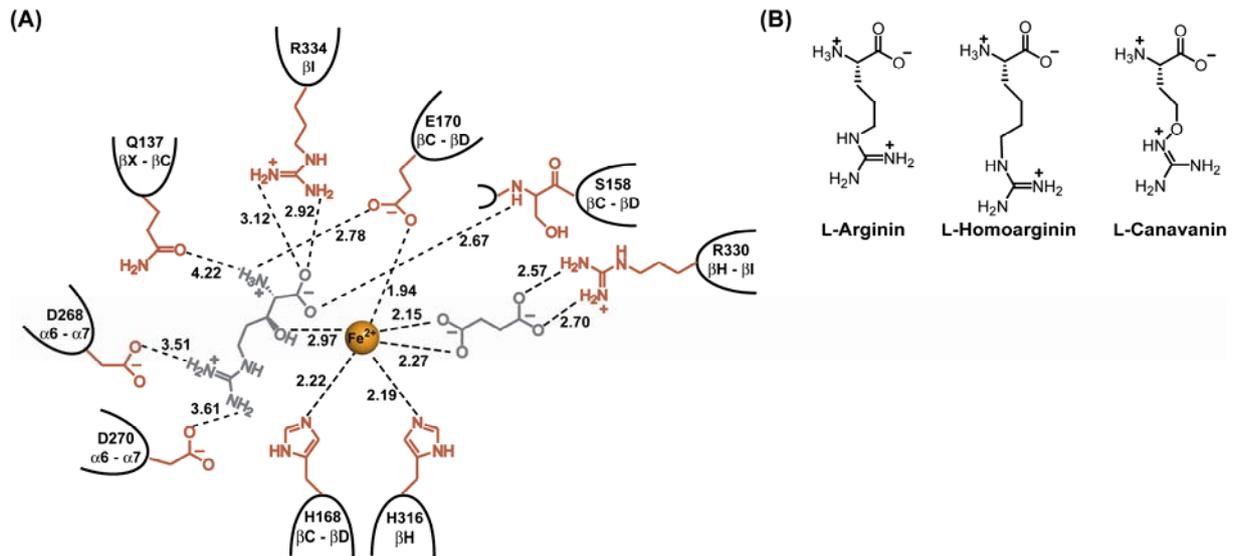


Abbildung 5.7: (A) Schematische Darstellung der Interaktionen im aktiven Zentrum des Produktkomplexes von VioC. Die involvierten Reste sind mit ihrer Nummer in der Peptidkette und mit dem entsprechenden Sekundärstrukturelement gekennzeichnet. Die Abstände sind in Å und mit gestrichelten Linien dargestellt. (B) Chemische Strukturen der von VioC akzeptierten Substrate.

Wie bereits in Abschnitt 4.2.2 gezeigt und in 5.2.1 diskutiert, bevorzugt VioC zwar sein natives Substrat L-Arginin, allerdings werden auch L-Homoarginin und L-Canavanin durch VioC hydroxyliert (Abb. 5.7 (B) und 4.9). Diese Beobachtung kann anhand der Koordination von L-Arg und hArg im aktiven Zentrum von VioC erklärt werden (Abb. 5.7 (A) und 4.12). Die Stereochemie des C_{α} -Atoms der Aminosäure ist entscheidend, um die Interaktionen zwischen dem Protein und der α -Amino- und der α -Carboxygruppe zu ermöglichen. Daher kann nur das L-Enantiomer von Arginin in der Bindungstasche koordiniert werden. Weitere wichtige Eigenschaften der Arginin-Koordination sind die Salzbrücken zwischen der Guanidiniumgruppe von Arginin und D268 und D270. Mit einem Abstand von etwa 3.5 Å ist genug Platz im aktiven Zentrum vorhanden, um eine weitere Methylengruppe der Seitenkette, wie es bei L-Homoarginin der Fall ist, im aktiven Zentrum zu platzieren (Abb. 5.7). Bezüglich des L-Canavanin-Umsatzes durch VioC kann man vermuten, dass die modifizierte Guanidiniumgruppe ebenfalls von den sauren Resten D268 und D270 koordiniert wird. Dabei wird das Sauerstoffatom von L-Canavanin, das die C_{δ} -Methylengruppe ersetzt, toleriert, da diese Position nicht direkt durch das Enzym erkannt wird (Abb. 5.7). Mit diesen Erkenntnissen kann man auch erklären, warum die Arginin-Derivate N^G -Methyl-L-Arginin und N^G -Hydroxy-nor-L-Arginin von VioC nicht als zu hydroxylierende Substrate erkannt werden. Die Modifikationen der Guanidiniumgruppe verhindern sterisch die Ausbildung der

für die korrekte Orientierung des Substrates nötigen Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein.

Viele nicht-Häm Eisen(II)-abhängige Oxygenasen weisen eine hohe Substratspezifität auf. So akzeptiert z.B. AsnO aus *Streptomyces coelicolor* A3(2) nur L-Asparagin als Substrat,^[104] und die Oxygenase SyrP aus *Pseudomonas syringae* setzt während der Syringomycin-Biosynthese nur L-Aspartat um, das als Pantetheinyl-Thioester an das entsprechende PCP gebunden vorliegt.^[71] Diese Beobachtung wurde auch für die Monooxygenasen KtzO und KtzP gemacht. Während der Kutznerid-Biosynthese wird von diesen Enzymen nur PCP-gebundenes Glutamat hydroxyliert.^[62] Auch die Fe(II)-/ α KG-abhängige Monooxygenase MppO aus *Streptomyces hygroscopicus* hydroxyliert nur die unnatürliche Aminosäure L-Enduracididin^[105] (siehe auch Übersicht über Modifikationsreaktionen, Abschnitt 7). Allerdings findet man auch Beispiele für eine etwas tolerantere Substraterkennung. Die beiden Oxygenasen RdpA und SdpA aus *Spingomonas herbicidovorans* MH sind in den Abbau von Alkanol-Unkrautvernichtungsmitteln involviert. Diese Enzyme erkennen [2-(4-Chloro-2-methyl-phenoxy)propansäure] und [2-(2,4-Dichlorophenoxy)propansäure] als Substrate, wobei RdpA die (*R*)-Enantiomere und SdpA die (*S*)-Enantiomere umsetzt.^[227,233] Auch die Oxygenase AspH aus *Pseudomonas syringae* hydroxyliert unterschiedliche Substrate. Es werden freies L-Aspartat, L-Aspartat-SNAC und ein lineares, Aspartat-enhaltendes Nonapeptid akzeptiert.^[71]

Stereospezifität von VioC:

Die *erythro* Stereospezifität mit der VioC die Hydroxylierung von nicht-aktivierten Methylengruppen katalysiert, kann durch die erhaltenen hoch aufgelösten Kristallstrukturen erklärt werden. Das Produkt hArg ist im Vergleich mit hAsn in AsnO^[104] im aktiven Zentrum von VioC anders zu dem katalytischen Eisen orientiert (Abb. 5.8). VioC formt einen Kanal vom aktiven Zentrum zur Proteinoberfläche in dem gebun-

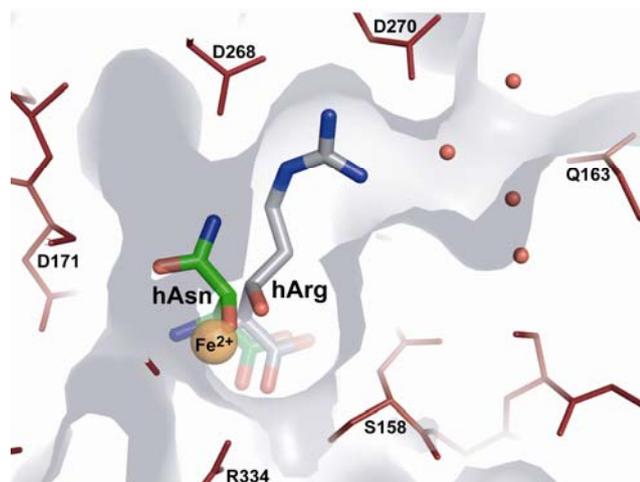


Abbildung 5.8: Überlagerung der hArg (grau)- und hAsn (grün)-Koordinations im aktiven Zentrum von VioC und AsnO. Das katalytische Eisenion ist orange dargestellt und Wassermoleküle in der Nähe der Eingangs-/Ausgangsstelle des Substrats und Produkts von VioC sind rot markiert.

denes (2*S*,3*S*)- β -Hydroxy-Arginin vorliegt. Im Gegensatz dazu zeigt die Seitenkette von gebundenem (2*S*,3*S*)- β -Hydroxy-Asparagin in AsnO in Richtung des Enzym-Zentrums. Dieser beobachtete unterschiedliche Substratbindungsmodus resultiert aus einer konformationellen Kontrolle des Enzyms auf das Seitenkettenrotamer des gebundenen Substrats. Man findet z.B. in AsnO ein *trans* Konformer des χ_1 Torsionswinkels von gebundenem L-Asparagin, wohingegen in VioC ein *gauche*(-) Rotamer für L-Arginin beobachtet wird (Tabelle 4.7). Aufgrund der unterschiedlichen gebundenen Substratrotamere in den aktiven Zentren von VioC und AsnO ist nur VioC in der Lage, das pro*S*-Wasserstoffatom der C β -Gruppe von L-Arg in Richtung des Fe(IV)-Oxo-Intermediates zu richten (Abb. 4.13), wohingegen das pro*R*-Wasserstoffatom in AsnO passend orientiert wird, um auf die Ferryl-Spezies übertragen zu werden.

Durch die Familie der CAS-ähnlichen Monooxygenasen werden sowohl *threo* als auch *erythro* Hydroxylierungsprodukte gebildet. AsnO produziert (2*S*,3*S*)- β -Hydroxy-Asparagin und damit das *threo* Diastereomer.^[104] Ebenso wird das *threo* Produkt in der SyrP-katalysierten Hydroxylierung von L-Aspartat in *Pseudomonas syringae* gebildet^[71] und ein hydroxyliertes β -Laktam-Zwischenprodukt der Clavulansäure-Biosynthese weist auch *threo* Stereochemie auf.^[103] Die hohe Stereospezifität dieser Enzyme zeigt sich auch an dem Beispiel der Kutznerid-Biosynthese in *Kutzneria* sp. 744, wo zwei Fe(II)-/ α KG-abhängige Monooxygenasen, KtzO und KtzP, involviert sind. Dabei generiert KtzO stereospezifisch das *threo* Diastereomer von β -Hydroxy-Glutamat und KtzP katalysiert die Bildung des *erythro* Diastereomers.^[62] Auch die beiden Oxygenasen MppO aus *Streptomyces hygroscopicus* und AspH aus *Pseudomonas syringae* katalysieren die Bildung von *erythro* Hydroxylierungsprodukten.^[71,105]

5.2.3 Schlussfolgerungen

Die in dieser Arbeit präsentierten strukturellen Daten geben erste Einblicke in den Aufbau des aktiven Zentrums einer Fe(II)-/ α KG-abhängigen Monooxygenase, die das *erythro* Diastereomer einer C β -hydroxylierten Aminosäure bildet. Es konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Stereospezifität eine Folge der Substratpositionierung im aktiven Zentrum von VioC ist. Dabei wird das Substrat durch die C-terminale, α -helikale Subdomäne, die die Deckel-Region und die α_6 - α_7 Schleife beinhaltet, in die besondere χ_1 Konformation gebracht, um die Katalyse zu ermöglichen. Im Gegensatz dazu kann die Substrattoleranz von VioC hauptsächlich durch die Koordination der Substrat-Seitenkette im aktiven Zentrum erklärt werden. Die biochemische und strukturelle Charakterisierung der Monooxygenase VioC ist

für das Verständnis der Biosynthese des Bausteins (2*S*,3*R*)-Capreomycinid essentiell. Dieses Vorläufermolekül wird in viele Antibiotika, wie z.B. den Tuberactinomycinen oder Streptothricinen, eingebaut und könnte somit ein interessanter Anhaltspunkt für die Modifikation dieser Antibiotika sein.^[234] Allerdings ist vom chemischen Standpunkt aus betrachtet die stereoselektive Synthese von β -hydroxylierten Aminosäuren eine synthetische Herausforderung. Dies wird dadurch verdeutlicht, dass bisher zwar Syntheserouten für einige funktionalisierte Arginin-Derivate, wie z.B. C_γ - oder N^ω -hydroxyliertes Arginin, bekannt sind, dass aber die chemische Synthese von (2*S*,3*S*)- β -Hydroxy-Arginin noch nicht veröffentlicht wurde.^[235-237] Außerdem sind viele Synthesestufen notwendig, um diese Arginin-Derivate zu erhalten. Mit Hilfe der VioC-katalysierten Reaktion lässt sich die Synthese des *erythro* Diastereomers von C_β -hydroxyliertem Arginin und zweier Derivate unter milden wässrigen Bedingungen in einer Stufe durchführen und daher stark vereinfachen.

Zusammen mit der hier vorgestellten ersten Kristallstruktur einer CAS-ähnlichen Oxygenase die *erythro* Produkte bildet und den schon bekannten Kristallstrukturen von *threo* Diastereomeren-generierenden Monooxygenasen sind nun ausreichend Informationen vorhanden, um diese Oxygenasen so zu modifizieren, dass enzymatisch neue Bausteine für die Biosynthese von Naturstoffen generiert werden können. Dadurch können Derivate von z.B. Antibiotika hergestellt werden, die eventuell eine höhere antimikrobielle Aktivität aufweisen.

5.3 Biosynthese des β -Methyl-Phenylalanin-Bausteins aus Manno-peptimycin

Nicht-proteinogene Aminosäuren, die auch in der Struktur des Glykopeptid-Antibiotikums Manno-peptimycin zu finden sind,^[168] erhöhen meistens die biologische Aktivität von Sekundärmetaboliten und sind deshalb von essentieller Bedeutung.^[238,239] Die Biosyntheseschritte der nicht-proteinogenen Bausteine für die nicht-ribosomale Peptidsynthese werden dabei meist von Modifikationsenzymen katalysiert.^[66] Es ist zum einen wichtig die Vorgehensweise dieser Enzyme zu untersuchen, um *in vitro* chemisch anspruchsvolle Synthesen von modifizierten Aminosäuren zu erleichtern und zum anderen ermöglicht ein Engineering dieser Modifikationsenzyme die Produktion von veränderten Sekundärmetaboliten mit eventuell verbesserten Eigenschaften. Das von *Streptomyces hygrosopicus* produzierte Manno-peptimycin enthält unter anderem den nicht-proteinogenen

Baustein (2*S*,3*S*)- β -Methyl-Phenylalanin, der auch in einem Isoleucyl-tRNA-Synthetase Inhibitor aus einer *Streptomyces* Spezies gefunden wurde.^[240] In dem Biosynthese-Gencluster von Mannopeptimycin wurde ein Gen identifiziert das für eine putative *S*-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferase codiert.^[170] Das Enzym MppJ zeigt geringe, aber signifikante Sequenzähnlichkeiten zu einigen SAM-abhängigen *C*-Methyltransferasen. Die Methyltransferase GlnT aus *Streptomyces coelicolor* ist in die Biosynthese von CDA involviert^[124,241] und die Enzyme CouO und NovO katalysieren SAM-abhängig *C*-Methylierungen während der Coumermycin und Novobiocin Biosynthese in *Streptomyces spheroides*.^[125] Auch die Methyltransferase UbiE aus *Escherichia coli*, die Teil des Ubiquinon-Biosynthesewegs ist, zeigt Sequenzähnlichkeiten zu MppJ.^[120]

In dieser Arbeit wurde die enzymatische Synthese von β -Methyl-Phenylalanin untersucht und es konnte gezeigt werden, dass die Methyltransferase MppJ eine hohe Substratspezifität für Phenylpyruvat aufweist. Damit konnte der Zeitpunkt der Methylierung während der Mannopeptimycin-Biosynthese geklärt werden. Zunächst wird Phenylpyruvat durch MppJ nicht stereospezifisch methyliert und eine anschließende Transaminierung mit der Aminotransferase IlvE aus *Streptomyces coelicolor* führt zur Bildung von (2*S*,3*R*)- und (2*S*,3*S*)- β -Methyl-Phenylalanin. Damit steht das (2*S*,3*S*)-Diastereomer als Baustein für die nicht-ribosomale Peptidsynthese zur Verfügung steht.

5.3.1 Sequenzvergleich von MppJ mit SAM-abhängigen *C*-Methyltransferasen

Durch den Sequenzvergleich von MppJ mit den SAM-abhängigen *C*-Methyltransferasen GlnT,^[124] CouO^[242] und UbiE^[120] (Abb. 5.9) konnte das Protein als putative SAM-abhängige Methyltransferase identifiziert werden, die in die β -Me-Phe-Biosynthese involviert sein könnte.^[170]

UbiE	--MVDKSQETTHFGFQTVAKEQKADMVAHVFSVAS-----K	35
CouO	-----MKIEPITGSEAEAFHRMGSR-----A	21
MppJ	-MSTEVSEAQARRAVADIFNSTLASSAIGAAWELGALDELRENGKLDVSD	49
GlnT	MTGDDVQGQLAELRRSHPELHALADPRRIAAWEAARG-----SA	39
	: . .	
UbiE	YDVMNDLMSFGIHRWLKRFTIDCSGVRRGQTVL-----	69
CouO	FERYNEFVDLLVG-----AGIADGQTVVD-----	45
MppJ	FAVRHDLHEPAVVGMFTALASVGIVRREGATVVVGPYFDEANHHRSLFW	99
GlnT	PGRHDLDFGADGEGSRGVEYVQAQALNRRARETGIRKLLG-----FAET	82
	. : .	
UbiE	LAGGTGDLTAKFSRLVGETGK-----	90
CouO	LCCGSGELEIILTSRFPN-----	65
MppJ	LNQGSSELFRMPQVLPNENRTGKIFYQRDAGAISYACREISERYFDPAFW	149
GlnT	ARRTAAGDRPVLVDLLGGDGLVR-----	105
	: . : . .	

UbiE	-----VVLADIN----ESMLKMGREKLRNIGVIGNVEYVQANAEA	126
CouO	-----LVGVDLS----EDMVRIARDYAAEQGKE--LEFRHGDAQS	99
MppJ	AAVDGLGYTPTTVA DLGSGSG ERLIQIARRFPQVRLG--VDIADGAIAM	197
GlmT	-----KVCEELG---IGDFNILTCDASPHMVTTAWAAGVPALLQR	142
	. : : : :	
UbiE	LPFPDNTF---CITISFGLRNV--TDKDKALRSMYRVLKPGGRLLVLEF	171
CouO	PAGMEDLLGKALVVSRHAFHRL--TRLPAGFDTMLRLVKPGGAILNVSF	147
MppJ	AEKEVAAKGFGLQISFVRGDART--IDQVSARGEFAEVDLLTCFMMGHDF	245
GlmT	AEQPLLRDHSVAVLLAYGSHHVPSSDRQTVATEARRMLRPGGTFFVLHDF	192
	* : . . : : *	
UbiE	SKP--IIEPLSKAYDAYS-----	187
CouO	LHLSDFDEPGFRTWVRFLKE-----	167
MppJ	WPRENCVQTLRKLRAAFPNV-----	265
GlmT	LVGSPVDVWFEEVTDVYSATGHKFLHFTRDEIEGYLEKAGYDHREVVEID	242
	. :	
UbiE	-----FHVLPRIIGSLV-----ANDADSYRYLAESIRMH	215
CouO	-----RPWDAEMQVAWALAHYY-----APRLQDYRDALAQAAD	201
MppJ	-----R--RFLLGDATRTVGIP-----DRELVPFTLGFVFGHDM	297
GlmT	DPYTAVAATPEEALEIGRYLLNMYGLVKVFEGRTEQEAYRWVAETAKAV	292
	. :	
UbiE	P-----DQDTLKAMMQDAGFESVDYYNLTAGVVALHRGYKF-----	251
CouO	T-----PVSEQR IWVDDQGYGVATVKCFARRAAA-----	230
MppJ	MGVYLPPTLDEWDGVFEEGGWRCVKKHAIDSLSVSVVFELE-----	337
GlmT	FRYPDAEGLASSELRQEGTGGWRVTIPRRAVVGVGRVSATAGKAA	338
	. . : * . .	

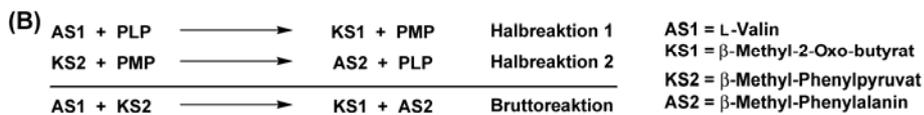
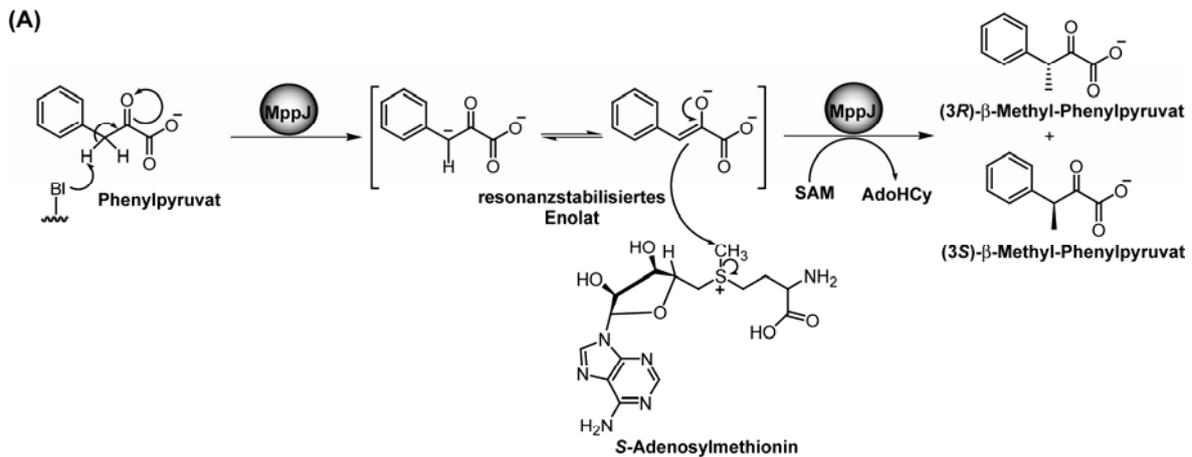
Abbildung 5.9: ClustalW Sequenzvergleich von MppJ mit SAM-abhängigen C-Methyltransferasen. Das SAM-Bindungsmotiv ist in der jeweiligen Sequenz rot unterlegt und ein hochkonservierter azider Rest ist grün dargestellt. In der Sequenz von CouO kann das SAM-Bindungsmotiv nicht eindeutig identifiziert werden. Die in allen gezeigten Sequenzen konservierten Positionen sind mit einem Stern markiert und Positionen mit konservierten Substitutionen sind mit zwei Punkten markiert. Die Positionen mit halb-konservierten Substitutionen sind mit einem Punkt markiert.

Die Methyltransferasen GlmT und CouO weisen Sequenzidentitäten zu MppJ von 19% und 25% auf. Zu UbiE konnte keine signifikante Identität gefunden werden. Diese Beispiele zeigen, dass die Sequenzidentitäten von SAM-abhängigen Methyltransferasen recht gering sind.^[243] Dies beobachtet man auch auf der strukturellen Ebene. Die Methyltransferasen werden zwar in fünf verschiedene strukturelle Klassen unterteilt,^[116] allerdings weisen Mitglieder einer einzelnen Klasse untereinander, neben einigen wenigen konservierten Positionen, große strukturelle Unterschiede auf.^[127] Man findet in den meisten Sequenzen von SAM-abhängigen Methyltransferasen ein konserviertes Nukleotidbindungsmotiv (E/DXG/AXGXG), das für die Koordination von SAM verantwortlich ist (Abb. 5.9).^[116] Außerdem findet man in den Sequenzen C-terminal zu dem SAM-Bindungsmotiv einen konservierten aziden Rest, der Wasserstoffbrückenbindungen zu den beiden Hydroxylgruppen der SAM-Ribose ausbildet.^[127] Dagegen kann das konservierte CXXXCXXC-Motiv, das für

die radikalische SAM-Proteinfamilie charakteristisch ist, in den hier dargestellten Sequenzen nicht identifiziert werden.

5.3.2 Katalysemechanismen der MppJ-vermittelten Methylierung und der IlvE-katalysierten Transaminierung

Es sind bereits Beispiele bekannt, wo α -Ketosäuren an der C_β -Position von SAM-abhängigen Methyltransferasen methyliert werden. Dies ist bei der Indolpyruvat-Methylierung der Fall, die während der Biosynthese des Antibiotikums Indolmycin stattfindet.^[118,130,244] Außerdem wurde für die Generierung von β -Methyl-Glutamat während der CDA-Biosynthese gezeigt, dass nicht Glutamat direkt, sondern die korrespondierende α -Ketosäure α -Ketoglutarat durch die Methyltransferase GlnT methyliert wird. Durch anschließende Transaminierung mit Hilfe der Aminotransferase IlvE aus *Streptomyces coelicolor* wurde der (2*S*,3*R*)- β -Methyl-Glutamat-Baustein erhalten, da IlvE spezifisch L-Aminosäuren generiert.^[65,124,241] Dieser Biosyntheseweg wurde auch für die Generierung von β -Methyl-Phenylalanin in *Streptomyces hygroscopicus* in Betracht gezogen. Es wurde gezeigt, dass die SAM-abhängige Methyltransferase MppJ die C_β -Methylierung von Phenylpyruvat katalysiert (Abb. 4.16) und dass eine anschließende Transaminierung mit IlvE zur Bildung von (2*S*,3*S*)- und (2*S*,3*R*)- β -Me-Phe führt (Abb. 4.19 und 4.21). Für diese Reaktionen können folgende Mechanismen vorgeschlagen werden (Abb. 5.10):



Mechanismus Halbreaktion 1:

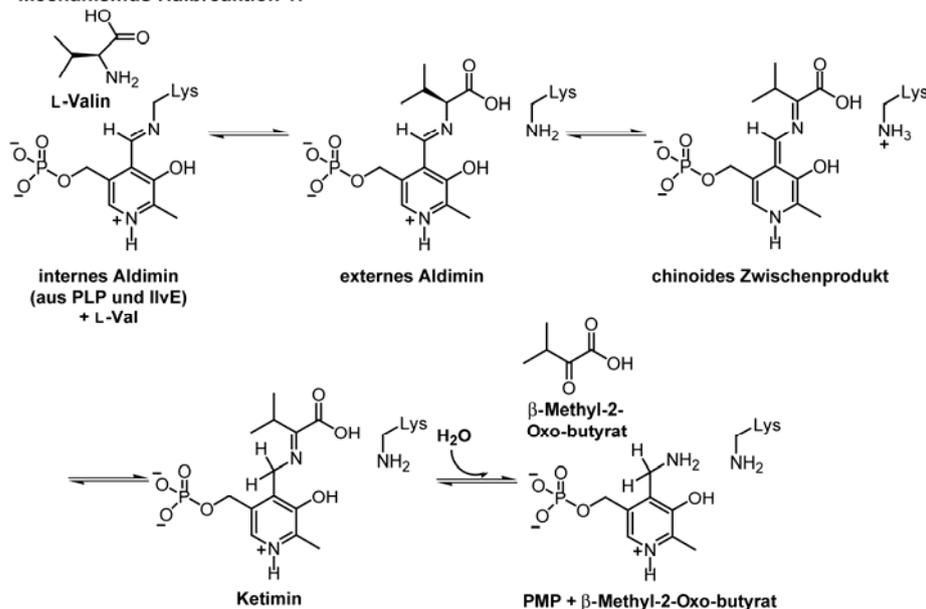


Abbildung 5.10: (A) Postulierter Mechanismus der C β -Methylierung von Phenylpyruvat durch MppJ. SAM wird dabei zu AdoHCy abgebaut. (B) Schematische Darstellung der Halbreaktionen einer Transaminierungsreaktion. AS, Aminosäure; KS, α -Ketosäure. Des Weiteren ist die erste Halbreaktion von IlvE mit L-Valin als Aminogruppendonor detailliert dargestellt. In der zweiten Halbreaktion wird β -Methyl-2-Oxo-butytrat freigesetzt und die andere α -Ketosäure β -Methyl-Phenylpyruvat wird von IlvE koordiniert. Dann finden die hier dargestellten Reaktionen in umgekehrter Reihenfolge statt, um β -Methyl-Phenylalanin zu erhalten.

Die oben dargestellte Methylierung von Phenylpyruvat anstelle von Phenylalanin durch MppJ ist chemisch gesehen sinnvoll. Die meisten SAM-abhängigen Methylierungen laufen nach einem S_N2-Mechanismus ab, bei dem das Substrat durch die Methyltransferase an der β -Position deprotoniert wird und anschließend nukleophil die aktivierte Methylgruppe des Methylgruppendonors SAM angreift.^[116,130] Dabei wird das Koprodukt S-Adenosylhomocysteine (AdoHCy) freigesetzt. Durch die Deprotonierung von Phenylpyruvat entsteht ein Enolat-Ion, das aufgrund der α -Ketogruppe resonanzstabilisiert werden kann. Eine

vergleichbare Resonanzstabilisierung wäre bei einer Deprotonierung der β -Position von Phenylalanin nicht möglich und es würde ein hochenergetisches instabiles Carbanion entstehen.

Bezüglich der folgenden Transaminierungsreaktion lässt sich sagen, dass Transaminasen im allgemeinen Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP)-abhängig zwei Teilreaktionen katalysieren, um die α -Aminogruppe einer Aminosäure auf eine α -Ketosäure zu übertragen (schematische Darstellung siehe Abb. 5.10 (B)).^[245] Betrachtet man die erste Halbreaktion genauer, wird zunächst L-Valin als Aminogruppendonor durch die Aminotransferase IlvE koordiniert, in der der PLP-Kofaktor an einen konservierten Lysin-Rest des Enzyms als internes Aldimin kovalent gebunden vorliegt (Abb. 5.10 (B)). Dieses wird zu einem externen Aldimin aus Aminosäure und PLP umgewandelt und die nun freie ϵ -Aminogruppe des konservierten Lysin-Rests deprotoniert das C_{α} -Atom des Valins. Dadurch kann sich ein chinoides Zwischenprodukt ausbilden, das reprotoniert und somit in ein Ketimin umgewandelt wird. Durch Hydrolyse des Ketimins wird die zu L-Val korrespondierende α -Ketosäure β -Methyl-2-Oxo-butyrat freigesetzt und Pyridoxamin-5'-Phosphat (PMP) wird generiert (Abb. 5.10 (B)).^[245] In der zweiten Halbreaktion wird die andere α -Ketosäure β -Methyl-Phenylpyruvat im aktiven Zentrum von IlvE koordiniert und die gezeigten Reaktionen laufen in Gegenrichtung ab. Dabei wird als zweite Aminosäure β -Methyl-Phenylalanin gebildet und der PLP-Kofaktor wird regeneriert. Dieser Mechanismus wird als Pingpong-Mechanismus bezeichnet.^[245]

5.3.3 Substratspezifität von MppJ und kinetische Parameter der Methylierungsreaktion

Substratspezifität:

Um die Spezifität der Methyltransferase MppJ näher zu untersuchen, wurden verschiedene Substrate getestet. MppJ wurde mit freiem L-Phenylalanin und Phenylalanin gebunden an rekombinantes *holo* MppA-PCP₃ inkubiert, es konnte aber keine Aktivität von MppJ detektiert werden (Tabelle 4.9). Daher kann ausgeschlossen werden, dass MppJ direkt die Aminosäure methyliert. Zusätzlich wurden von Huang *et al.* Phenylpyruvat-S-CoA und Phenylpyruvat-S-MppA-PCP₃ als mögliche Substrate für MppJ getestet. Doch auch die als Thioester aktivierten Phenylpyruvat-Spezies wurden nicht methyliert.^[207] Um die Spezifität im Bezug auf α -Ketosäuren zu untersuchen, wurden Pyruvat, α -Ketobutyrat und α -Ketoglutarat mit MppJ inkubiert. Diese Substrate werden allerdings nicht von der Methyltransferase akzeptiert (Tabelle 4.9). Von Huang *et al.* wurden drei weitere benzyliche Carbonsäuren, Zimtsäure, Phenylelessigsäure und β -Ketophenylpropionsäure, auf Methylierung

durch MppJ untersucht, doch mit diesen Substraten, die keine α -Ketogruppe aufweisen, konnte keine Aktivität beobachtet werden.^[207] Jedoch konnte gezeigt werden, dass Phenylpyruvat-Derivate, die eine Hydroxylgruppe an einer beliebigen Ringposition tragen, von MppJ methyliert werden.^[207]

Mit dieser Arbeit und der Arbeit von Huang *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Methylierungsreaktion in der Biosynthese der Mannozeptimycine, entgegen der zuvor von Magarvey *et al.* postulierten post-synthetischen Methylierung des Peptidgrundgerüsts,^[170] vor der Assemblierung an einem freien Substrat stattfindet. Außerdem wird deutlich, dass die Methyltransferase MppJ spezifisch für Phenylpyruvat ist, wobei kleine Modifikationen am Phenylring scheinbar toleriert werden. Allerdings sind die α -Keto- und die β -Phenylgruppe für die Substraterkennung durch MppJ entscheidend.

Andere SAM-abhängige Methyltransferasen, die in die Synthese nicht-ribosomaler Peptide involviert sind, weisen auch eine hohe Substratspezifität auf, allerdings finden die Modifikationen meistens nach dem Aufbau des Molekülgrundgerüsts oder an PCP- oder ACP-gebundenen Bausteinen statt. Die NovO- und CouO-katalysierten C-Methylierungsreaktionen während der Novobiocin- und Coumermycin-Biosynthese finden nach dem Aufbau des Aminocoumaringerüsts statt.^[125,242] Außerdem wurden für die Biosynthese des Siderophors Yersiniabactin aus *Yersinia pestis*, das ein Hybridmolekül aus Polyketid und nicht-ribosomalem Peptid darstellt, C-Methyltransferasendomänen identifiziert, die ACP- oder PCP-gebundene Substrate methylieren.^[53,246] Die bisher einzige bekannte SAM-abhängige Methylierung eines freien Substrats während der nicht-ribosomalen Peptidsynthese wird durch GlnT katalysiert. Diese Methyltransferase ist spezifisch für α -Ketoglutarat und in die Biosynthese von (2*S*,3*R*)- β -Methyl-Glutamat involviert.^[124]

Kinetische Parameter:

Die experimentell bestimmten kinetischen Parameter für die MppJ-katalysierte Methylierung von Phenylpyruvat werden in Tabelle 5.3 mit den kinetischen Parametern anderer SAM-abhängiger Methyltransferasen verglichen.

Tabelle 5.3: Kinetische Parameter für MppJ, GlmT, CouO und NovO.

Enzym	Substrat	K_M (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_M (min ⁻¹ ·mM ⁻¹)
MppJ	Phenylpyruvat	0.006 ± 0.002	0.5 ± 0.02	83.3 ± 19.3
Glmt ^[124]	α-Ketoglutarat	0.063 ± 0.005	0.11 ± 0.002	1.78 ± 0.17
CouO ^[125]	Monoamid-Zwischenprodukt der Coumermycin-Biosynthese	0.052 ± 0.005	2.2 ± 0.25	42.3 ± 9.0
NovO ^[125]	Novobiocinsäure (Zwischenprodukt der Novobiocin-Biosynthese)	0.027 ± 0.006	0.5 ± 0.02	18.5 ± 4.2

Der beobachtete K_M -Wert von MppJ für Phenylpyruvat ist etwa um eine Zehnerpotenz geringer als die erhaltenen K_M -Werte anderer SAM-abhängiger Methyltransferasen. MppJ besitzt also *in vitro* eine etwas höhere Affinität zu dem Substrat als die anderen hier gezeigten Enzyme. Die Umsatzraten der Methyltransferasen liegen in der gleichen Größenordnung und auch die katalytischen Effizienzen zeigen das ähnliche Verhalten dieser Enzyme. Im Vergleich mit den in Abschnitt 5.1 und 5.2 beschriebenen Monooxygenasen kann man feststellen, dass die Methyltransferasen eine höhere Affinität zu ihren Substraten aufweisen (Tabellen 5.1, 5.2 und 5.3). Dies hat aber zur Folge, dass die Zahl der pro Minute umgesetzten Moleküle bei den Monooxygenasen (z.B. k_{cat} von VioC für L-Arg: 2611 min⁻¹ und k_{cat} von CchB für L-Orn: 17.4 min⁻¹) deutlich höher liegt als bei den Methyltransferasen. Die katalytischen Effizienzen der Flavin-abhängigen Monooxygenasen und der SAM-abhängigen Methyltransferasen liegen aber wieder in vergleichbaren Größenordnungen (Tabellen 5.1 und 5.3). Die Fe(II)-/αKG-abhängigen Monooxygenasen besitzen dagegen katalytische Effizienzen, die etwa zehnmal größer sind (Tabelle 5.2).

5.3.4 Transaminierung von β-Methyl-Phenylpyruvat

MppQ und MppP als putative Aminotransferasen:

Da nun bekannt ist, dass β-Methyl-Phenylpyruvat das Vorläufermolekül für β-Methyl-Phenylalanin darstellt, benötigt man ein Enzym, das diese Umsetzung katalysiert. Durch Sequenzanalysen wurden zwei Gene im Mannopeptimycin-Gencluster identifiziert, die für die putativen PLP-abhängigen Enzyme MppP und MppQ codieren.^[170] In dieser Arbeit wurde allerdings nur MppQ auf Aminotransferase-Aktivität getestet, da MppP als rekombinantes Protein nicht erhalten werden konnte (Abschnitt 3.2.2.2). Die durchgeführten Assays zeigten, dass β-Methyl-Phenylpyruvat nicht durch MppQ transaminiert werden kann (Abb. 4.18). Huang *et al.* haben zusätzlich gezeigt, dass auch MppP keine Aktivität mit β-Methyl-Phenylpyruvat als Substrat aufweist. Es konnte allerdings Aminogruppentransfer von einigen

proteinogenen Aminosäuren auf α KG oder Phenylpyruvat beobachtet werden.^[207] Dies zeigt, dass MppP und MppQ zwar Aminotransferasen sind, aber nicht an der Biosynthese von β -Methyl-Phenylalanin beteiligt sind. Alternativ kann man postulieren, dass MppP und MppQ Teil der β -Hydroxy-Enduracididin-Biosynthese sind. Die nicht-proteinogene Aminosäure Enduracididin findet man neben den Mannopeptimycinen auch in dem Peptidantibiotikum Enduracidin, das von *Streptomyces fungicidicus* produziert wird.^[168,171,247] In dem Biosynthese-Gencluster von Enduracidin wurden zwei Gene identifiziert, die für Homologe von MppP und MppQ codieren (EndP und EndQ) und 85% und 66% Identität aufweisen.^[171] Aufgrund der hohen Homologien und der Genorganisation kann angenommen werden, dass diese Aminotransferasen in die Biosynthese des Enduracididin-Bausteins involviert sind.^[171] Es ist auch denkbar, dass eine Aminotransferase des Primärmetabolismus von *Streptomyces hygroscopicus* die benötigte Aminogruppenübertragung katalysiert. Dies wurde bereits für die Aminotransferase IlvE aus dem Primärmetabolismus von *Streptomyces coelicolor* gezeigt, die die Bildung von β -Methyl-Glutamat aus β -Methyl-2-Oxo-glutarat in der CDA-Biosynthese katalysiert.^[124] Allerdings ist das Genom des Mannopeptimycin Produzentenstamms noch nicht vollständig sequenziert und es ist daher nicht möglich Gene zu identifizieren, die für putative Aminotransferasen codieren. Deshalb wurde in dieser Arbeit die rekombinante Aminotransferase IlvE aus *Streptomyces coelicolor* verwendet.

Transaminierungsreaktion mit IlvE:

Es konnte gezeigt werden, dass IlvE PLP- und L-Valin-abhängig die Umwandlung von β -Methyl-Phenylpyruvat zu β -Methyl-Phenylalanin katalysiert (Abb. 4.19). In dieser Reaktion dient L-Val als Aminogruppendonor, wie es auch für IlvE im Primärmetabolismus von Bakterien beobachtet wurde. Die verzweigt-kettige Aminotransferase katalysiert dort den letzten Schritt der Biosynthese bzw. den ersten Schritt des Abbaus der verzweigt-kettigen Aminosäuren Valin, Isoleucin und Leucin mit Hilfe von Glutamat bzw. α KG als Aminogruppendonor bzw. -akzeptor.^[248] Anhand der im Jahr 2003 gelösten Kristallstruktur und kürzlich durchgeführten Studien zur Substratselektivität von IlvE aus *Escherichia coli* kann man erklären, warum neben Valin, Isoleucin, Leucin und Glutamat auch β -Methyl-Phenylpyruvat bzw. β -Methyl-Phenylalanin von IlvE als Substrate erkannt werden.^[245,249] Die Substratbindungstasche von IlvE ist so konzipiert, dass neben den hydrophoben Aminosäuren auch Glutamat gebunden werden kann, obwohl sie sich in Gestalt und Eigenschaften unterscheiden. Außerdem wurde gezeigt, dass IlvE in der Lage ist, α KG-Derivate zu transaminieren, die an der β -Position mit einer Methyl-, Ethyl-, Propyl- oder Phenylgruppe

modifiziert wurden. Außerdem kann auch die γ -Position mit unterschiedlichen Substituenten modifiziert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die von MppJ eingeführte Methylgruppe an der C_β -Position von Phenylpyruvat keine Auswirkungen auf die Substraterkennung durch IlvE hat. Außerdem scheint das aktive Zentrum groß genug zu sein, um den Phenylrest koordinieren zu können.

Kinetische Parameter für IlvE-katalysierte Transaminierung:

Für die Transaminierung von β -Methyl-Phenylpyruvat durch IlvE wurden die kinetischen Parameter bestimmt (Abschnitt 4.3.4). In Tabelle 5.4 werden diese Parameter mit den kinetischen Daten verglichen, die für IlvE mit anderen Substraten erhalten wurden.

Tabelle 5.4: Kinetische Parameter für IlvE mit unterschiedlichen Substraten.

Enzym	Stamm	Substrat	K_M (mM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{min}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$)
IlvE	<i>Streptomyces coelicolor</i>	β -Methyl-Phenylpyruvat	0.123 ± 0.028	2.8 ± 0.2	22.8 ± 3.4
IlvE ^[124]	<i>Streptomyces coelicolor</i>	β -Methyl-2-Oxo-glutarat	0.196 ± 0.403	726 ± 54	3716 ± 557
IlvE ^[250]	<i>Escherichia coli</i>	α -Ketoglutarat	1.7	1140	671

Man kann erkennen, dass die hier aufgeführten K_M -Werte von IlvE für das jeweilige Substrat in der gleichen Größenordnung liegen. Allerdings kann man bei den k_{cat} -Werten recht große Unterschiede ausmachen. IlvE setzt von dem natürlichen Substrat α -Ketoglutarat 1140 Moleküle pro Minute um und auch das nahezu natürliche Substrat β -Methyl-2-Oxo-glutarat wird ähnlich schnell umgesetzt. Von dem unnatürlichen Substrat β -Methyl-Phenylpyruvat werden allerdings nur ca. 3 Moleküle pro Minute umgesetzt. Dies könnte daran liegen, dass das Substrat eventuell nicht korrekt im aktiven Zentrum platziert werden kann. Auch die katalytische Effizienz von IlvE ist bei der Umsetzung von β -Methyl-Phenylpyruvat deutlich geringer als bei der Umsetzung von natürlicheren Substraten.

5.3.5 Untersuchungen zur Stereospezifität von MppJ

Wie in Abschnitt 4.3.4 gezeigt bilden sich nach der Transaminierungsreaktion zwei β -Methyl-Phenylalanin-Diastereomere (Abb. 4.19). Durch Retentionszeit-Vergleich mittels RP-HPLC-ESI-MS dieser Reaktionsprodukte und chemisch synthetisierter Standards konnte die absolute Stereochemie der Diastereomere bestimmt werden (Abschnitt 4.3.5, Abb. 4.21). Es wurde auch festgestellt, dass in diesen *in vitro* Assays (2*S*,3*R*)- β -Me-Phe in einem 2.5-fachen

Überschuss gebildet wird, obwohl das andere gebildete Diastereomer ((2*S*,3*S*)- β -Me-Phe) in das Mannopeptimycin-Peptidgerüst eingebaut wird.^[170] Da zuvor schon gezeigt werden konnte, dass IlvE stereospezifisch L-Aminosäuren generiert,^[124] müssen während der MppJ-katalysierten Methylierungsreaktion die beiden Enantiomere (3*S*)- und (3*R*)- β -Methyl-Phenylpyruvat gebildet worden sein, um anschließend die beobachteten Diastereomere zu erhalten. Dies würde bedeuten, dass die Methyltransferase MppJ, im Gegensatz zu der α KG-umsetzenden Methyltransferase GlnT aus *Streptomyces coelicolor*, nicht stereospezifisch ist. GlnT dagegen katalysiert selektiv die Bildung des (3*R*)-Enantiomers von β -Methyl-2-Oxo-butyrat.^[124] Huang *et al.* haben mit Hilfe von Deuterium-markiertem Phenylpyruvat gezeigt, dass MppJ spezifisch das pro*S*-Wasserstoffatom der benzyllischen Position abstrahiert. Außerdem vermuten die Autoren, dass aufgrund der sterischen Gegebenheiten die Methylgruppe von SAM so auf Phenylpyruvat übertragen wird, dass (3*S*)- β -Methyl-Phenylpyruvat gebildet wird.^[207] Damit wäre die Methyltransferase stereospezifisch und das zweite beobachtete Diastereomer würde wegen möglicher Enol/Keto-Tautomerisierung von (3*S*)- β -Methyl-Phenylpyruvat entstehen. Für diese Vermutung spricht die Beobachtung, dass nach 12-stündiger Inkubation von enantiomerenreinem (3*S*)- β -Methyl-Phenylpyruvat und anschließender Transaminierung auch beide β -Me-Phe-Diastereomere beobachtet werden können (Abb. 4.23, Abschnitt 4.3.7). Allerdings wurde bei den Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der MppJ-katalysierten Methylierungsreaktion festgestellt, dass die beiden Diastereomere (2*S*,3*R*)- und (2*S*,3*S*)- β -Me-Phe während der gesamten Reaktionszeit in einem nahezu konstanten Verhältnis von ca. 2.5:1 gebildet werden (Abb. 4.22). Dies wäre bei Enol/Keto-Tautomerisierung nicht zu erwarten.

Mit diesen Arbeiten kann daher nur eindeutig gezeigt werden, dass MppJ spezifisch das pro*S*-Wasserstoffatom der C β -Position von Phenylpyruvat abstrahiert. Es kann allerdings nicht bewiesen werden, dass auch die Übertragung der Methylgruppe stereospezifisch verläuft.^[207] Damit ist nicht klar, ob die Bildung der beiden β -Me-Phe-Diastereomere enzymatisch bedingt oder aufgrund der Razemisierungsempfindlichkeit des β -Methyl-Phenylalanin-Zwischenprodukts auftritt. Außerdem muss man bedenken, dass diese Assays *in vitro* bei weitem nicht die *in vivo* Situation widerspiegeln können.

5.3.6 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die SAM-abhängige Methyltransferase MppJ nicht Phenylalanin sondern Phenylpyruvat methyliert. Eine anschließende Transaminierung mit der rekombinanten Aminotransferase IlvE führte zur

Produktion von (2*S*,3*R*)- und (2*S*,3*S*)- β -Methyl-Phenylalanin. Damit konnte gezeigt werden, dass die Methylierungsreaktion während der Mannopeptimycin-Biosynthese an einem freien Substrat vor dem Einbau in die Peptidkette stattfindet. Allerdings konnte nicht eindeutig bewiesen werden, ob die Bildung der Diastereomere auf das racemisierende Zwischenprodukt β -Methyl-Phenylpyruvat oder auf die nicht-stereospezifische Methyltransferase MppJ zurückzuführen ist. In dieser Arbeit war es nicht möglich, die Adenylierungs-Domäne MppA-A₃ in löslicher Form als rekombinantes Protein durch Produktion in *E. coli* zu erhalten, um die Spezifität der A-Domäne zu untersuchen. Dies ist für die Mannopeptimycin-A-Domänen bisher nur für MppB-A₂ gelungen, die spezifisch den Baustein β -Hydroxy-Enduracididin aktiviert^[170] (siehe auch Übersicht über Modifikationsreaktionen, Abschnitt 7). Trotzdem kann man die in Abb. 5.11 dargestellte Biosynthese von β -Methyl-Phenylalanin mit der anschließenden Aktivierung durch die entsprechende A-Domäne postulieren.

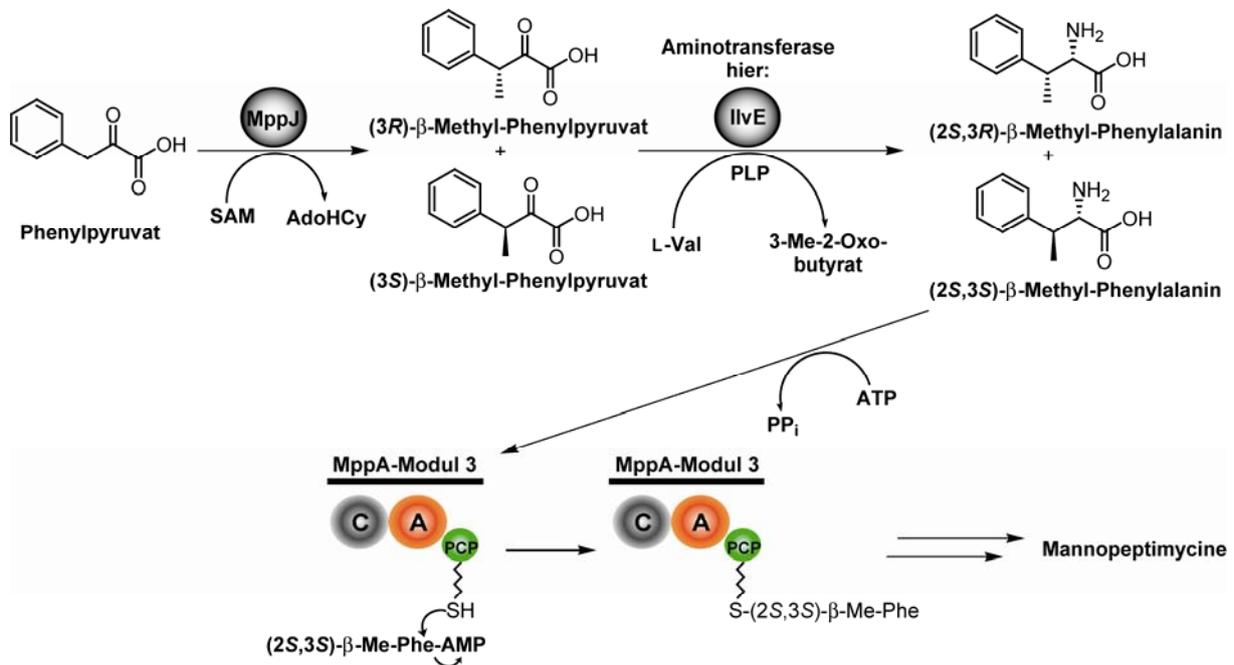


Abbildung 5.11: Schema zur Biosynthese von β -Me-Phe. Gezeigt sind zum einen die Biosynthese des Bausteins und zum anderen die mögliche Aktivierung durch die NRPS MppA.

Nach der MppJ-katalysierten Methylierung von Phenylpyruvat wird β -Methyl-Phenylpyruvat vermutlich durch eine Aminotransferase des Primärmetabolismus transaminiert. In dieser Arbeit wurde für diese Reaktion die Aminotransferase IlvE aus *Streptomyces coelicolor* verwendet. Anschließend wird der Baustein durch die dritte A-Domäne der NRPS MppA als AMP-Derivat aktiviert und von dem nachfolgenden PCP als Thioester gebunden. Dann wird durch die erste Kondensationsdomäne der folgenden Synthetase MppB die Peptidbindungsbildung katalysiert. Falls der β -Me-Phe-Baustein wirklich als zwei Diastereomere synthetisiert wird, kann man vermuten, dass die A-Domäne MppA-A₃ selektiv nur

(2*S*,3*S*)- β -Me-Phe aktiviert, da in den Mannopectimycin-Strukturen nur dieses Diastereomer gefunden wurde.^[168] Dieses Phänomen wurde bereits im Fall der CDA-Biosynthese bei *in vivo*-Experimenten beobachtet, wo die β -Methyl-Glutamat-aktivierende A-Domäne des Moduls 10 der NRPS CDAPSIII stereospezifisch (2*S*,3*R*)- β -Me-Glu aktiviert.^[241] Des Weiteren haben Experimente mit *mppJ*-Mutantenstämmen gezeigt, dass die A-Domäne MppA-A₃ aus *Streptomyces hygroscopicus* auch in der Lage sein muss, L-Phenylalanin zu aktivieren, da in diesen Stämmen nur die Produktion von Desmethyl-Mannopectimycin beobachtet wurde.^[170] Betrachtet man die spezifitätsvermittelnden Aminosäurereste der A-Domäne MppA-A₃, findet man ein gegenüber den bekannten Motiven für Phenylalanin-aktivierende A-Domänen modifiziertes Motiv.^[21] Dies ist ein Hinweis darauf, dass MppA-A₃ vorzugsweise methyliertes Phenylalanin aktiviert, aber trotzdem in der Lage ist, Phenylalanin zu erkennen.

Bezüglich der Wichtigkeit dieser Untersuchungen kann man sagen, dass die chemische Synthese von β -methylierten α -Ketosäuren oder Aminosäuren sehr anspruchsvoll ist, da die Methylengruppe nicht aktiviert und damit sehr unreaktiv ist. Für die Synthese der vier β -Me-Phe-Diastereomere existieren zahlreiche Syntheserouten, die allerdings sehr aufwendig und zeitintensiv sind.^[251-256] Mit Hilfe der hier charakterisierten Methyltransferase MppJ können diese Synthesen vereinfacht werden. Außerdem kann das Verständnis dieser Reaktion dazu beitragen, mittels molekularem Engineering neue chemische Strukturen zu generieren und so Veränderungen von Naturstoffen herbeizuführen.^[257-259]

6. Literatur

- [1] Matula, C., Nahler, G. and Kreuzig, F. Salivary levels of gramicidin after use of a tyrothricin-containing gargle/mouth-wash and tyrothricin lozenges. *Int J Clin Pharmacol Res* **1988**, 8, 259-261.
- [2] Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929. *Bull World Health Organ* **2001**, 79, 780-790.
- [3] Walsh, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* **2000**, 406, 775-781.
- [4] Chambers, H. F. Methicillin resistance in *Staphylococci*: Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* **1997**, 10, 781-791.
- [5] Hoeffler, D. and Zimmermann, U. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococci*. *Lancet* **1997**, 350, 739.
- [6] Challis, G. L. and Hopwood, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, 100 Suppl 2, 14555-14561.
- [7] Wandersman, C. and Delepelaire, P. Bacterial iron sources: From siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* **2004**, 58, 611-647.
- [8] Miethke, M. and Marahiel, M. A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev* **2007**, 71, 413-451.
- [9] Schwarzer, D., Finking, R. and Marahiel, M. A. Nonribosomal peptides: From genes to products. *Nat Prod Rep* **2003**, 20, 275-287.
- [10] Marahiel, M. A., Stachelhaus, T. and Mootz, H. D. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem Rev* **1997**, 97, 2651-2674.
- [11] Grunewald, J. and Marahiel, M. A. Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiol Mol Biol Rev* **2006**, 70, 121-146.
- [12] Walsh, C. T. Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Modularity and versatility. *Science* **2004**, 303, 1805-1810.
- [13] Caboche, S., Pupin, M., Leclere, V., Fontaine, A., Jacques, P. and Kucherov, G. Norine: A database of nonribosomal peptides. *Nucleic Acids Res* **2008**, 36, D326-331.
- [14] Lipmann, F. Bacterial production of antibiotic polypeptides by thiol-linked synthesis on protein templates. *Adv Microb Physiol* **1980**, 21, 227-266.
- [15] Schwarzer, D. and Marahiel, M. A. Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften* **2001**, 88, 93-101.
- [16] Weber, G., Schorgendorfer, K., Schneider-Scherzer, E. and Leitner, E. The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *Curr Genet* **1994**, 26, 120-125.
- [17] Mootz, H. D., Schwarzer, D. and Marahiel, M. A. Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem* **2002**, 3, 490-504.
- [18] Sieber, S. A. and Marahiel, M. A. Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: Approaches to new antibiotics. *Chem Rev* **2005**, 105, 715-738.
- [19] Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M. A. and Brick, P. Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *Embo J* **1997**, 16, 4174-4183.
- [20] May, J. J., Kessler, N., Marahiel, M. A. and Stubbs, M. T. Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99, 12120-12125.
- [21] Stachelhaus, T., Mootz, H. D. and Marahiel, M. A. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **1999**, 6, 493-505.
- [22] Stachelhaus, T., Huser, A. and Marahiel, M. A. Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem Biol* **1996**, 3, 913-921.
- [23] Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C. and Walsh, C. T. A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol* **1996**, 3, 923-936.
- [24] Quadri, L. E., Weinreb, P. H., Lei, M., Nakano, M. M., Zuber, P. and Walsh, C. T. Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry* **1998**, 37, 1585-1595.
- [25] Reuter, K., Mofid, M. R., Marahiel, M. A. and Ficner, R. Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme Sfp: A prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily. *Embo J* **1999**, 18, 6823-6831.

- [26] Schwarzer, D., Mootz, H. D., Linne, U. and Marahiel, M. A. Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99, 14083-14088.
- [27] Yeh, E., Kohli, R. M., Bruner, S. D. and Walsh, C. T. Type II thioesterase restores activity of a NRPS module stalled with an aminoacyl-S-enzyme that cannot be elongated. *ChemBiochem* **2004**, 5, 1290-1293.
- [28] Ehmann, D. E., Shaw-Reid, C. A., Losey, H. C. and Walsh, C. T. The EntF and EntE adenylation domains of *Escherichia coli* enterobactin synthetase: Sequestration and selectivity in acyl-AMP transfers to thiolation domain cosubstrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, 97, 2509-2514.
- [29] Koglin, A., Mofid, M. R., Lohr, F., Schafer, B., Rogov, V. V., Blum, M. M., Mittag, T., Marahiel, M. A., Bernhard, F. and Dotsch, V. Conformational switches modulate protein interactions in peptide antibiotic synthetases. *Science* **2006**, 312, 273-276.
- [30] Bergendahl, V., Linne, U. and Marahiel, M. A. Mutational analysis of the C-domain in nonribosomal peptide synthesis. *Eur J Biochem* **2002**, 269, 620-629.
- [31] Stachelhaus, T., Mootz, H. D., Bergendahl, V. and Marahiel, M. A. Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *J Biol Chem* **1998**, 273, 22773-22781.
- [32] Belshaw, P. J., Walsh, C. T. and Stachelhaus, T. Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. *Science* **1999**, 284, 486-489.
- [33] Clugston, S. L., Sieber, S. A., Marahiel, M. A. and Walsh, C. T. Chirality of peptide bond-forming condensation domains in nonribosomal peptide synthetases: The C5 domain of tyrocidine synthetase is a (D)C(L) catalyst. *Biochemistry* **2003**, 42, 12095-12104.
- [34] Keating, T. A., Marshall, C. G., Walsh, C. T. and Keating, A. E. The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains. *Nat Struct Biol* **2002**, 9, 522-526.
- [35] Samel, S. A., Schoenafinger, G., Knappe, T. A., Marahiel, M. A. and Essen, L. O. Structural and functional insights into a peptide bond-forming bidomain from a nonribosomal peptide synthetase. *Structure* **2007**, 15, 781-792.
- [36] Bruner, S. D., Weber, T., Kohli, R. M., Schwarzer, D., Marahiel, M. A., Walsh, C. T. and Stubbs, M. T. Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure* **2002**, 10, 301-310.
- [37] Hubbard, B. K. and Walsh, C. T. Vancomycin assembly: Nature's way. *Angew Chem Int Ed Engl* **2003**, 42, 730-765.
- [38] Schracke, N., Linne, U., Mahlert, C. and Marahiel, M. A. Synthesis of linear gramicidin requires the cooperation of two independent reductases. *Biochemistry* **2005**, 44, 8507-8513.
- [39] Kopp, F., Mahlert, C., Grunewald, J. and Marahiel, M. A. Peptide macrocyclization: The reductase of the nostocyclopeptide synthetase triggers the self-assembly of a macrocyclic imine. *J Am Chem Soc* **2006**, 128, 16478-16479.
- [40] Tanovic, A., Samel, S. A., Essen, L. O. and Marahiel, M. A. Crystal structure of the termination module of a nonribosomal peptide synthetase. *Science* **2008**, 321, 659-663.
- [41] Konz, D. and Marahiel, M. A. How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem Biol* **1999**, 6, R39-48.
- [42] Stachelhaus, T. and Walsh, C. T. Mutational analysis of the epimerization domain in the initiation module pheate of gramicidin s synthetase. *Biochemistry* **2000**, 39, 5775-5787.
- [43] Luo, L., Kohli, R. M., Onishi, M., Linne, U., Marahiel, M. A. and Walsh, C. T. Timing of epimerization and condensation reactions in nonribosomal peptide assembly lines: Kinetic analysis of phenylalanine activating elongation modules of tyrocidine synthetase B. *Biochemistry* **2002**, 41, 9184-9196.
- [44] Hahn, M. and Stachelhaus, T. Selective interaction between nonribosomal peptide synthetases is facilitated by short communication-mediating domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, 101, 15585-15590.
- [45] Stein, D. B., Linne, U., Hahn, M. and Marahiel, M. A. Impact of epimerization domains on the intermodular transfer of enzyme-bound intermediates in nonribosomal peptide synthesis. *ChemBiochem* **2006**, 7, 1807-1814.
- [46] Velkov, T. and Lawen, A. Photoaffinity labeling of the N-methyltransferase domains of cyclosporin synthetase. *Photochem Photobiol* **2003**, 77, 129-137.
- [47] de Crecy-Lagard, V., Saurin, W., Thibaut, D., Gil, P., Naudin, L., Crouzet, J. and Blanc, V. Streptogramin B biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis* and *Streptomyces virginiae*: Molecular characterization of the last structural peptide synthetase gene. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**, 41, 1904-1909.
- [48] Schauwecker, F., Pfennig, F., Grammel, N. and Keller, U. Construction and *in vitro* analysis of a new bi-modular polypeptide synthetase for synthesis of N-methylated acyl peptides. *Chem Biol* **2000**, 7, 287-297.

- [49] Zocher, R., Nihira, T., Paul, E., Madry, N., Peeters, H., Kleinkauf, H. and Keller, U. Biosynthesis of cyclosporin A: Partial purification and properties of a multifunctional enzyme from *Tolypocladium inflatum*. *Biochemistry* **1986**, 25, 550-553.
- [50] Laursen, B. S., Sorensen, H. P., Mortensen, K. K. and Sperling-Petersen, H. U. Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **2005**, 69, 101-123.
- [51] Rouhiainen, L., Paulin, L., Suomalainen, S., Hyytiainen, H., Buikema, W., Haselkorn, R. and Sivonen, K. Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90. *Mol Microbiol* **2000**, 37, 156-167.
- [52] Schoenafinger, G., Schracke, N., Linne, U. and Marahiel, M. A. Formylation domain: An essential modifying enzyme for the nonribosomal biosynthesis of linear gramicidin. *J Am Chem Soc* **2006**, 128, 7406-7407.
- [53] Miller, D. A., Walsh, C. T. and Luo, L. C-methyltransferase and cyclization domain activity at the intraprotein PK/NRP switch point of yersiniabactin synthetase. *J Am Chem Soc* **2001**, 123, 8434-8435.
- [54] Du, L., Chen, M., Sanchez, C. and Shen, B. An oxidation domain in the BlmIII non-ribosomal peptide synthetase probably catalyzing thiazole formation in the biosynthesis of the anti-tumor drug bleomycin in *Streptomyces verticillus* ATCC15003. *FEMS Microbiol Lett* **2000**, 189, 171-175.
- [55] Reimann, C., Patel, H. M., Serino, L., Barone, M., Walsh, C. T. and Haas, D. Essential PchG-dependent reduction in pyochelin biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **2001**, 183, 813-820.
- [56] Mootz, H. D. and Marahiel, M. A. The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: Complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *J Bacteriol* **1997**, 179, 6843-6850.
- [57] Miao, V., Coeffet-Legal, M. F., Brian, P., Brost, R., Penn, J., Whiting, A., Martin, S., Ford, R., Parr, I., Bouchard, M., Silva, C. J., Wrigley, S. K. and Baltz, R. H. Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: Cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry. *Microbiology* **2005**, 151, 1507-1523.
- [58] Cosmina, P., Rodriguez, F., de Ferra, F., Grandi, G., Perego, M., Venema, G. and van Sinderen, D. Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **1993**, 8, 821-831.
- [59] Gehring, A. M., Mori, I. and Walsh, C. T. Reconstitution and characterization of the *Escherichia coli* enterobactin synthetase from EntB, EntE, and EntF. *Biochemistry* **1998**, 37, 2648-2659.
- [60] Robbel, L., Hoyer, K. M. and Marahiel, M. A. TioS T-TE--a prototypical thioesterase responsible for cyclodimerization of the quinoline- and quinoxaline-type class of chromodepsipeptides. *Febs J* **2009**, 276, 1641-1653.
- [61] Lautru, S., Deeth, R. J., Bailey, L. M. and Challis, G. L. Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Nat Chem Biol* **2005**, 1, 265-269.
- [62] Strieker, M., Nolan, E. M., Walsh, C. T. and Marahiel, M. A. Stereospecific synthesis of threo- and erythro- β -hydroxyglutamic acid during kutzneride biosynthesis. *J Am Chem Soc* **2009**, 131, 13523-13530.
- [63] Guenzi, E., Galli, G., Grgurina, I., Gross, D. C. and Grandi, G. Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster. A link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. *J Biol Chem* **1998**, 273, 32857-32863.
- [64] Felnagle, E. A., Rondon, M. R., Berti, A. D., Crosby, H. A. and Thomas, M. G. Identification of the biosynthetic gene cluster and an additional gene for resistance to the antituberculosis drug capreomycin. *Appl Environ Microbiol* **2007**, 73, 4162-4170.
- [65] Wilkinson, B. and Micklefield, J. Chapter 14. Biosynthesis of nonribosomal peptide precursors. *Methods Enzymol* **2009**, 458, 353-378.
- [66] Walsh, C. T., Chen, H., Keating, T. A., Hubbard, B. K., Losey, H. C., Luo, L., Marshall, C. G., Miller, D. A. and Patel, H. M. Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Curr Opin Chem Biol* **2001**, 5, 525-534.
- [67] Harle, J. and Bechthold, A. Chapter 12. The power of glycosyltransferases to generate bioactive natural compounds. *Methods Enzymol* **2009**, 458, 309-333.
- [68] Hojati, Z., Milne, C., Harvey, B., Gordon, L., Borg, M., Flett, F., Wilkinson, B., Sidebottom, P. J., Rudd, B. A., Hayes, M. A., Smith, C. P. and Micklefield, J. Structure, biosynthetic origin, and engineered biosynthesis of calcium-dependent antibiotics from *Streptomyces coelicolor*. *Chem Biol* **2002**, 9, 1175-1187.
- [69] Gellert, M., O'Dea, M. H., Itoh, T. and Tomizawa, J. Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1976**, 73, 4474-4478.
- [70] Vaillancourt, F. H., Yin, J. and Walsh, C. T. SyrB2 in syringomycin E biosynthesis is a nonheme FeII α -ketoglutarate- and O₂-dependent halogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, 102, 10111-10116.

- [71] Singh, G. M., Fortin, P. D., Koglin, A. and Walsh, C. T. β -hydroxylation of the aspartyl residue in the phytotoxin syringomycin E: Characterization of two candidate hydroxylases AspH and SyrP in *Pseudomonas syringae*. *Biochemistry* **2008**, 47, 11310-11320.
- [72] Meneely, K. M. and Lamb, A. L. Biochemical characterization of a flavin adenine dinucleotide-dependent monooxygenase, ornithine hydroxylase from *Pseudomonas aeruginosa*, suggests a novel reaction mechanism. *Biochemistry* **2007**, 46, 11930-11937.
- [73] McMorran, B. J., Kumara, H. M., Sullivan, K. and Lamont, I. L. Involvement of a transformylase enzyme in siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **2001**, 147, 1517-1524.
- [74] van Berkel, W. J., Kamerbeek, N. M. and Fraaije, M. W. Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *J Biotechnol* **2006**, 124, 670-689.
- [75] Sutton, W. B. Mechanism of action and crystallization of lactic oxidative decarboxylase from *Mycobacterium phlei*. *J Biol Chem* **1957**, 226, 395-405.
- [76] de Jong, E., Van Berkel, W. J., van der Zwan, R. P. and de Bont, J. A. M. Purification and characterization of vanillyl-alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum*. A novel aromatic alcohol oxidase containing covalently bound FAD. *Eur J Biochem* **1992**, 208, 651-657.
- [77] de Lorenzo, V., Bindereif, A., Paw, B. H. and Neilands, J. B. Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **1986**, 165, 570-578.
- [78] Kopp, F., Linne, U., Oberthur, M. and Marahiel, M. A. Harnessing the chemical activation inherent to carrier protein-bound thioesters for the characterization of lipopeptide fatty acid tailoring enzymes. *J Am Chem Soc* **2008**, 130, 2656-2666.
- [79] Moonen, M. J. H., Fraaije, M. W., Rietjens, Y. M. C. M., Laane, C. and van Berkel, W. J. H. Flavoenzyme-catalyzed oxygenations and oxidations of phenolic compounds. *Adv Synth Catal* **2002**, 344, 1-13.
- [80] Entsch, B. and Ballou, D. P. Purification, properties, and oxygen reactivity of p-hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta* **1989**, 999, 313-322.
- [81] Entsch, B. and van Berkel, W. J. Structure and mechanism of para-hydroxybenzoate hydroxylase. *Faseb J* **1995**, 9, 476-483.
- [82] Entsch, B., Cole, L. J. and Ballou, D. P. Protein dynamics and electrostatics in the function of p-hydroxybenzoate hydroxylase. *Arch Biochem Biophys* **2005**, 433, 297-311.
- [83] Wierenga, R. K., Terpstra, P. and Hol, W. G. Prediction of the occurrence of the ADP-binding $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J Mol Biol* **1986**, 187, 101-107.
- [84] Wierenga, R. K., de Jong, R. J., Kalk, K. H., Hol, W. G. and Drenth, J. Crystal structure of p-hydroxybenzoate hydroxylase. *J Mol Biol* **1979**, 131, 55-73.
- [85] Malito, E., Alfieri, A., Fraaije, M. W. and Mattevi, A. Crystal structure of a baeyer-villiger monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, 101, 13157-13162.
- [86] Spector, T. and Massey, V. P-hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas fluorescens*. Evidence for an oxygenated flavin intermediate. *J Biol Chem* **1972**, 247, 5632-5636.
- [87] Moran, G. R., Entsch, B., Palfey, B. A. and Ballou, D. P. Mechanistic insights into p-hydroxybenzoate hydroxylase from studies of the mutant Ser212Ala. *Biochemistry* **1999**, 38, 6292-6299.
- [88] Yeh, E., Cole, L. J., Barr, E. W., Bollinger, J. M., Jr., Ballou, D. P. and Walsh, C. T. Flavin redox chemistry precedes substrate chlorination during the reaction of the flavin-dependent halogenase RebH. *Biochemistry* **2006**, 45, 7904-7912.
- [89] Howell, L. G., Spector, T. and Massey, V. Purification and properties of p-hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas fluorescens*. *J Biol Chem* **1972**, 247, 4340-4350.
- [90] Husain, M. and Massey, V. Kinetic studies on the reaction of p-hydroxybenzoate hydroxylase. Agreement of steady state and rapid reaction data. *J Biol Chem* **1979**, 254, 6657-6666.
- [91] Beaty, N. B. and Ballou, D. P. The oxidative half-reaction of liver microsomal FAD-containing monooxygenase. *J Biol Chem* **1981**, 256, 4619-4625.
- [92] Beaty, N. B. and Ballou, D. P. The reductive half-reaction of liver microsomal FAD-containing monooxygenase. *J Biol Chem* **1981**, 256, 4611-4618.
- [93] Jones, K. C. and Ballou, D. P. Reactions of the 4a-hydroperoxide of liver microsomal flavin-containing monooxygenase with nucleophilic and electrophilic substrates. *J Biol Chem* **1986**, 261, 2553-2559.
- [94] Meneely, K. M., Barr, E. W., Bollinger, J. M., Jr. and Lamb, A. L. Kinetic mechanism of ornithine hydroxylase (PvdA) from *Pseudomonas aeruginosa*: Substrate triggering of O₂ addition but not flavin reduction. *Biochemistry* **2009**, 48, 4371-4376.
- [95] Hausinger, R. P. FeII/ α -ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **2004**, 39, 21-68.
- [96] Clifton, I. J., McDonough, M. A., Ehrismann, D., Kershaw, N. J., Granatino, N. and Schofield, C. J. Structural studies on 2-oxoglutarate oxygenases and related double-stranded β -helix fold proteins. *J Inorg Biochem* **2006**, 100, 644-669.

- [97] Bruijninx, P. C., van Koten, G. and Klein Gebbink, R. J. Mononuclear non-heme iron enzymes with the 2-His-1-carboxylate facial triad: Recent developments in enzymology and modeling studies. *Chem Soc Rev* **2008**, 37, 2716-2744.
- [98] Costas, M., Mehn, M. P., Jensen, M. P. and Que, L., Jr. Dioxygen activation at mononuclear nonheme iron active sites: Enzymes, models, and intermediates. *Chem Rev* **2004**, 104, 939-986.
- [99] Vaillancourt, F. H., Bolin, J. T. and Eltis, L. D. The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **2006**, 41, 241-267.
- [100] Yu, B., Edstrom, W. C., Benach, J., Hamuro, Y., Weber, P. C., Gibney, B. R. and Hunt, J. F. Crystal structures of catalytic complexes of the oxidative DNA/RNA repair enzyme AlkB. *Nature* **2006**, 439, 879-884.
- [101] Tuderman, L., Myllyla, R. and Kivirikko, K. I. Mechanism of the prolyl hydroxylase reaction. 1. Role of co-substrates. *Eur J Biochem* **1977**, 80, 341-348.
- [102] Hoffart, L. M., Barr, E. W., Guyer, R. B., Bollinger, J. M., Jr. and Krebs, C. Direct spectroscopic detection of a C-H-cleaving high-spin Fe(IV) complex in a prolyl-4-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, 103, 14738-14743.
- [103] Zhang, Z., Ren, J., Stammers, D. K., Baldwin, J. E., Harlos, K. and Schofield, C. J. Structural origins of the selectivity of the trifunctional oxygenase clavaminic acid synthase. *Nat Struct Biol* **2000**, 7, 127-133.
- [104] Strieker, M., Kopp, F., Mahlert, C., Essen, L. O. and Marahiel, M. A. Mechanistic and structural basis of stereospecific C β -hydroxylation in calcium-dependent antibiotic, a daptomycin-type lipopeptide. *ACS Chem Biol* **2007**, 2, 187-196.
- [105] Haltli, B., Tan, Y., Magarvey, N. A., Wagenaar, M., Yin, X., Greenstein, M., Hucul, J. A. and Zabriskie, T. M. Investigating β -hydroxyenduracididine formation in the biosynthesis of the mannopeptimycins. *Chem Biol* **2005**, 12, 1163-1168.
- [106] Price, J. C., Barr, E. W., Hoffart, L. M., Krebs, C. and Bollinger, J. M., Jr. Kinetic dissection of the catalytic mechanism of taurine: α -ketoglutarate dioxygenase (TauD) from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **2005**, 44, 8138-8147.
- [107] O'Brien, J. R., Schuller, D. J., Yang, V. S., Dillard, B. D. and Lanzilotta, W. N. Substrate-induced conformational changes in *Escherichia coli* taurine/ α -ketoglutarate dioxygenase and insight into the oligomeric structure. *Biochemistry* **2003**, 42, 5547-5554.
- [108] Que, L., Jr. One motif--many different reactions. *Nat Struct Biol* **2000**, 7, 182-184.
- [109] Vaillancourt, F. H., Yeh, E., Vosburg, D. A., Garneau-Tsodikova, S. and Walsh, C. T. Nature's inventory of halogenation catalysts: Oxidative strategies predominate. *Chem Rev* **2006**, 106, 3364-3378.
- [110] Zhou, J., Gunsior, M., Bachmann, B. O., Townsend, C. A. and Solomon, E. I. Substrate binding to the α -ketoglutarate-dependent non-heme iron enzyme clavamate synthase 2: Coupling mechanism of oxidative decarboxylation and hydroxylation. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, 120, 13539-13540.
- [111] Purpero, V. and Moran, G. R. The diverse and pervasive chemistries of the α -keto acid dependent enzymes. *J Biol Inorg Chem* **2007**, 12, 587-601.
- [112] Schenk, G., Pau, M. Y. and Solomon, E. I. Comparison between the geometric and electronic structures and reactivities of [FeNO] $_7$ and [FeO $_2$] $_8$ complexes: A density functional theory study. *J Am Chem Soc* **2004**, 126, 505-515.
- [113] Price, J. C., Barr, E. W., Glass, T. E., Krebs, C. and Bollinger, J. M., Jr. Evidence for hydrogen abstraction from C1 of taurine by the high-spin Fe(IV) intermediate detected during oxygen activation by taurine: α -ketoglutarate dioxygenase (TauD). *J Am Chem Soc* **2003**, 125, 13008-13009.
- [114] Riggs-Gelasco, P. J., Price, J. C., Guyer, R. B., Brehm, J. H., Barr, E. W., Bollinger, J. M., Jr. and Krebs, C. EXAFS spectroscopic evidence for an Fe=O unit in the Fe(IV) intermediate observed during oxygen activation by taurine: α -ketoglutarate dioxygenase. *J Am Chem Soc* **2004**, 126, 8108-8109.
- [115] Cantoni, G. L. Biological methylation: Selected aspects. *Annu Rev Biochem* **1975**, 44, 435-451.
- [116] Schubert, H. L., Blumenthal, R. M. and Cheng, X. Many paths to methyltransfer: A chronicle of convergence. *Trends Biochem Sci* **2003**, 28, 329-335.
- [117] Attieh, J. M., Hanson, A. D. and Saini, H. S. Purification and characterization of a novel methyltransferase responsible for biosynthesis of halomethanes and methanethiol in *Brassica oleracea*. *J Biol Chem* **1995**, 270, 9250-9257.
- [118] Speedie, M. K., Hornemann, U. and Floss, H. G. Isolation and characterization of tryptophan transaminase and indolepyruvate C-methyltransferase. Enzymes involved in indolmycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *J Biol Chem* **1975**, 250, 7819-7825.
- [119] Wu, J. C. and Santi, D. V. Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase. *J Biol Chem* **1987**, 262, 4778-4786.
- [120] Lee, P. T., Hsu, A. Y., Ha, H. T. and Clarke, C. F. A C-methyltransferase involved in both ubiquinone and menaquinone biosynthesis: Isolation and identification of the *Escherichia coli* UbiE gene. *J Bacteriol* **1997**, 179, 1748-1754.

- [121] Parsons, J. F., Greenhagen, B. T., Shi, K., Calabrese, K., Robinson, H. and Ladner, J. E. Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **2007**, 46, 1821-1828.
- [122] Li, S., Anzai, Y., Kinoshita, K., Kato, F. and Sherman, D. H. Functional analysis of MycE and MycF, two O-methyltransferases involved in the biosynthesis of mycinamicin macrolide antibiotics. *Chembiochem* **2009**, 10, 1297-1301.
- [123] Zubieta, C., He, X. Z., Dixon, R. A. and Noel, J. P. Structures of two natural product methyltransferases reveal the basis for substrate specificity in plant O-methyltransferases. *Nat Struct Biol* **2001**, 8, 271-279.
- [124] Mahlert, C., Kopp, F., Thirlway, J., Micklefield, J. and Marahiel, M. A. Stereospecific enzymatic transformation of α -ketoglutarate to (2*S*,3*R*)-3-methyl glutamate during acidic lipopeptide biosynthesis. *J Am Chem Soc* **2007**, 129, 12011-12018.
- [125] Pacholec, M., Tao, J. and Walsh, C. T. CouO and NovO: C-methyltransferases for tailoring the aminocoumarin scaffold in coumermycin and novobiocin antibiotic biosynthesis. *Biochemistry* **2005**, 44, 14969-14976.
- [126] Chen, H., O'Connor, S., Cane, D. E. and Walsh, C. T. Epothilone biosynthesis: Assembly of the methylthiazolylcarboxy starter unit on the EpoB subunit. *Chem Biol* **2001**, 8, 899-912.
- [127] Martin, J. L. and McMillan, F. M. Sam (dependent) I am: The S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Curr Opin Struct Biol* **2002**, 12, 783-793.
- [128] Cheng, X., Kumar, S., Posfai, J., Pflugrath, J. W. and Roberts, R. J. Crystal structure of the HhaI DNA methyltransferase complexed with S-adenosyl-L-methionine. *Cell* **1993**, 74, 299-307.
- [129] Kozbial, P. Z. and Mushegian, A. R. Natural history of S-adenosylmethionine-binding proteins. *BMC Struct Biol* **2005**, 5, 19.
- [130] Mascaro, L., Jr., Horhammer, R., Eisenstein, S., Seller, L. K., Mascaro, K. and Floss, H. G. Synthesis of methionine carrying a chiral methyl group and its use in determining the steric course of the enzymatic C-methylation of indolepyruvate during indolmycin biosynthesis. *J Am Chem Soc* **1977**, 99, 273-274.
- [131] Guo, H. B. and Guo, H. Mechanism of histone methylation catalyzed by protein lysine methyltransferase SET7/9 and origin of product specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, 104, 8797-8802.
- [132] Youngblood, B., Shieh, F. K., Buller, F., Bullock, T. and Reich, N. O. S-adenosyl-L-methionine-dependent methyl transfer: Observable precatalytic intermediates during DNA cytosine methylation. *Biochemistry* **2007**, 46, 8766-8775.
- [133] Lakowski, T. M. and Frankel, A. A kinetic study of human protein arginine N-methyltransferase 6 reveals a distributive mechanism. *J Biol Chem* **2008**, 283, 10015-10025.
- [134] Sofia, H. J., Chen, G., Hetzler, B. G., Reyes-Spindola, J. F. and Miller, N. E. Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: Functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res* **2001**, 29, 1097-1106.
- [135] Westrich, L., Heide, L. and Li, S. M. CloN6, a novel methyltransferase catalysing the methylation of the pyrrole-2-carboxyl moiety of chlorobiocin. *Chembiochem* **2003**, 4, 768-773.
- [136] Keller, S., Wage, T., Hohaus, K., Holzer, M., Eichhorn, E. and van Pee, K. H. Purification and partial characterization of tryptophan 7-halogenase (PrnA) from *Pseudomonas fluorescens* this work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) through the Graduiertenkolleg "Struktur-Eigenschafts-Beziehungen bei Heterocyclen", the environment and climate research and technology development programme of the European Union, the Sächsische Staatsministerium für Umwelt und Landesentwicklung, the Max-Buchner-Stiftung, and the Fonds der Chemischen Industrie. Samples of *P. fluorescens* BL915DeltaORF1-4 with pPEH14(prnA) and pPEH14(prnC) were obtained from Dr. J. M. Ligon, Novartis Agribusiness Biotechnology Research, Inc., Research Triangle, NC (USA) and NADH oxidase (from *Thermus thermophilus*) from Prof. Helmut Erdmann, Fachhochschule Flensburg (Germany). *Angew Chem Int Ed Engl* **2000**, 39, 2300-2302.
- [137] Yeh, E., Blasiak, L. C., Koglin, A., Drennan, C. L. and Walsh, C. T. Chlorination by a long-lived intermediate in the mechanism of flavin-dependent halogenases. *Biochemistry* **2007**, 46, 1284-1292.
- [138] Hager, L. P., Morris, D. R., Brown, F. S. and Eberwein, H. Chloroperoxidase. II. Utilization of halogen anions. *J Biol Chem* **1966**, 241, 1769-1777.
- [139] Carter-Franklin, J. N. and Butler, A. Vanadium bromoperoxidase-catalyzed biosynthesis of halogenated marine natural products. *J Am Chem Soc* **2004**, 126, 15060-15066.
- [140] Blasiak, L. C., Vaillancourt, F. H., Walsh, C. T. and Drennan, C. L. Crystal structure of the non-haem iron halogenase SyrB2 in *Syngomycin biosynthesis*. *Nature* **2006**, 440, 368-371.
- [141] Sono, M., Roach, M. P., Coulter, E. D. and Dawson, J. H. Heme-containing oxygenases. *Chem Rev* **1996**, 96, 2841-2888.
- [142] Bernhardt, R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J Biotechnol* **2006**, 124, 128-145.
- [143] Chen, H. and Walsh, C. T. Coumarin formation in novobiocin biosynthesis: β -hydroxylation of the aminoacyl enzyme tyrosyl-S-NovH by a cytochrome P450 NovI. *Chem Biol* **2001**, 8, 301-312.

- [144] Abergel, R. J., Zawadzka, A. M. and Raymond, K. N. Petrobactin-mediated iron transport in pathogenic bacteria: Coordination chemistry of an unusual 3,4-catecholate/citrate siderophore. *J Am Chem Soc* **2008**, 130, 2124-2125.
- [145] Heemstra, J. R., Walsh, C. T. and Sattely, E. S. Enzymatic tailoring of ornithine in the biosynthesis of the rhizobium cyclic trihydroxamate siderophore vicibactin. *J Am Chem Soc* **2009**, 131, 15317-15329.
- [146] Coderre, P. E. and Earhart, C. F. The EntD gene of the *Escherichia coli* K12 enterobactin gene cluster. *J Gen Microbiol* **1989**, 135, 3043-3055.
- [147] Cotton, J. L., Tao, J. and Balibar, C. J. Identification and characterization of the *Staphylococcus aureus* gene cluster coding for staphyloferrin A. *Biochemistry* **2009**, 48, 1025-1035.
- [148] Challis, G. L. and Ravel, J. Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: Structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase. *FEMS Microbiol Lett* **2000**, 187, 111-114.
- [149] Challis, G. L., Ravel, J. and Townsend, C. A. Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem Biol* **2000**, 7, 211-224.
- [150] Challis, G. L. Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiology* **2008**, 154, 1555-1569.
- [151] Barona-Gomez, F., Lautru, S., Francou, F. X., Leblond, P., Pernodet, J. L. and Challis, G. L. Multiple biosynthetic and uptake systems mediate siderophore-dependent iron acquisition in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877. *Microbiology* **2006**, 152, 3355-3366.
- [152] Ju, J., Ozanick, S. G., Shen, B. and Thomas, M. G. Conversion of (2S)-arginine to (2S,3R)-capreomycin by VioC and VioD from the viomycin biosynthetic pathway of *Streptomyces* sp. Strain ATCC11861. *Chembiochem* **2004**, 5, 1281-1285.
- [153] Dye, C., Scheele, S., Dolin, P., Pathania, V. and Raviglione, M. C. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: Estimated incidence, prevalence, and mortality by country. Who global surveillance and monitoring project. *Jama* **1999**, 282, 677-686.
- [154] Fauci, A. S. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: The national institute of allergy and infectious diseases research agenda and recommendations for priority research. *J Infect Dis* **2008**, 197, 1493-1498.
- [155] Bartz, Q. R., Ehrlich, J., Mold, J. D., Penner, M. A. and Smith, R. M. Viomycin, a new tuberculostatic antibiotic. *Am Rev Tuberc* **1951**, 63, 4-6.
- [156] Yin, X., O'Hare, T., Gould, S. J. and Zabriskie, T. M. Identification and cloning of genes encoding viomycin biosynthesis from *Streptomyces vinaceus* and evidence for involvement of a rare oxygenase. *Gene* **2003**, 312, 215-224.
- [157] Barkei, J. J., Kevany, B. M., Felnagle, E. A. and Thomas, M. G. Investigations into viomycin biosynthesis by using heterologous production in *Streptomyces lividans*. *Chembiochem* **2009**, 10, 366-376.
- [158] Thomas, M. G., Chan, Y. A. and Ozanick, S. G. Deciphering tuberactinomycin biosynthesis: Isolation, sequencing, and annotation of the viomycin biosynthetic gene cluster. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**, 47, 2823-2830.
- [159] Fei, X., Yin, X., Zhang, L. and Zabriskie, T. M. Roles of VioG and VioQ in the incorporation and modification of the capreomycin residue in the peptide antibiotic viomycin. *J Nat Prod* **2007**, 70, 618-622.
- [160] Frey, P. A. and Reed, G. H. Lysine 2,3-aminomutase and the mechanism of the interconversion of lysine and β -lysine. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **1993**, 66, 1-39.
- [161] Legrain, C. and Stalon, V. Ornithine carbamoyltransferase from *Escherichia coli* W. Purification, structure and steady-state kinetic analysis. *Eur J Biochem* **1976**, 63, 289-301.
- [162] Yin, X. and Zabriskie, T. M. VioC is a non-heme iron, α -ketoglutarate-dependent oxygenase that catalyzes the formation of 3S-hydroxy-L-arginine during viomycin biosynthesis. *Chembiochem* **2004**, 5, 1274-1277.
- [163] Yin, X., McPhail, K. L., Kim, K. J. and Zabriskie, T. M. Formation of the nonproteinogenic amino acid 2S,3R-capreomycin by VioD from the viomycin biosynthesis pathway. *Chembiochem* **2004**, 5, 1278-1281.
- [164] Yamada, T. and Bierhaus, K. H. Viomycin favours the formation of 70S ribosome couples. *Mol Gen Genet* **1978**, 161, 261-265.
- [165] Modolell, J. and Vazquez. The inhibition of ribosomal translocation by viomycin. *Eur J Biochem* **1977**, 81, 491-497.
- [166] Liou, Y. F. and Tanaka, N. Dual actions of viomycin on the ribosomal functions. *Biochem Biophys Res Commun* **1976**, 71, 477-483.
- [167] Johansen, S. K., Maus, C. E., Plikaytis, B. B. and Douthwaite, S. Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using TlyA-encoded 2'-O-methylations in 16S and 23S rRNAs. *Mol Cell* **2006**, 23, 173-182.

- [168] He, H., Williamson, R. T., Shen, B., Graziani, E. I., Yang, H. Y., Sakya, S. M., Petersen, P. J. and Carter, G. T. Mannopectimycins, novel antibacterial glycopeptides from *Streptomyces hygroscopicus*, LL-AC98. *J Am Chem Soc* **2002**, 124, 9729-9736.
- [169] Singh, M. P., Petersen, P. J., Weiss, W. J., Janso, J. E., Luckman, S. W., Lenoy, E. B., Bradford, P. A., Testa, R. T. and Greenstein, M. Mannopectimycins, new cyclic glycopeptide antibiotics produced by *Streptomyces hygroscopicus* LL-AC98: Antibacterial and mechanistic activities. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**, 47, 62-69.
- [170] Magarvey, N. A., Haltli, B., He, M., Greenstein, M. and Hucul, J. A. Biosynthetic pathway for mannopectimycins, lipoglycopeptide antibiotics active against drug-resistant gram-positive pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**, 50, 2167-2177.
- [171] Yin, X. and Zabriskie, T. M. The enduracidin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces fungicidicus*. *Microbiology* **2006**, 152, 2969-2983.
- [172] Hatano, K., Nogami, I., Higashide, E. and Kishi, T. Biosynthesis of enduracidin: Origin of enduracididine and other amino acids. *Agric Biol Chem* **1984**, 48, 1503-1508.
- [173] Ruzin, A., Singh, G., Severin, A., Yang, Y., Dushin, R. G., Sutherland, A. G., Minnick, A., Greenstein, M., May, M. K., Shlaes, D. M. and Bradford, P. A. Mechanism of action of the mannopectimycins, a novel class of glycopeptide antibiotics active against vancomycin-resistant gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**, 48, 728-738.
- [174] Koehn, F. E. New strategies and methods in the discovery of natural product anti-infective agents: The mannopectimycins. *J Med Chem* **2008**, 51, 2613-2617.
- [175] Breukink, E. and de Kruijff, B. Lipid II as a target for antibiotics. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, 5, 321-332.
- [176] Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Laboratory press, Cold spring Harbor, NY* **1989**,
- [177] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, 227, 680-685.
- [178] Bennett, J. and Scott, K. J. Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using coomassie brilliant blue. *Anal Biochem* **1971**, 43, 173-182.
- [179] Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**, 72, 248-254.
- [180] Gill, S. C. and von Hippel, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **1989**, 182, 319-326.
- [181] Jones, R. G. Studies on imidazoles. II. The synthesis of 5-imidazolecarboxylates from glycine and substituted glycine esters. *J Am Chem Soc* **1949**, 71, 644-647.
- [182] Lin, Y.-M. and Miller, M. J. Practical synthesis of hydroxamate-derived siderophore components by an indirect oxidation method and synthesis of a dig-siderophore conjugate and a biotin-siderophore conjugate. *J Org Chem* **1999**, 64, 7451-7458.
- [183] Thieriet, N., Alsina, J., Giralt, E., Guibé, F. and Albericio, F. Use of alloc-amino acids in solid-phase peptide synthesis. Tandem deprotection-coupling reactions using neutral conditions. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 7275-7278.
- [184] Merrifield, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of atetrapeptide. *J Am Chem Soc* **1963**, 85, 2149-2152.
- [185] Stein, D. B., Linne, U. and Marahiel, M. A. Utility of epimerization domains for the redesign of nonribosomal peptide synthetases. *Febs J* **2005**, 272, 4506-4520.
- [186] Duthaler, R. O. Recent developments in the stereoselective synthesis of α -aminoacids. *Tetrahedron* **1994**, 50, 1539-1650.
- [187] Davis, F. A., Lee, S., Zhang, H. and Fanelli, D. L. Applications of the sulfinimine-mediated asymmetric strecker synthesis to the synthesis of α -alkyl α -amino acids. *J Org Chem* **2000**, 65, 8704-8708.
- [188] Davis, F. A., Portonovo, P. S., Reddy, R. E. and Chiu Yh, Y. Asymmetric strecker synthesis using enantiopure sulfinimines and diethylaluminium cyanide: The alcohol effect. *J Org Chem* **1996**, 61, 440-441.
- [189] Davis, F. A., Reddy, R. E. and Portonovo, P. S. Asymmetric strecker synthesis using enantiopure sulfinimines: A convenient synthesis of α -amino acids. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 9351-9354.
- [190] Li, B. F., Yuan, K., Zhang, M. J., Wu, H., Dai, L. X., Wang, Q. R. and Hou, X. L. Highly diastereoselective strecker reaction of enolizable aliphatic sulfinimines. *J Org Chem* **2003**, 68, 6264-6267.
- [191] Buchenau, B. and Thauer, R. K. Tetrahydrofolate-specific enzymes in *Methanosarcina barkeri* and growth dependence of this methanogenic archaeon on folic acid or p-aminobenzoic acid. *Arch Microbiol* **2004**, 182, 313-325.
- [192] Rabinowitz, J. C. and Pricer, W. E., Jr. Formyltetrahydrofolate synthetase. I. Isolation and crystallization of the enzyme. *J Biol Chem* **1962**, 237, 2898-2902.

- [193] Lovell, C. R., Przybyla, A. and Ljungdahl, L. G. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Clostridium thermoaceticum* gene encoding thermostable formyltetrahydrofolate synthetase. *Arch Microbiol* **1988**, 149, 280-285.
- [194] Himes, R. H. and Rabinowitz, J. C. Formyltetrahydrofolate synthetase. III. Studies on the mechanism of the reaction. *J Biol Chem* **1962**, 237, 2915-2925.
- [195] Kabsch, W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.* **1993**, 26, 795-800.
- [196] Vagin, A. and Teplyakov, A. Molrep: An automated program for molecular replacement. *J Appl Cryst* **1997**, 30, 1022-1025.
- [197] Emsley, P. and Cowtan, K. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, 60, 2126-2132.
- [198] Collaborative Computing Project Number 4. The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1994**, 50, 760-763.
- [199] Samel, S. A., Marahiel, M. A. and Essen, L. O. How to tailor non-ribosomal peptide products--new clues about the structures and mechanisms of modifying enzymes. *Mol Biosyst* **2008**, 4, 387-393.
- [200] Visca, P., Ciervo, A. and Orsi, N. Cloning and nucleotide sequence of the PvdA gene encoding the pyoverdine biosynthetic enzyme L-ornithine N5-oxygenase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **1994**, 176, 1128-1140.
- [201] Yang, X. and Ma, K. Determination of hydrogen peroxide generated by reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase. *Anal Biochem* **2005**, 344, 130-134.
- [202] Chance, M. R., Bresnick, A. R., Burley, S. K., Jiang, J. S., Lima, C. D., Sali, A., Almo, S. C., Bonanno, J. B., Buglino, J. A., Boulton, S., Chen, H., Eswar, N., He, G., Huang, R., Ilyin, V., McMahan, L., Pieper, U., Ray, S., Vidal, M. and Wang, L. K. Structural genomics: A pipeline for providing structures for the biologist. *Protein Sci* **2002**, 11, 723-738.
- [203] Clifton, I. J., Doan, L. X., Sleeman, M. C., Topf, M., Suzuki, H., Wilmouth, R. C. and Schofield, C. J. Crystal structure of carbapenem synthase (CarC). *J Biol Chem* **2003**, 278, 20843-20850.
- [204] Muller, I., Kahnert, A., Pape, T., Sheldrick, G. M., Meyer-Klaucke, W., Dierks, T., Kertesz, M. and Uson, I. Crystal structure of the alkylsulfatase AtsK: Insights into the catalytic mechanism of the Fe(II) α -ketoglutarate-dependent dioxygenase superfamily. *Biochemistry* **2004**, 43, 3075-3088.
- [205] Bitto, E., Bingman, C. A., Allard, S. T., Wesenberg, G. E., Aceti, D. J., Wrobel, R. L., Frederick, R. O., Sreenath, H., Vojtik, F. C., Jeon, W. B., Newman, C. S., Primm, J., Sussman, M. R., Fox, B. G., Markley, J. L. and Phillips, G. N., Jr. The structure at 2.4 Å resolution of the protein from gene locus AT3G21360, a putative Fe(II)/2-oxoglutarate-dependent enzyme from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **2005**, 61, 469-472.
- [206] Koehnert, K. D., Emerson, J. P. and Que, L., Jr. The 2-His-1-carboxylate facial triad: A versatile platform for dioxygen activation by mononuclear non-heme iron(II) enzymes. *J Biol Inorg Chem* **2005**, 10, 87-93.
- [207] Huang, Y. T., Lyu, S. Y., Chuang, P. H., Hsu, N. S., Li, Y. S., Chan, H. C., Huang, C. J., Liu, Y. C., Wu, C. J., Yang, W. B. and Li, T. L. In vitro characterization of enzymes involved in the synthesis of nonproteinogenic residue (2S,3S)- β -methylphenylalanine in glycopeptide antibiotic mannopeptimycin. *Chembiochem* **2009**, 10, 2480-2487.
- [208] Takeuchi, N., Kawakami, M., Omori, A., Ueda, T., Spremulli, L. L. and Watanabe, K. Mammalian mitochondrial methionyl-tRNA transformylase from bovine liver. Purification, characterization, and gene structure. *J Biol Chem* **1998**, 273, 15085-15090.
- [209] Carter, R. A., Worsley, P. S., Sawers, G., Challis, G. L., Dilworth, M. J., Carson, K. C., Lawrence, J. A., Wexler, M., Johnston, A. W. and Yeoman, K. H. The vbs genes that direct synthesis of the siderophore vicibactin in *Rhizobium leguminosarum*: Their expression in other genera requires ECF sigma factor RpoI. *Mol Microbiol* **2002**, 44, 1153-1166.
- [210] Macheroux, P., Plattner, H. J., Romaguera, A. and Diekmann, H. FAD and substrate analogs as probes for lysine N6-hydroxylase from *Escherichia coli* EN 222. *Eur J Biochem* **1993**, 213, 995-1002.
- [211] Lomri, N., Gu, Q. and Cashman, J. R. Molecular cloning of the flavin-containing monooxygenase (form II) cDNA from adult human liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, 89, 1685-1689.
- [212] Stehr, M., Diekmann, H., Smau, L., Seth, O., Ghisla, S., Singh, M. and Macheroux, P. A hydrophobic sequence motif common to N-hydroxylating enzymes. *Trends Biochem Sci* **1998**, 23, 56-57.
- [213] Ge, L. and Seah, S. Y. Heterologous expression, purification, and characterization of an L-ornithine N(5)-hydroxylase involved in pyoverdine siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **2006**, 188, 7205-7210.
- [214] Hosokawa, K. and Stanier, R. Y. Crystallization and properties of p-hydroxybenzoate hydroxylase from *Pseudomonas putida*. *J Biol Chem* **1966**, 241, 2453-2460.
- [215] Thariath, A., Socha, D., Valvano, M. A. and Viswanatha, T. Construction and biochemical characterization of recombinant cytoplasmic forms of the IucD protein (lysine:N6-hydroxylase) encoded by the pColV-K30 aerobactin gene cluster. *J Bacteriol* **1993**, 175, 589-596.

- [216] Fiss, E. H., Yu, S. and Jacobs Jr, W. R. Identification of genes involved in the sequestration of iron in mycobacteria: The ferric exochelin biosynthetic and uptake pathways. *Mol Microbiol* **1994**, 14, 557-569.
- [217] Kessler, N., Schuhmann, H., Morneweg, S., Linne, U. and Marahiel, M. A. The linear pentadecapeptide gramicidin is assembled by four multimodular nonribosomal peptide synthetases that comprise 16 modules with 56 catalytic domains. *J Biol Chem* **2004**, 279, 7413-7419.
- [218] Schmitt, E., Blanquet, S. and Mechulam, Y. Structure of crystalline *Escherichia coli* methionyl-tRNA(f)Met formyltransferase: Comparison with glycylamide ribonucleotide formyltransferase. *Embo J* **1996**, 15, 4749-4758.
- [219] Himes, R. H. and Rabinowitz, J. C. Formyltetrahydrofolate synthetase. II. Characteristics of the enzyme and the enzymic reaction. *J Biol Chem* **1962**, 237, 2903-2914.
- [220] Greenhagen, B. T., Shi, K., Robinson, H., Gamage, S., Bera, A. K., Ladner, J. E. and Parsons, J. F. Crystal structure of the pyocyanin biosynthetic protein PhzS. *Biochemistry* **2008**, 47, 5281-5289.
- [221] Dimise, E. J., Widboom, P. F. and Bruner, S. D. Structure elucidation and biosynthesis of fuscachelins, peptide siderophores from the moderate thermophile *Thermobifida fusca*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, 105, 15311-15316.
- [222] Nagata, A., Ando, T., Izumi, R., Sakakibara, H. and Take, T. Studies on tuberactinomycin (tuberactin), a new antibiotic. I. Taxonomy of producing strain, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **1968**, 21, 681-687.
- [223] Jensen, S. E. and Paradkar, A. S. Biosynthesis and molecular genetics of clavulanic acid. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1999**, 75, 125-133.
- [224] Kovaleva, E. G. and Lipscomb, J. D. Versatility of biological non-heme Fe(II) centers in oxygen activation reactions. *Nat Chem Biol* **2008**, 4, 186-193.
- [225] Abu-Omar, M. M., Loaiza, A. and Hontzeas, N. Reaction mechanisms of mononuclear non-heme iron oxygenases. *Chem Rev* **2005**, 105, 2227-2252.
- [226] Salowe, S. P., Marsh, E. N. and Townsend, C. A. Purification and characterization of clavamate synthase from *Streptomyces clavuligerus*: An unusual oxidative enzyme in natural product biosynthesis. *Biochemistry* **1990**, 29, 6499-6508.
- [227] Muller, T. A., Zavodszky, M. I., Feig, M., Kuhn, L. A. and Hausinger, R. P. Structural basis for the enantiospecificities of R- and S-specific phenoxypropionate/ α -ketoglutarate dioxygenases. *Protein Sci* **2006**, 15, 1356-1368.
- [228] You, Z., Omura, S., Ikeda, H., Cane, D. E. and Jogl, G. Crystal structure of the non-heme iron dioxygenase PtlH in pentalenolactone biosynthesis. *J Biol Chem* **2007**, 282, 36552-36560.
- [229] Stirk, H. J., Woolfson, D. N., Hutchinson, E. G. and Thornton, J. M. Depicting topology and handedness in jellyroll structures. *FEBS Lett* **1992**, 308, 1-3.
- [230] Schofield, C. J. and Zhang, Z. Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes. *Curr Opin Struct Biol* **1999**, 9, 722-731.
- [231] Kershaw, N. J., Caines, M. E., Sleeman, M. C. and Schofield, C. J. The enzymology of clavam and carbapenem biosynthesis. *Chem Commun (Camb)* **2005**, 4251-4263.
- [232] Windahl, M. S., Petersen, C. R., Christensen, H. E. and Harris, P. Crystal structure of tryptophan hydroxylase with bound amino acid substrate. *Biochemistry* **2008**, 47, 12087-12094.
- [233] Muller, T. A., Fleischmann, T., van der Meer, J. R. and Kohler, H. P. Purification and characterization of two enantioselective α -ketoglutarate-dependent dioxygenases, RdpA and SdpA, from *Sphingomonas herbicidovorans* MH. *Appl Environ Microbiol* **2006**, 72, 4853-4861.
- [234] Martinkus, K. J., Tann, C. H. and Gould, S. J. The biosynthesis of the streptolidine moiety in streptothricin f. *Tetrahedron* **1983**, 39, 3493-3505.
- [235] Rossa, B. A. and Viswanatha, T. Synthesis and properties of γ -hydroxyarginine. *Can J Biochem* **1968**, 46, 725-729.
- [236] Clement, B., Schnorwangen, E., Kampchen, T., Mordvintcev, P. and Mulsch, A. Synthesis of 15N ω -hydroxy-L-arginine and ESR and 15N-NMR studies for the elucidation of the molecular mechanism of enzymic nitric oxide formation from L-arginine. *Arch Pharm (Weinheim)* **1994**, 327, 793-798.
- [237] Schade, D., Topker-Lehmann, K., Kotthaus, J. and Clement, B. Synthetic approaches to N(δ)-methylated L-arginine, N(ω)-hydroxy-L-arginine, L-citrulline, and N(δ)-cyano-L-ornithine. *J Org Chem* **2008**, 73, 1025-1030.
- [238] Cardillo, G., Gentilucci, L. and Tolomelli, A. Unusual amino acids: Synthesis and introduction into naturally occurring peptides and biologically active analogues. *Mini Rev Med Chem* **2006**, 6, 293-304.
- [239] Sitaram, N. Antimicrobial peptides with unusual amino acid compositions and unusual structures. *Curr Med Chem* **2006**, 13, 679-696.
- [240] Houge-Frydrych, C. S., Gilpin, M. L., Skett, P. W. and Tyler, J. W. SB-203207 and SB-203208, two novel isoleucyl tRNA synthetase inhibitors from a *Streptomyces* sp. II. Structure determination. *J Antibiot (Tokyo)* **2000**, 53, 364-372.

- [241] Milne, C., Powell, A., Jim, J., Al Nakeeb, M., Smith, C. P. and Micklefield, J. Biosynthesis of the (2S,3R)-3-methyl glutamate residue of nonribosomal lipopeptides. *J Am Chem Soc* **2006**, 128, 11250-11259.
- [242] Wang, Z. X., Li, S. M. and Heide, L. Identification of the coumermycin A(1) biosynthetic gene cluster of *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**, 44, 3040-3048.
- [243] Shi, R., Lamb, S. S., Zakeri, B., Proteau, A., Cui, Q., Sulea, T., Matte, A., Wright, G. D. and Cygler, M. Structure and function of the glycopeptide N-methyltransferase MtfA, a tool for the biosynthesis of modified glycopeptide antibiotics. *Chem Biol* **2009**, 16, 401-410.
- [244] Hornemann, U., Hurley, L. H., Speedie, M. K. and Floss, H. G. The biosynthesis of indolmycin. *J Am Chem Soc* **1971**, 93, 3028-3035.
- [245] Goto, M., Miyahara, I., Hayashi, H., Kagamiyama, H. and Hirotsu, K. Crystal structures of branched-chain amino acid aminotransferase complexed with glutamate and glutarate: True reaction intermediate and double substrate recognition of the enzyme. *Biochemistry* **2003**, 42, 3725-3733.
- [246] Miller, D. A., Luo, L., Hillson, N., Keating, T. A. and Walsh, C. T. Yersiniabactin synthetase: A four-protein assembly line producing the nonribosomal peptide/polyketide hybrid siderophore of *Yersinia pestis*. *Chem Biol* **2002**, 9, 333-344.
- [247] Castiglione, F., Marazzi, A., Meli, M. and Colombo, G. Structure elucidation and 3D solution conformation of the antibiotic enduracidin determined by NMR spectroscopy and molecular dynamics. *Magn Reson Chem* **2005**, 43, 603-610.
- [248] Kagamiyama, H. and Hayashi, H. Branched-chain amino-acid aminotransferase of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* **2000**, 324, 103-113.
- [249] Xian, M., Alaux, S., Sagot, E. and Gefflaut, T. Chemoenzymatic synthesis of glutamic acid analogues: Substrate specificity and synthetic applications of branched chain aminotransferase from *Escherichia coli*. *J Org Chem* **2007**, 72, 7560-7566.
- [250] Inoue, K., Kuramitsu, S., Aki, K., Watanabe, Y., Takagi, T., Nishigai, M., Ikai, A. and Kagamiyama, H. Branched-chain amino acid aminotransferase of *Escherichia coli*: Overproduction and properties. *J Biochem* **1988**, 104, 777-784.
- [251] Hruby, V. J., Toth, G., Gehrig, C. A., Kao, L. F., Knapp, R., Lui, G. K., Yamamura, H. I., Kramer, T. H., Davis, P. and Burks, T. F. Topographically designed analogs of [cyclic] [D-Pen²,D-Pen⁵]enkephalin. *Journal of Medicinal Chemistry* **1991**, 34, 1823-1830.
- [252] Li, G., Patel, D. and Hruby, V. J. Exploration for large-scale stereoselective synthesis of unusual amino acids by using 4-phenyloxazolidin-2-one as a new chiral resolution reagent. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, 3057 - 3059.
- [253] Bull, S. D., Davies, S. G., Epstein, S. W., Garner, A. C., Mujtaba, N., Roberts, P. M., Savory, E. D., Smith, A. D., Tamayo, J. A. and Watkin, D. J. Enantiodiscrimination of racemic electrophiles by diketopiperazine enolates: Asymmetric synthesis of methyl 2-amino-3-aryl-butanoates and 3-methyl-aspartates. *Tetrahedron* **2006**, 62, 7911-7925.
- [254] Fitz, R. and Seebach, D. Resolution and use in α -amino acid synthesis of imidazolidinone glycine derivatives. *Tetrahedron* **1988**, 44, 5277-5292.
- [255] Davis, F. A., Liu, H., Zhou, P., Fang, T., Reddy, G. V. and Zhang, Y. Aza-darzens asymmetric synthesis of N-(p-toluenesulfinyl)aziridine 2-carboxylate esters from sulfinimines (N-sulfinyl imines). *The Journal of Organic Chemistry* **1999**, 64, 7559-7567.
- [256] Roff, G. J., Lloyd, R. C. and Turner, N. J. A versatile chemo-enzymatic route to enantiomerically pure β -branched α -amino acids. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, 4098-4099.
- [257] Fischbach, M. A. and Walsh, C. T. Antibiotics for emerging pathogens. *Science* **2009**, 325, 1089-1093.
- [258] Clardy, J., Fischbach, M. A. and Walsh, C. T. New antibiotics from bacterial natural products. *Nat Biotechnol* **2006**, 24, 1541-1550.
- [259] Baltz, R. H. Molecular engineering approaches to peptide, polyketide and other antibiotics. *Nat Biotechnol* **2006**, 24, 1533-1540.
- [260] Pohlmann, V. and Marahiel, M. A. δ -amino group hydroxylation of L-ornithine during coelichelin biosynthesis. *Org Biomol Chem* **2008**, 6, 1843-1848.
- [261] Ackerley, D. F. and Lamont, I. L. Characterization and genetic manipulation of peptide synthetases in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in order to generate novel pyoverdines. *Chem Biol* **2004**, 11, 971-980.
- [262] Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Sabiha, Y., Loss, O., Eisendle, M., Wallner, A., Arst, H. N., Jr., Haynes, K. and Haas, H. Distinct roles for intra- and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. *PLoS Pathog* **2007**, 3, 1195-1207.
- [263] Neary, J. M., Powell, A., Gordon, L., Milne, C., Flett, F., Wilkinson, B., Smith, C. P. and Micklefield, J. An asparagine oxygenase (AsnO) and a 3-hydroxyasparaginyl phosphotransferase (HasP) are involved in the biosynthesis of calcium-dependent lipopeptide antibiotics. *Microbiology* **2007**, 153, 768-776.
- [264] Miao, V., Brost, R., Chapple, J., She, K., Gal, M. F. and Baltz, R. H. The lipopeptide antibiotic A54145 biosynthetic gene cluster from *Streptomyces fradiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **2006**, 33, 129-140.

- [265] Chen, H., Hubbard, B. K., O'Connor, S. E. and Walsh, C. T. Formation of β -hydroxy histidine in the biosynthesis of nikkomycin antibiotics. *Chem Biol* **2002**, 9, 103-112.
- [266] Puk, O., Bischoff, D., Kittel, C., Pelzer, S., Weist, S., Stegmann, E., Sussmuth, R. D. and Wohlleben, W. Biosynthesis of chloro- β -hydroxytyrosine, a nonproteinogenic amino acid of the peptidic backbone of glycopeptide antibiotics. *J Bacteriol* **2004**, 186, 6093-6100.
- [267] Recktenwald, J., Shawky, R., Puk, O., Pfennig, F., Keller, U., Wohlleben, W. and Pelzer, S. Nonribosomal biosynthesis of vancomycin-type antibiotics: A heptapeptide backbone and eight peptide synthetase modules. *Microbiology* **2002**, 148, 1105-1118.
- [268] Helmetag, V., Samel, S. A., Thomas, M. G., Marahiel, M. A. and Essen, L. O. Structural basis for the erythro-stereospecificity of the L-arginine oxygenase VioC in viomycin biosynthesis. *Febs J* **2009**, 276, 3669-3682.
- [269] Rachid, S., Krug, D., Weissman, K. J. and Muller, R. Biosynthesis of (R)- β -tyrosine and its incorporation into the highly cytotoxic chondramides produced by *Chondromyces crocatus*. *J Biol Chem* **2007**, 282, 21810-21817.
- [270] Heinzlmann, E., Berger, S., Puk, O., Reichenstein, B., Wohlleben, W. and Schwartz, D. A glutamate mutase is involved in the biosynthesis of the lipopeptide antibiotic friulimicin in *Actinoplanes friuliensis*. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**, 47, 447-457.
- [271] Muller, C., Nolden, S., Gebhardt, P., Heinzlmann, E., Lange, C., Puk, O., Welzel, K., Wohlleben, W. and Schwartz, D. Sequencing and analysis of the biosynthetic gene cluster of the lipopeptide antibiotic friulimicin in *Actinoplanes friuliensis*. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, 51, 1028-1037.
- [272] Fujimori, D. G., Hrvatin, S., Neumann, C. S., Strieker, M., Marahiel, M. A. and Walsh, C. T. Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for kutznerides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, 104, 16498-16503.
- [273] Magarvey, N. A., Ehling-Schulz, M. and Walsh, C. T. Characterization of the cereulide NRPS α -hydroxy acid specifying modules: Activation of α -keto acids and chiral reduction on the assembly line. *J Am Chem Soc* **2006**, 128, 10698-10699.

7. Anhang

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über ausgewählte Modifikationsreaktionen während der nicht-ribosomalen Peptidsynthese. Dabei werden das jeweilige Substrat und die katalysierte Reaktion eines Modifikationsenzym dargestellt. Außerdem wird aufgeführt, in welchen Naturstoff der modifizierte Baustein eingebaut wird. Des Weiteren soll diese Übersicht verdeutlichen, welche Adenylierungsdomänen in die Vorläuferbaustein-Biosynthese oder –Aktivierung involviert sind. Dabei wird auch aufgeführt, ob diese A-Domänen biochemisch charakterisiert wurden oder ob die Spezifität anhand von bioinformatischen Studien postuliert wurde. Die biochemischen Untersuchungen umfassen entweder *in vitro* Experimente mit rekombinanten Proteinen oder *in vivo* Untersuchungen mit Knock-out Mutanten und Fütterungsexperimenten.

Tabelle 7.1: Ausgewählte Modifikationsreaktionen während der nicht-ribosomalen Peptidsynthese.

Enzym	Enzymklasse	Katalysierte Reaktion	Substrat ^a	Naturstoff	A-Domäne	A-Domänen-Spezifität	
						Bioinformatisch	Biochemisch
CchB ^[260]	Flavoprotein-Monooxygenase	N ^δ -Hydroxylierung	L-Orn	Coelichelin	CchH-A ₃	hOrn	
CchA ^[61]	Formyltransferase	N ^δ -Formylierung	(hOrn)	Coelichelin	CchH-A ₁	hfOrn	
PvdA ^[72,94]	Flavoprotein-Monooxygenase	N ^δ -Hydroxylierung	L-Orn	Pyoverdin	/	/	
PvdF ^[73,261]	Formyltransferase	N ^δ -Formylierung	(hOrn)	Pyoverdin	PvdI-A ₄ PvdJ-A ₂	hfOrn	
SidA ^[262]	Flavoprotein-Monooxygenase	N ^δ -Hydroxylierung	L-Orn	Fusarinin C	SidD		N ^δ -acyliertes hOrn
VbsO ^[145]	Flavoprotein-Monooxygenase	N ^δ -Hydroxylierung	L-Orn	Vicibactin	VbsS		N ^δ -acyliertes hOrn
AsnO ^[68,104,263]	Nicht-Häm Fe(II)-Monooxygenase	C _β -Hydroxylierung	L-Asn	CDA	CDAPSII-A ₃	hAsn	L-Asn
GlmT ^[124,241]	SAM-abhängige Methyltransferase	C _β -Methylierung	α-Ketoglutarat	CDA	CDAPSIII-A ₂		L-Glu/ β-Me-Glu
LptL ^[264]	Nicht-Häm Fe(II)-Monooxygenase	C _β -Hydroxylierung	L-Asn	A54145	LptA-A ₃	hAsn	
LptI ^[264]	SAM-abhängige Methyltransferase	C _β -Methylierung	(α-Ketoglutarat)	A54145	LptD-A ₁	L-Glu/ β-Me-Glu	
LptJ/LptK ^[264]	Nicht-Häm Fe(II)-Monooxygenase/ O-Me-transferase	C _β -Hydroxylierung/ Methylierung	(L-Asp/ hAsp)	A54145	LptC-A ₂	β-Methoxy-Aspartat	
MppJ ^[170,207]	SAM-abhängige Methyltransferase	C _β -Methylierung	Phenylpyruvat	Mannopeptimycin	MppA-A ₃		L-Phe/ β-Me-Phe

MppO ^[105]	Nicht-Häm Fe(II)- Monoxygenase	C _β -Hydroxy- lierung	L-Endura- cididin	Mannopepti- mycin	MppB-A ₂		β-Hydro- xy-Endu- racididin
NovI ^[143]	Häm Fe(II)- Oxygenase	C _β -Hydroxy- lierung	L-Tyr-S- PCP	Novobiocin	NovH		L-Tyr
NikQ ^[265]	Häm Fe(II)- Oxygenase	C _β -Hydroxy- lierung	L-His-S- PCP	Nikkomyacin	NikP1		L-His
OxyD ^[266]	Häm Fe(II)- Oxygenase	C _β -Hydroxy- lierung	(L-Tyr-S- PCP)	Balhimycin	BpsD	L-Tyr	
BhaA ^[267]	Flavoprotein- Halogenase	C _{aromatisch} - Haloge- nierung	?	Balhimycin	BpsA-A ₂ / BpsB-A ₃	Chloro-β- Hydroxy- Tyr	β- Hydroxy- Tyr
SyrP ^[71]	Nicht-Häm Fe(II)- Monoxygenase	C _β -Hydroxy- lierung	L-Asp-S- PCP	Syringomycin	SyrE-A ₈		L-Asp
SyrB2 ^[70]	Nicht-Häm Fe(II)- Halogenase	C _γ -Haloge- nierung	L-Thr-S- PCP	Syringomycin	SyrB1		L-Thr
VioC ^[268] / VioD ^[152,159]	Nicht-Häm Fe(II)- Monoxygenase/ Aminotransferase	C _β -Hydroxy- lierung/ Zyklisierung	L-Arg/ hArg	Viomycin	VioG		L-Capreo- mycidin
VioL ^[157]	Carbamoyl- transferase	Carbamoy- lierung	(L-2,3- Diamino- propionat)	Viomycin	VioF		β-Ureido- alanin
VioP ^[157,158]	Lysin-2,3- Aminomutase	Umwandlung L-Lys in L-β-Lys	(L-Lys)	Viomycin	VioO	L-β-Lys	
CmdF ^[269]	Tyrosin-2,3- Aminomutase	Umwandlung L-Tyr in D-β-Tyr	L-Tyr	Chondramid	CmdD-A ₇		D-β-Tyr
GlmA/ GlmB ^[270,271]	Glutamat-Mutase (Coenzym = Vitamin B12)	C _β -Methy- lierung	L-Asp	Friulimicin	PstC-A ₁	β-Me-Asp	
KtzO/ KtzP ^[62]	Nicht-Häm Fe(II)- Monoxygenase	C _β -Hydroxy- lierung	L-Glu-S- PCP	Kutzneride	KtzN		L-Glu
KtzG-KR ^[272]	Ketoreduktase- Domäne	Reduktion α- Ketosäure	2-Keto- isovalerat- S-PCP/ 3,3-Di- methyl-2- ketobuty- rat-S-PCP	Kutzneride	KtzG-A	2-Keto- isovalerat/ 3,3-Di- methyl-2- ketobutyrat	
CesA-KR ^[273]	Ketoreduktase- Domäne	Reduktion α- Ketosäure	α-Ketoiso- capron- säure-S- PCP	Cereulid	CesA-A ₁		α-Keto- isocapron- säure
CesB-KR ^[273]	Ketoreduktase- Domäne	Reduktion α- Ketosäure	α-Ketoiso- valerat-S- PCP	Cereulid	CesB-A ₁		α- Ketoiso- valerat

^a Putative Substrate sind in Klammern dargestellt.

Danksagung

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel für die interessante Themenstellung und die stetige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung. Außerdem bin ich sehr dankbar für die finanzielle Unterstützung, die hervorragende Laborausstattung und die damit einhergehenden guten Arbeitsbedingungen. Für die Möglichkeit, meine Arbeit auf internationalen NRPS/PKS-Konferenzen in Hirschegg (Österreich) und Providence (Vereinigte Staaten von Amerika) präsentieren zu können, bedanke ich mich herzlich.

Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen danke ich herzlich für die Lösung der Kristallstruktur von VioC und die hervorragende Zusammenarbeit an diesem Projekt. Außerdem bedanke ich mich sehr herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein Dank gilt außerdem Prof. Dr. Armin Geyer und Prof. Dr. Norbert Hampf für die Bereitschaft, der Prüfungskommission anzugehören.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises Marahiel für die stetige Unterstützung, Hilfsbereitschaft und anregenden fachlichen Diskussionen. Allerdings möchte ich mich auch für die gemeinsamen Stunden außerhalb des Laboralltags bedanken, in denen wir viel Spaß hatten.

Den Kollegen aus dem Labor 4707, Dr. Matthias Strieker, Dr. Daniel Stein, Femke Kraas und Tobias Gießen gilt mein besonderer Dank für die gute Zusammenarbeit und die sehr gute Atmosphäre. Ich möchte mich auch bei den ehemaligen Kollegen aus 4707, Dr. Christoph Mahlert, Dr. Florian Kopp, Florian Ritterbusch und Justine Witosch, bedanken, mit denen ich sehr gerne zusammengearbeitet habe. Besonders danke ich Dr. Christoph Mahlert für die hervorragende Zusammenarbeit an dem Methyltransferasen-Projekt.

Besonderer Dank gebührt den Mitgliedern der Kristallisations-Crew der Arbeitskreise Marahiel und Essen für die stetige Hilfsbereitschaft jeglicher Art, die gute Organisation, das nächtelange Datensätze Sammeln am Synchrotron und die Auswertung und Bearbeitung der Daten.

Dr. Uwe Linne danke ich für die Hilfe bei massenspektrometrischen Fragestellungen und Messungen.

Für die technische und organisatorische Unterstützung möchte ich mich bei Antje Schäfer, Christiane Bomm, Gabriele Schimpff-Weiland, Roswitha Roller-Müller, Carola Kisselbach, Sebastian Friedrich und Anke Botthoff bedanken.

Bei Dr. Matthias Strieker, Lars Robbel und Femke Kraas bedanke ich mich für das gründliche Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Dr. Markus Oberthür und Peter Schüler für die chemische Synthese der Methyl-Phenylalanin-Standards.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. Michael G. Thomas (Fachbereich Bakteriologie, Universität von Wisconsin-Madison, USA) für die Bereitstellung des Expressionsplasmids von VioC. Ich danke auch Dr. Georg Schönafinger und Dr. Carl Balibar (Novartis Institutes

for BioMedical Research, Massachusetts, USA) für die freundliche Bereitstellung der Expressionsplasmide von FOLD und FTHFS.

Meinen Vertiefungsstudenten Christian Pflüger, Eldar Zent, Femke Kraas, Anna Pulte und Stefan Roesner möchte ich für die engagierte Hilfe danken.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester Nina aussprechen. Meine Eltern haben mich während des gesamten Studiums und der Promotionszeit hervorragend unterstützt und mir viel Rückhalt gegeben. Ohne sie wäre mein Studium so nicht möglich gewesen. Auch meine Schwester Nina ist immer für mich da und wir werden hoffentlich in Zukunft auch noch so viel Spaß haben wie bisher.

Mein größter Dank gilt meinem Mann Thomas, der mich in jeglicher Lebenslage unterstützt und zu mir hält. Thomas zeigt viel Verständnis, auch wenn ich mal am Wochenende arbeite, und hilft mir in anstrengenden Zeiten. Er sorgt immer für den richtigen Ausgleich zu meiner Arbeit und ich freue mich sehr auf unsere gemeinsame Zukunft.