

**Untersuchungen zur Struktur und Stabilität neuer, durch *Genome Mining*
identifizierter Lasso peptide**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Marcel Zimmermann

aus Burgstädt (Sachsen)

Marburg an der Lahn, 2013

Vom Fachbereich Chemie

Der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkenziffer 1180)

als Dissertation am _____ angenommen

Erstgutachter: Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel

(Fachbereich Chemie, Phillips-Universität Marburg)

Zweitgutachter: Prof. Dr. Armin Geyer

(Fachbereich Chemie, Phillips-Universität Marburg)

Tag der Disputation: 04.12.2013

MEINEN ELTERN UND MEINER FREUNDIN YI GEWIDMET

Der Hauptteil dieser Arbeit wurde im folgenden Artikel veröffentlicht:

Zimmermann M., Hegemann J. D., Xie X., Marahiel M. A., The Astexin-1 Lasso Peptides: Biosynthesis, Stability and Structural Studies. *Chem. Biol.* **2013**, 20, 558

Weitere Publikationen des Autors:

Hegemann J. D., **Zimmermann M.**, Xie X., Marahiel M. A., Caulonodins I – III: A Highly Diverse Group of Lasso Peptides Derived from a Single Biosynthetic Gene Cluster. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 210

Hegemann J. D., **Zimmermann M.**, Zhu S., Klug D., Marahiel M. A., Lasso Peptides from Proteobacteria: Genome Mining Employing Heterologous Expression and Mass Spectrometry. *Biopolymers*, **2013**, 100: 527–542

Manuskripte in Submission oder Vorbereitung:

Zimmermann M., Hegemann J. D., Zhu S., Xie X., Marahiel M. A., Caulonodins IV – VII Redefine the Class II Lasso Peptides Featuring Serine and Alanin at Position 1 of the Core Peptide. *In Vorbereitung*

Hegemann J. D., **Zimmermann M.**, Zhu S., Steuber H., Harms K., Xie X., Marahiel M. A., Xanthomonins I – III Are a New Class of Lasso Peptides Featuring a Seven Membered Macrolactam Ring. *In Submission bei Angewandte Chemie Int. Ed.*

Inhalt

Zusammenfassung.....	13
Summary	15
Abkürzungsverzeichnis.....	17
1. Einleitung.....	21
1.1 Naturstoffe	21
1.2 Peptidische Naturstoffe	23
1.3 Ribosomal-synthetisierte post-translational modifizierte Peptide (RiPPs).....	26
1.3.1 Lanthipeptide	29
1.3.2 Linaridine.....	30
1.3.3 Sactipeptide.....	31
1.3.4 LAPs	33
1.3.5 Thiopeptide	34
1.3.6 Cyanobactine.....	34
1.3.7 Bottromycine.....	36
1.3.8 Proteusine	36
1.3.9 Microviridine	38
1.3.10 <i>Bacterial head-to-tail</i> zyklisierte Peptide, Amatoxine/Phallotoxine, Cyclotide und Orbitide	39
1.4 Lasso peptide	41
1.4.1 Lasso peptide der Klassen I, II und III	42
1.4.2 3D-Strukturen der Klasse II Lasso peptide	44
1.4.3 Gencluster und Biosynthese der Lasso peptide	46
1.5 <i>Genome Mining</i> als Methode zur Identifikation neuer Naturstoffe	48
2. Aufgabenstellung	50
3. Materialien	51
3.1 Geräte.....	51
3.2 Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien	52
3.3 Vektoren.....	53
3.3.1 pET28a(+)	53
3.3.2 pET41a(+)	53
3.4 Oligonukleotidprimer	54
3.5 Mikroorganismen	55
3.5.1 <i>E. coli</i> TOP 10.....	55
3.5.2 <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	55

3.5.3	<i>E. coli</i> ArcticExpress (DE3)	56
3.5.4	<i>Asticcacaulis excentricus</i> CB 48	56
3.5.5	<i>Caulobacter</i> sp. K31	56
3.6	Kulturmedien	57
3.6.1	LB-Medium	57
3.6.2	PYE-Medium	57
3.6.3	PYEGR-Medium.....	58
3.6.4	M9-Medium.....	58
3.6.5	M20-Medium.....	59
3.6.6	M63-Medium.....	60
4.	Methoden	61
4.1	Bioinformatische Methoden	61
4.1.1	Identifikation neuer Lassozeptidbiosynthesegencluster mittels PSI-BLAST	61
4.1.2	Erstellung von Protein Alignments	62
4.1.3	Identifikation von konservierten Motiven mit dem MEME Algorithmus.....	62
4.2	Molekularbiologische Methoden	63
4.2.1	Präparation plasmidischer DNA mit Sigma-Aldrich Miniprep Kit	63
4.2.2	Mutagenese mit "round-the-horn" bzw. "inverse" PCR	64
4.2.3	<i>Site-directed ligation-independent mutagenesis</i>	64
4.3	Proteinchemische Methoden	66
4.3.1	Heterologe Produktion des Astexin-1 und seiner Varianten.....	66
4.3.2	Heterologe Produktion der Caulonodine und ihrer Varianten.....	66
4.3.3	Heterologe Expression von Einzelproteinkonstrukten in pET28a	67
4.3.4	Heterologe Expression von Proteinen in Clusterkonstrukten	67
4.4	Naturstoffisolierung	68
4.4.1	Methanolextraktion von Zellpellets	68
4.4.2	Trennung und Reinigung der Astexine und Varianten	68
4.4.3	Trennung und Reinigung der Caulonodine.....	70
4.5	Analytische Methoden	71
4.5.1	HPLC-MS	71
4.5.2	MS-MS CID-Fragmentierung.....	73
4.5.3	MS-MS MALDI-TOF-TOF	73
4.6	Biochemische Methoden.....	74
4.6.1	Thermische Stabilitätsuntersuchung von Lassozeptiden.....	74
4.6.2	Proteolytische Stabilitätsuntersuchung von Lassozeptiden	74

4.7	Spektroskopische Methoden	75
4.7.1	NMR-Spektroskopie und Strukturaufklärung von Astexin-1.....	75
4.7.2	NMR-Spektroskopie und Strukturaufklärung von Caulonodin V	76
5.	Ergebnisse	77
5.1	<i>Genome Mining</i> als Methode zur Identifizierung neuer Naturstoffbiosynthesecluster	77
5.1.1	Kriterien für das <i>Genome Mining</i> von Lassozeptidbiosyntheseclustern	77
5.1.2	Fokussiertes <i>Genome Mining</i> nach Lassozeptidbiosyntheseclustern in Proteobakterien mittels PSI-BLAST	79
5.2	Bestätigung des <i>Genome Minings</i> – Isolierung und Charakterisierung des Lassozeptids Astexin-1 und seiner Varianten.....	84
5.2.1	Gencluster, Expressionskonstrukte, heterologe Produktion und Reinigung	84
5.2.2	Thermische und proteolytische Stabilität	88
5.2.3	Mutationsstudie	93
5.2.4	3D-Strukturbestimmung mittels NMR-Spektroskopie	101
5.3	Die Neuausrichtung der Kriterien des <i>Genome Minings</i> führt zur Isolierung von vier Caulonodinen und definiert die Klasse II Lassozeptide neu	108
5.3.1	Gencluster, Expressionskonstrukte, heterologe Produktion und Reinigung	108
5.3.2	Thermische und proteolytische Stabilität	113
5.3.3	Mutationsstudie	117
5.3.4	3D-Strukturbestimmung mittels NMR-Spektroskopie	126
6.	Diskussion und Ausblick	132
7.	Literatur.....	136
8.	Danksagung	147
9.	Anhang	149

Zusammenfassung

Das zunehmende Auftreten multiresistenter Bakterien macht die Suche nach neuen antibakteriellen Wirkstoffen notwendiger denn je. Naturstoffe stellen dabei eine sehr reichhaltige Quelle dar, da sie über strukturelle und chemische Diversität verfügen, die teilweise nicht oder nur unter großem Aufwand synthetisch zugänglich ist. Für die Identifikation neuer Naturstoffe kann dabei besonders die Methode des *Genome Minings* genutzt werden, da durch die stark gesunkenen Kosten von Sequenzierungen immer mehr Kompletengenome in den Datenbanken zur Verfügung stehen. Eine spezielle Familie der ribosomal synthetisierten und post-translational modifizierten Peptide (RiPPs) sind die Lasso peptide, die ihren Namen ihrer besonderen dreidimensionalen Faltung verdanken. Diese zeigen trotz geringer chemischer Modifikation thermische und proteolytische Stabilität und teilweise interessante Bioaktivitäten.

In dieser Arbeit konnten mit dem *Genome Mining* Ansatz fast 100 potentielle Lasso peptide biosynthesecluster identifiziert werden. Als Beweis der Funktionalität des *Genome Minings* wurde ein Cluster ausgewählt und das hitzelabile Lasso peptide Astexin-1 in verschiedenen Verkürzungsvarianten isoliert, auf thermische und proteolytische Stabilität hin untersucht und seine 3D-Struktur mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt. Eine extensive Mutagenesestudie wurde zur Untersuchung der Spezifität der Biosynthesemaschinerie, sowie zur Identifikation wichtiger Reste für die Stabilität der Lasso peptide faltung durchgeführt. Dabei konnte durch rationale Inkorporation einer Mutation der nativ hitzelabile Naturstoff in ein hitzestabiles Lasso peptide transformiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden zwei Biosynthesecluster aus *Caulobacter* sp. K31, die durch *Genome Mining* identifiziert worden sind, ausgewählt und es konnten vier neue Lasso peptide, die Caulonodine IV – VII, isoliert werden. Diese vier Caulonodine tragen Serin bzw. Alanin an Position 1 der Lasso peptide sequenz und definieren damit die Klasse II der Lasso peptide neu, da vorher nur Peptide mit Glycin an dieser Position bekannt waren. Die Caulonodine wurden auf ihre thermische und proteolytische Stabilität hin untersucht und offenbarten sich als hitzelabile Lasso peptide. Die anschließende Mutagenesestudie zeigte die veränderte Spezifität der Biosynthesemaschinerie für Position 1 und ermöglichte die Postulierung der Stöpselaminosäuren für alle vier Caulonodine. Diese Vorhersage wurde für Caulonodin V durch Aufklärung der 3D-Struktur mittels NMR-Spektroskopie bestätigt. Eine Mutagenesestudie des Leaderpeptids konnte bestätigen, dass im Leaderpeptid weitere Reste neben Thr-2 für die Prozessierung durch die Biosynthesemaschinerie wichtig sind.

Summary

The increasing occurrence of multi-resistant bacteria makes it more necessary than ever to search for new antibacterial compounds. For this, natural products are a rich source, since they feature structural and chemical diversity, which is only hardly or not at all accessible by synthetic chemistry. An interesting method for the identification of new natural products is genome mining, which gains more and more importance as the number of sequenced genomes has risen enormously in the past few years due to the strong reduction in sequencing costs. The lasso peptides are a special family of ribosomally assembled and post-translationally modified peptides (RiPPs), which owe their name to their unique three-dimensional fold. This fold is responsible for their chemical, thermal and proteolytic stability and in some instances for their bioactivities despite the relatively low degree of chemical modification.

In this work nearly 100 potential lasso peptide biosynthetic gene clusters could be identified through genome mining. To validate the suitability of this approach, one cluster was selected and different truncated variants of the heat labile lasso peptide astexin-1 were isolated. They were analyzed for thermal and proteolytic stability and the 3D-structure of astexin-1(19) was elucidated via NMR spectroscopy. An extensive mutagenesis study was performed to investigate the specificity of the biosynthetic machinery and to identify important residues for the lasso fold. Through the rational incorporation of specific mutations, it was possible to transform the native heat labile natural product into a heat-stable lasso peptide.

In the second part of this work two biosynthetic gene clusters from *Caulobacter* sp. K31, which were identified by genome mining, were selected and it was possible to isolate four new lasso peptides, caulonodins IV - VII. These four caulonodins feature serine or alanine at position 1 of the lasso peptide sequence and therefore redefine class II of the lasso peptides, since all formerly identified peptides of this class feature glycine at this position. The caulonodins were investigated for thermal and proteolytic stability revealing them to be heat labile lasso peptides. The subsequent mutagenesis study showed the altered specificity of the biosynthetic machinery for position 1 and made it possible to predict the plug amino acids for all four caulonodins. This prediction was confirmed through elucidation of the 3D-structure of caulonodin V through NMR techniques. A mutagenesis study of the leader peptide could confirm that there are more residues involved in the maturation by the biosynthetic machinery than just Thr-2.

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure(n) (<i>amino acid(s)</i>)
ABC	ATP-binding-casette
<i>A. excentricus</i>	<i>Asticcacaulis excentricus</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<i>B. thailandensis</i>	<i>Burkolderia thailandensis</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp / bps	Basenpaare
<i>C. crescentus</i>	<i>Caulobacter crescentus</i>
<i>C. segnis</i>	<i>Caulobacter segnis</i>
<i>C. sp. K31</i>	<i>Caulobacter sp. K31</i>
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation (<i>collision-induced dissociation</i>)
COSY	<i>correlated spectroscopy</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
ddNTPs	2',3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EIC	Extrahiertes Ionenchromatogramm
ESI	Elektrospray-Ionisation
FP	<i>Forward Primer</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb / kbp	Kilobasen / Kilobasenpaare
LB	<i>lysogeny broth</i>
LCMS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (kurz für HPLC-MS)

M	Mol pro Liter
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MccJ25	Microcin J25
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MEME	<i>Multiple Em for Motif Elicitation</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MS ²	Tandem-Massenspektrometrie
NTA	Nitrilotriessigsäure
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NOE	Kern-Overhauser-Effekt (<i>nuclear Overhauser effect</i>)
NRP	Nichtribosomales Peptid
NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetasen
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	Proteindatenbank
PTM	Post-translationale Modifikation
PYE	petone yeast extract medium
PYEGR	peptone yeast extract glucose riboflavin medium
rbs	ribosomale Bindungsstelle
RiPP	<i>ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides</i>
RP	<i>Reverse Primer</i>
RT	Raumtemperatur
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SLIM	<i>site-directed ligation independent mutagenesis</i>
T7	T7-Promotor
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluoro acetic acid</i>)
TIC	Gesamtionenstrom (<i>total ion current</i>)

TOF	Flugzeit (<i>time of flight</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
U	<i>enzyme unit</i>
UV	Ultraviolet
v/v	Volumenanteil
w/v	Gewichtsanteil

Tabelle 1 – Die 20 proteinogenen Aminosäuren und ihre Abkürzungen

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

1. Einleitung

1.1 Naturstoffe

Als Naturstoffe werden chemische Verbindungen aus natürlichen Quellen, egal ob Bakterien, eukaryotische Einzeller, Pflanzen oder Tiere, verstanden, welche eine definierte biologische Aktivität besitzen. Wirksame Naturstoffe wie das Koffein oder Nicotin werden schon seit Jahrtausenden von der Menschheit zu medizinischen oder gesellschaftlichen Zwecken eingesetzt. Der Beginn der modernen Medizin, Biologie und Chemie im 19. Jahrhundert markierte den Startschuss für die breite Nutzung von Naturstoffen und davon abgeleiteten halbsynthetischen Stoffen. Die Acetylsalicylsäure, welche 1897 erstmals in Reinform hergestellt wurde, ist ein Beispiel für eines der ersten halb-synthetischen Arzneimittel auf Basis eines Naturstoffs, welche heute noch genutzt wird [1]. Ein weiterer Meilenstein stellt die Entdeckung des Penicillins (Abbildung 1) als erstem Antibiotikum überhaupt im Jahre 1929 dar [2]. Seine großtechnische fermentative Produktion in den 1940er Jahren war einer der wichtigsten Schritte zur modernen Nutzung von Naturstoffen mikrobieller Herkunft. Auch heute haben Naturstoffe und deren biotechnologische Produktion nichts von ihrer Bedeutung verloren. 60% der zugelassenen Pharmaka sind Naturstoffe oder von ihnen abgeleitete Derivate [3]. Der Vorteil von Naturstoffen gegenüber vollständig synthetisch hergestellten Pharmaka liegt meist in der auf der chemischen und strukturellen Komplexität basierenden Aktivität und Selektivität begründet. Obwohl die synthetische Chemie im 20. Jahrhundert enorme Fortschritte in punkto Chemo-, Regio-, und Stereoselektivität von Reaktionen gemacht hat, sind komplexe Naturstoffe nicht oder nur unter unwirtschaftlichem Aufwand synthetisch zugänglich. Naturstoffe haben sich ihre Komplexität über Jahrmillionen evolutionärer Entwicklung angeeignet. Ein Großteil ist dabei mikrobiologischen Ursprungs, was zum einen auf die riesige Anzahl an Spezies, zum anderen auf deren kurze Generationszeiten zurückzuführen ist. Mikroorganismen stehen im ständigen Wettstreit um Ressourcen und ökologische Nischen und haben daher viele potente Wirkstoffe und Abwehrmechanismen entwickelt. Gerade diese Abwehrmechanismen stellen aber auch ein großes Problem für die moderne Medizin dar. Es tauchen immer mehr Bakterienstämme auf, die gegen die gängigen Antibiotika resistent sind [4]. Dabei bedienen sich die Bakterien unterschiedlicher Mechanismen um sich vor den Antibiotika zu schützen: (1) Die Inaktivierung der wirksamen Verbindung, (2) die Reduzierung der intrazellulären Konzentration durch Export, (3) die Verminderung der Antibiotikaaufnahme, (4) die

Überproduktion des Zielmoleküls, (5) die Modifizierung des Zielmoleküls zur Verminderung der Affinität des Antibiotikums oder sogar (6) die Überwindung der Notwendigkeit des Zielmoleküls [5]. Diese Entwicklung macht die Suche nach immer neuen antibiotischen Wirkstoffen und damit die Isolierung und Identifizierung neuer Naturstoffe notwendig. Aber auch neben der Suche nach neuen Antibiotika, sind Naturstoffe wichtig, da sie zum einen andere medizinisch relevante Wirkungen haben können und zum anderen als Grundgerüste für die Weiterentwicklung neuer aktiver Verbindungen dienen können. Gerade in Bezug auf die Tatsache, dass Krebs in den meisten Industrienationen mittlerweile an zweiter Stelle der Todesursachen steht [6], werden das gezielte Design neuer Verbindungen und deren biotechnologische oder chemoenzymatische Synthese immer wichtiger. Es bedarf daher einer breiten Grundlagenforschung um neue Naturstoffe zu isolieren, zu charakterisieren und deren Biosynthesemechanismen zu verstehen.

Naturstoffe können nach chemischen Gesichtspunkten in die verschiedenen Klassen Alkaloide, Fettsäuren, Kohlenhydrate, Lipide, Peptide, Polyketide und Terpene eingeteilt werden (Abbildung 1).

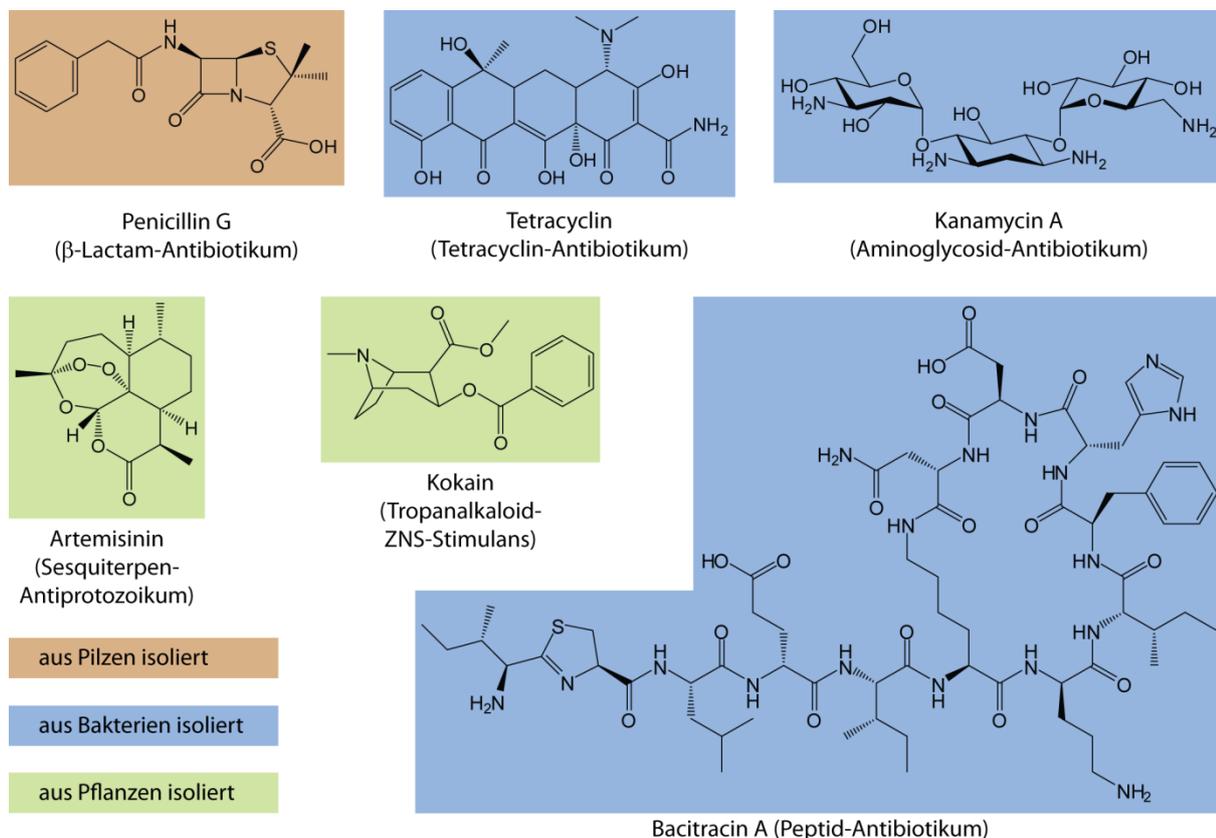


Abbildung 1 – Beispiele für Naturstoffe aus verschiedenen Stoffklassen: β-Lactame (stark modifizierte Peptide) z.B. Penicillin, Tetracycline gehören zu den Polyketiden, Aminoglycoside (z.B. Kanamycin) gehören zu den Kohlenhydraten, Sesquiterpene (z.B. Artemisinin) sind eine Untergruppe der Terpene, Tropanalkaloide (z.B. Kokain) sind eine von vielen Untergruppen der Alkaloide und peptidische Naturstoffe (Bacitracin).

Viele Naturstoffe tragen aber Merkmale von mehreren Klassen, wie z.B. Glycopeptide oder Lipopeptide. Daher wird auch nach der an der Synthese beteiligten Biosynthesemaschinerie unterschieden. In dieser Arbeit geht es vor allem um Naturstoffe mit peptidischer Grundstruktur. Im Folgenden werden deshalb einige Klassen und Synthesewege zu peptidischen Naturstoffen beschrieben.

1.2 Peptidische Naturstoffe

Die Knüpfung einer Peptidbindung oder chemisch Amidbindung stellt eine der wichtigsten Reaktionen für das Leben überhaupt dar. Diese Reaktion findet im Sekundär- und Primärmetabolismus sowie in der Proteinbiosynthese am Ribosom statt. Auch wenn die Peptidbindungsknüpfung am Ribosom die älteste darstellt [7], haben sich andere Strategien zur Katalyse dieser Reaktion entwickelt. Man kann grundlegend die Templat-abhängige, bei der die Sequenz der monomeren Einheiten im Polymer durch ein Templat vorgegeben ist, und Templat-unabhängige, bei der die Reihenfolge der Monomere im Polymer durch die Substratspezifitäten der beteiligten Enzyme direkt vorgegeben ist, Synthese peptidischer Bindungen unterscheiden (Abbildung 2) [8].

Bei den Templat-unabhängigen Synthesewegen haben sich Enzyme entwickelt, die auf unterschiedlichen Reaktionsstrategien basieren. Dazu zählen die ATP-grasp-Ligasen [9], die AMP-abhängigen Ligasen [10,11], tRNA-Aminoacyltransferasen [12] und Cyclodipeptidsynthasen [13-15]. ATP-grasp-Ligasen verwenden ATP zur Aktivierung der Carboxylfunktion der ersten Aminosäure. Dabei erzeugen sie ein gemischtes Phosphorsäureanhydrid durch Übertragung einer Phosphatgruppe, wobei ADP als Nebenprodukt entsteht. Die aktivierte Carboxylfunktion kann nun durch eine Aminogruppe angegriffen werden und es kommt unter Abspaltung von Phosphat zur Ausbildung der Peptidbindung. AMP-abhängige Ligasen verwenden zwar auch ATP zur Aktivierung in Form eines gemischten Phosphorsäureanhydrids, sie übertragen aber AMP auf die Carboxylfunktion, wobei Pyrophosphat als Nebenprodukt entsteht. Der Angriff der Aminogruppe erfolgt analog, so dass das Peptid, sowie AMP als Nebenprodukt entsteht. Diese Säureaktivierung als AMP-Derivat findet sich auch bei Templat-abhängigen Synthesewegen wie den Nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) [16] oder indirekt beim Ribosom. Dort findet die eigentliche Substrataktivierung vorher durch die sog.

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen statt. Dabei wird ein AMP-Derivat der Aminosäure erzeugt, welche dann auf die 3'-Hydroxylgruppe der tRNA unter Ausbildung einer Esterbindung übertragen wird [17]. Aminoacyl-tRNAs werden aber nicht nur vom Ribosom benutzt. tRNA-Aminoacyl-Transferasen und Cyclodipeptidsynthasen stehlen die Aminoacyl-tRNAs aus dem Primärmetabolismus und verwenden sie zur Herstellung von Sekundärmetaboliten. Dabei katalysieren Cyclodipeptidsynthasen die Formierung von zwei Peptidbindungen und erzeugen so Diketopiperazine, das zyklische Produkt einer doppelten Kondensation zweier Aminosäuren.

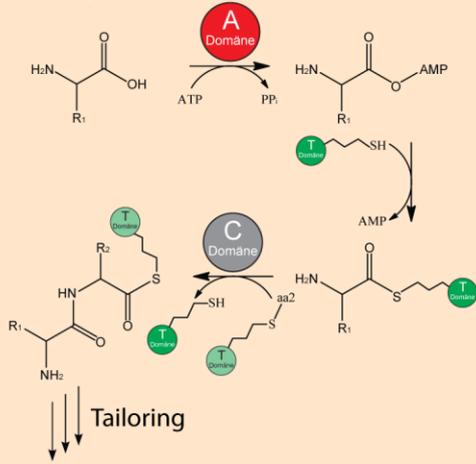
Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei den NRPS um einen Templat-abhängigen Syntheseweg. Diese Megaenzyme sind modular aufgebaut, wobei jedem Modul die Inkorporation einer Aminosäure zu Teil wird [18]. Jedes Modul verfügt in der Regel über drei Domänen, die verschiedene Teilaufgaben der Peptidbildung übernehmen. Hier wird ebenfalls eine ATP-abhängige Aktivierungsstrategie benutzt. Dabei wird von der Adenylierungsdomäne (A-Domäne) das AMP-Derivat einer Aminosäure erzeugt und auf einen im Protein vorkommenden Cofaktor, den Phosphopantetheinylarm, in der Peptidylcarrierprotein- (PCP) oder Thiolierungsdomäne (T-Domäne) genannten Domäne, als Thioester übertragen. Die eigentliche Peptidbindungsknüpfung findet in der Kondensationsdomäne (C-Domäne) unter Regeneration des Cofaktor statt. Dabei greift die freie Aminogruppe einer an die *downstream* T-Domäne gebundenen Aminosäure den Thioester der aktivierten Aminosäure des vorherigen Moduls an. Dadurch wird die wachsende Peptidkette immer auf die nächste T-Domäne übertragen und das Produkt bleibt kovalent am Enzym gebunden. Die Freisetzung erfolgt durch die Thioesterasedomäne (TE-Domäne), die entweder ein lineares oder zyklisiertes Produkt vom Enzym abspaltet.

Die durch NRPS produzierten Naturstoffe, werden meist noch weiter durch sog. Tailoringenzyme modifiziert. Diese Enzyme arbeiten entweder an der freien oder der an die PCP-Domäne gebundenen Aminosäure vor der Produktaggregation oder erst am freigesetzten Produkt [19]. Ihre große Diversität erlangen die nichtribosomalen Peptide (NRP) durch dieses Tailoring und die Möglichkeit der NRPS mit nichtproteinogenen Aminosäuren oder Fettsäuren [20] bis zu 528 Bausteine (NORINE) [21] für die Synthese zu verwenden.

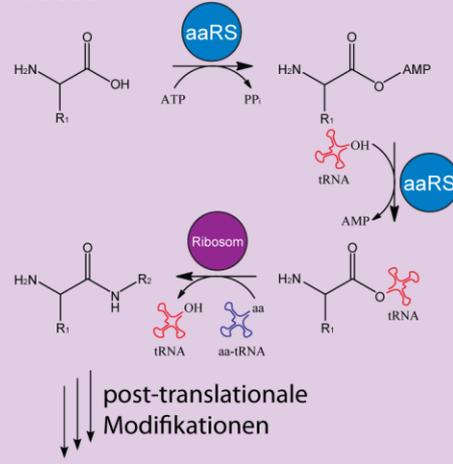
Das Ribosom, welches die komplette Proteinbiosynthese in allen bekannten Lebensformen ermöglicht, ist auch am Sekundärmetabolismus beteiligt. Dabei gehört es zu den Templat-abhängigen und tRNA-abhängigen Synthesewegen. Neben den am Primärmetabolismus katalytisch beteiligten Proteinen werden auch kleine Peptide und Proteine synthetisiert, die selbst Sekundärmetaboliten sind, oder in diese transformiert werden [22].

TEMPLAT-ABHÄNGIGE BIOSYNTHESE

NRPS

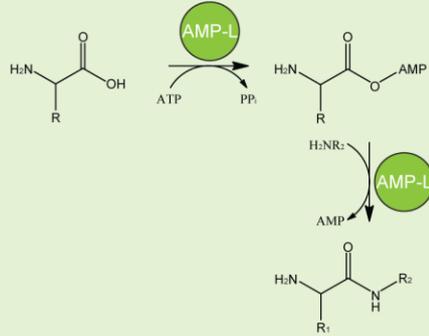


Ribosom

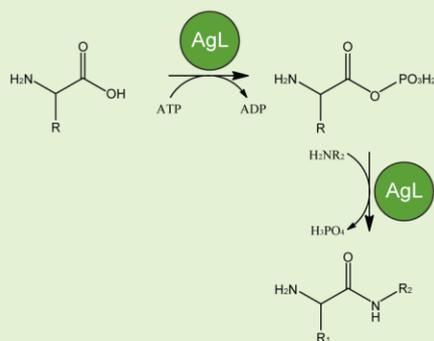


tRNA-UNABHÄNGIGE BIOSYNTHESE

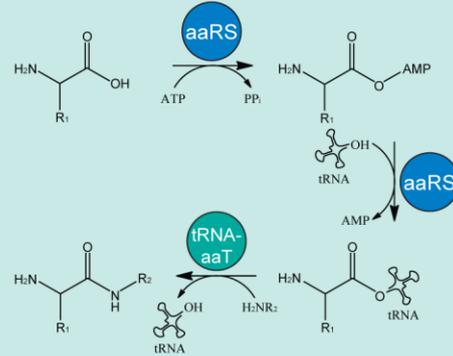
AMP-abhängige Ligasen



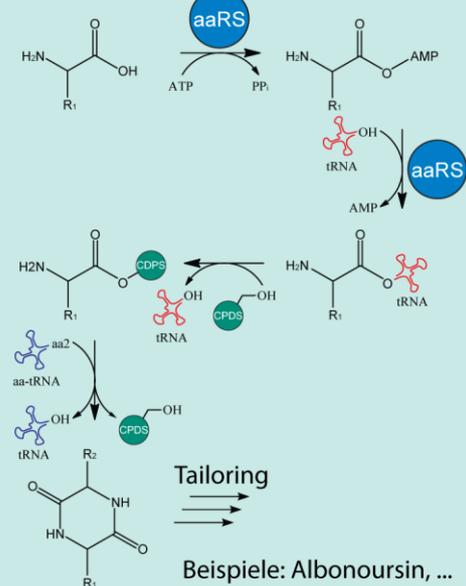
ATP-grasp Ligasen



tRNA-aa-Transferasen



CPDS



TEMPLAT-UNABHÄNGIGE BIOSYNTHESE

tRNA-ABHÄNGIGE BIOSYNTHESE

Abbildung 2 – Übersicht über die Strategien zur Bildung einer peptidischen Bindung, aufgeteilt in Abhängigkeit eines Templats und der tRNA. Katalysierende Enzyme sind als Kreise dargestellt, verwendete Abkürzungen: A – Adenylierung, C – Kondensation, T – Thiolierung, aa – Aminoacyl, aaRS – Aminoacyl-tRNA-Synthetase, AMP-L – AMP-abhängige Ligase, AgL – ATP-grasp Ligase, tRNA-aaT – tRNA-Aminoacyl-Transferase, CPDS – Cyclodipeptidsynthase.

1.3 Ribosomal-synthetisierte post-translational modifizierte Peptide (RiPPs)

Diese peptidischen Naturstoffe gehören der für diese Arbeit wichtigsten Klasse der ribosomal synthetisierten und post-translational modifizierten Peptide (RiPPs) an. Sie werden aus einem Vorläuferpeptid durch teilweise extensive post-translationale Modifikationen (PTM) generiert, welche den maturierten Produkten ihre größere strukturelle Diversität in Vergleich zu linearen Peptiden verleihen [22]. Auch wird das durch die ribosomale Herkunft eingeschränkte chemische Spektrum der 20 proteinogenen Aminosäuren durch die PTMs entscheidend erweitert. Dies ermöglicht dem Naturstoff eine bessere Zielerkennung oder eine Erhöhung der chemischen, proteolytischen und metabolischen Stabilität [22]. Die Assemblierung eines RiPPs beginnt mit der ribosomalen Synthese des Vorläuferpeptids. Ein solches Vorläuferpeptid kann generell in verschiedene Segmente unterteilt werden, die verschiedene Funktionen erfüllen (Abbildung 3). In der Regel findet sich ein N-terminales Leaderpeptid, das an der Erkennung durch die PTM Enzyme beteiligt ist oder für den Export aus der Zelle entscheidend ist [23]. Die ins endgültige Produkt konvertierte Sequenz des Vorläufers wird Kernpeptid genannt. Zusätzlich finden sich meist N- und/oder C-terminal vom Kernpeptid sog. Erkennungssequenzen (*recognition sequences* RS) [24-26]. Zusätzlich sind bei eukaryotischen Peptiden N-terminale Signalsequenzen, die für den Transport in bestimmte Zellorganellen oder den Export von Bedeutung sind, vorhanden. Außerdem tragen manche Vorläuferpeptide statt eines N-terminalen Leaderpeptids, ein C-terminales Followerpeptid [27-30]. Nach dem durch die Maturierungsenzyme alle PTMs in die Kernsequenz inkorporiert wurden, werden die Leader- sowie die eventuellen Signal- und Followersequenzen in der Regel proteolytisch abgespalten um den fertigen Naturstoff zu erzeugen [22]. Einige PTMs finden auch erst nach der proteolytischen Spaltung des Vorläuferpeptids statt. Dies sind vor allem Modifikationen, die den freigesetzten N-Terminus benötigen wie z.B. Zyklisierungen. Der letzte Schritt der Produktion des Naturstoffs ist der

Export aus der Produzentenzelle, der manchmal sogar mit einer letzten Modifikation gekoppelt ist [31].

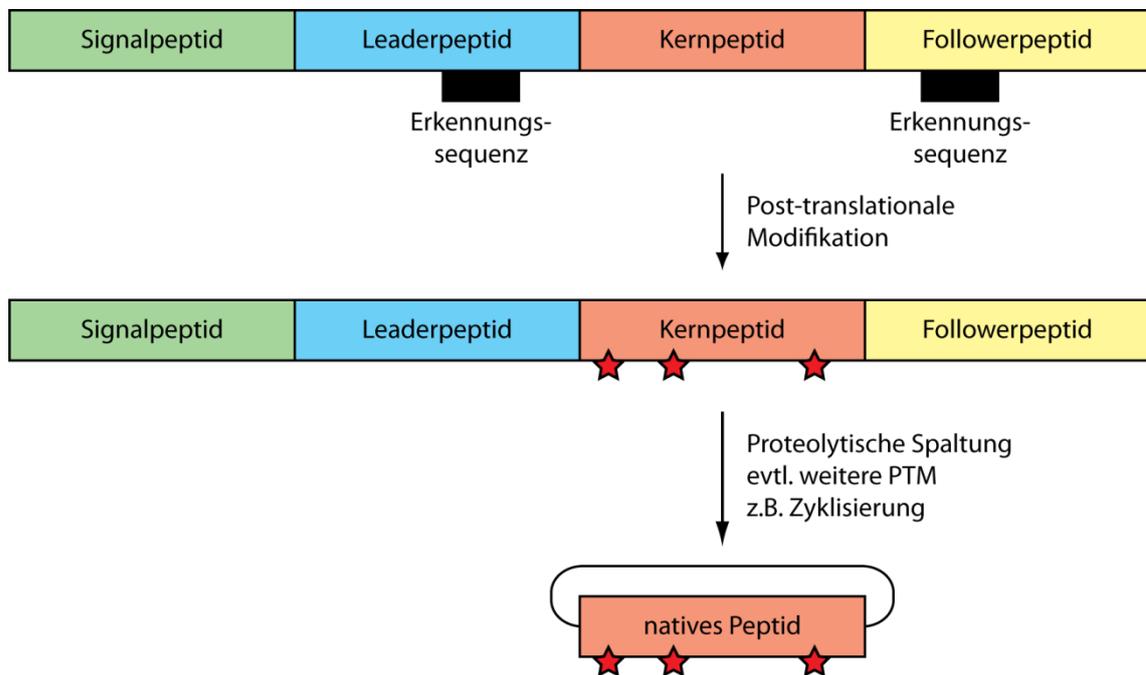


Abbildung 3 – Schema der Biosynthese eines RiPP aus dem Vorläuferpeptid. Das Vorläuferpeptid ist in verschiedene Bereiche unterteilt, die nicht alle vorhanden sein müssen. Die Erkennungssequenzen können in Leader-, Kern- oder Followerpeptid unterschiedlich positioniert sein. PTMs sind durch Sterne symbolisiert. Die nach der proteolytischen Spaltung stattfindende beispielhafte Zyklisierung ist durch einen Ring im nativen Peptid dargestellt.

Eine praktische Einteilung der RiPPs kann anhand ihrer chemischen Modifikationen erfolgen. Die meisten RiPPs tragen jedoch mehrere und teilweise sehr unterschiedliche PTMs, so dass eine echte Klasseneinteilung nicht möglich ist. Daher werden Naturstoffe, die ein bestimmtes Set an PTMs tragen und sofern bekannt von einer sehr ähnlichen Biosynthesemaschinerie produziert werden, zu mehr als einem Dutzend RiPP-Familien zusammengefasst. Die folgende Tabelle 2 soll einen Überblick über verschiedene Modifikationen und RiPP-Familien geben.

Tabelle 2 – Übersicht über post-translationale Modifikationen und Naturstoffgruppen, die diese enthalten.

Post-translationale Modifikation	RiPP-Naturstoffe
Proteolyse	nahezu alle RiPPs
- Linearisierung der Peptidkette	- Botromycine, Lanthipeptide, LAPs, Linaridine, Microviridine, Proteusine, Sactipeptide, Thiopeptide
- Zyklisierung der Peptidkette (Kopf-zu-Schwanz oder Seitenketten-zu-Schwanz)	- Amatoxine/Phallotoxine, <i>bacterial head-to-tail</i> zyklisierte Peptide Cyanobactine, Cyclotide, Lasso peptide, Orbitide, Sactipeptide
Disulfidbrücken	Cyclotide, Lasso peptide, Sactipeptide
Thioetherbrücken	
- Cys zu β C	- Lanthipeptide, Linaridine
- Cys zu α C	- Sactipeptide
- Cys zu Seitenkette	- Amatoxine/Phallotoxine
Heterozyklisierung	
- Thiazole, Oxazole	- Botromycine, Cyanobactine, LAPs, Thiopeptide
- Pyridin/Piperidin	- Thiopeptide
Lactam-/Lacton-/Amidin-bildung mit Seitenketten	Botromycine, Microviridine
Prenylierung	Cyanobactine
C-/O-/N-Methylierung	Botromycine, LAPs, Proteusine
Oxidation/Hydroxylierung	Botromycine, Cyanobactine, LAPs, Proteusine, Thiopeptide
Dehydratisierung	Lanthipeptide, Linaridine, Proteusine, Thiopeptide
Epimerisierung	Linaridine, Proteusine

Im Folgenden sollen einige der genannten RiPP-Gruppen, ihre Biosynthese und die Rolle der Vorläuferpeptide betrachtet werden.

1.3.1 Lanthipeptide

Lanthipeptide mit ihrem prominentesten Beispiel Nisin A (Abbildung 4A) zeichnen sich durch das Vorhandensein von Lanthionin bzw. Methyllanthionin aus [32,33]. Lanthionin ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, die als zwei Alanine, die über die β -Kohlenstoffe durch eine Thioetherbrücke verknüpft sind, aufgefasst werden kann. In der Biosynthese der Lanthipeptide wird dies realisiert, indem Serin oder Threonin über eine Phosphataktivierung zu Dehydroalanin (Dha) bzw. Dehydroaminobuttersäure (Dhb) dehydratisiert werden [34-36]. Im Anschluss erfolgt eine stereoselektive Michael-Addition des Cysteinrests auf den β -Kohlenstoff unter Ausbildung des Thioethers (Abbildung 4B). Dies führt in manchen Fällen zur Änderung der absoluten Stereokonfiguration der Akzeptoraminosäure zur D-Aminosäure. Diese Reaktion wird im Fall der Klasse I Lanthipeptide von zwei Enzymen, einer Dehydratase [37-39] und einer Cyclase [40-42], im Fall der Klassen II bis IV, von einem Enzym mit mehreren funktionellen Domänen katalysiert [35,36,43]. Bei den Lanthipeptiden der Klasse II besitzt das Enzym eine Dehydratasedomäne und eine zur Klasse I sehr ähnliche Cyclasedomäne. Bei den Klasse III und IV Lanthipeptiden wird die Dehydratisierung von der N-terminalen PhosphoSer/PhosphoThr-Lyase- und der zentralen Kinasedomäne katalysiert. Die Cycloaddition wird durch die C-terminale Cyclasedomäne katalysiert.

Die Lanthipeptidbiosynthesemaschinerie ist sehr tolerant gegenüber Substitutionen in der Kernpeptidsequenz außer bei den post-translational modifizierten Resten. Während einige PTM-Enzyme das Leaderpeptid benötigen [44-46], ist dies für andere nicht notwendig [47-49]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Leaderpeptid nicht unbedingt kovalent mit dem Kernpeptid verknüpft sein muss um die Biosynthese zu ermöglichen [46,50,51]. Es ist auch möglich nicht-Lanthipeptidsequenzen zu Lanthipeptiden zu prozessieren, wenn das LanA Leaderpeptid an die Sequenz geknüpft wird. Das Leaderpeptid hat hier also vor allem die Funktion einer Erkennungssequenz und beeinflusst möglicherweise das Gleichgewicht der prozessierenden Enzyme zwischen aktiven und inaktiven Formen.

Prominente Beispiele der Lanthipeptide sind das Nisin A, welches antimikrobielle Aktivität besitzt [52], oder das Labyrinthopeptin mit antiallodynischer Aktivität [53].

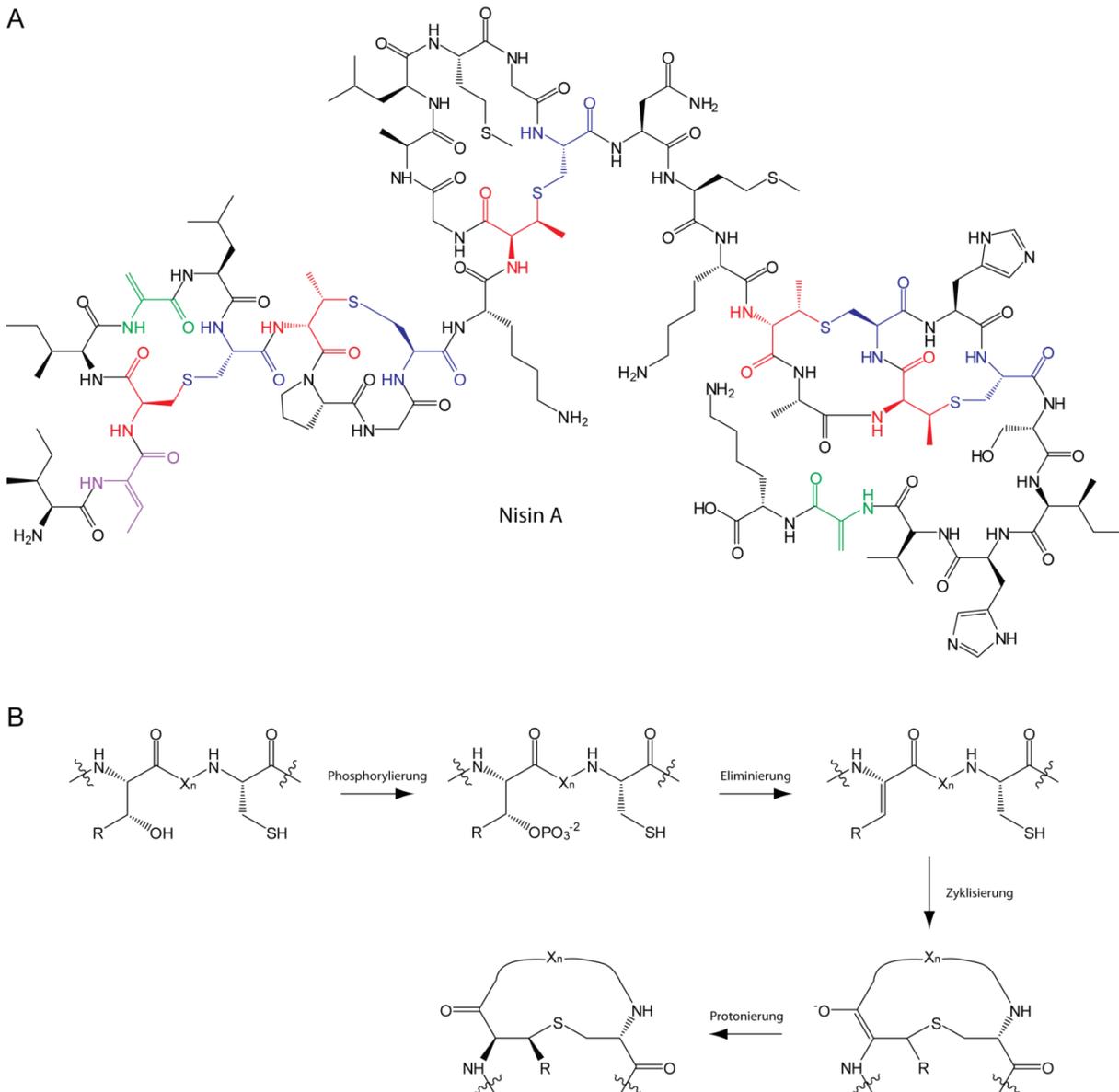


Abbildung 4 – Lanthipeptide. **A** Struktur des Nisin A. Lanthin- bzw. Methyllanthinreste sind entsprechend ihrer Aminosäurenbestandteile Serin und Threonin (rot) und Cystein (blau) farbig markiert. Dehydroalanin ist in Grün und Dehydroaminobuttersäure ist in Lila dargestellt. **B** Mechanismus der Thioetherbrückenbildung. R = H für Lanthionin, R = Me für Methyllanthionin.

1.3.2 Linaridine

Linaridine haben ebenso wie die Lanthipeptide Thioetherbrücken als PTM. Diese werden aber über einen anderen biosynthetischen Pfad generiert [54]. Das erste Beispiel dieser noch recht jungen Familie von RiPPs ist Cypermycin, welches einen C-terminalen Aminovincylcysteinrest trägt (Abbildung 5) [55]. Bei einigen Lanthipeptiden (z.B. Epidermin) ist diese Modifikation ebenfalls zu finden und wird durch Michael-Addition eines oxidativ decarboxylierten Cysteins an Dha aus Ser generiert [56]. Im Gegensatz zu den Lanthipeptiden

wird diese Thioetherbrücken bei den Linaridinen aus zwei Cysteinen über einen noch unbekanntem Mechanismus generiert. Die weiteren PTMs der Linaridine sind Dehydratisierungen von Threoninresten, sowie die Epimerisierung von Isoleucin. Möglicherweise handelt es sich bei den Linaridinen auch nur um eine Untergruppe der Lanthipeptide. Eine solche Umgruppierung sollte erfolgen, wenn in Zukunft Linaridine mit Lanthioninbrücken identifiziert werden sollten.

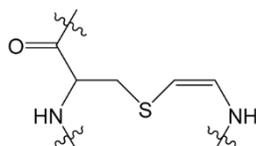


Abbildung 5 – Aminovinylcystein. Diese ungewöhnliche Gruppe der Linaridine entsteht durch einen unbekanntem Mechanismus aus zwei Cysteinen.

1.3.3 Sactipeptide

Sactipeptide sind die dritte Familie von Thioetherbrücken-enthaltenden RiPPs. Im Unterschied zu den beiden bisher besprochenen Familien, liegen hier aber keine Verknüpfungen von Cysteinen mit β -Kohlenstoffen, sondern mit α -Kohlenstoffen vor. Dabei handelt es sich chemisch um eine vielfach schwieriger zu katalysierende Reaktion, da α -C in der Regel sehr reaktionsträge sind, während sich β -C durch Eliminierungen leicht aktivieren lassen. In der Biosynthese der Sactipeptide kommt daher ein radikalischer Mechanismus zum Einsatz. Ein einziges Radikal-SAM-Enzym AlbA bildet dabei alle drei Thioetherbrücken im am besten untersuchten Sactipeptid Subtilosin A (Abbildung 6A) [57]. Dieses Enzym hat zwei essentielle 4Fe4S-Cluster, von welchen einer für die radikal-SAM-Spaltung zuständig ist (Abbildung 6B), während der andere wahrscheinlich die Übertragung des Radikals auf das Peptid katalysiert (Abbildung 6C).

Andere Vertreter dieser Gruppe, die Thuricine CD [58] und Thurincin H [59] tragen ebenfalls drei Thioetherbrücken, sind aber nicht Kopf-zu-Schwanz-zyklisiert. Der *Sporulation Killing Factor* (SKF) wiederum ist wie Subtilosin zyklisiert, hat aber nur eine Thioetherbrücke und zusätzlich eine Disulfidbrücke (Abbildung 6A) [60,61].

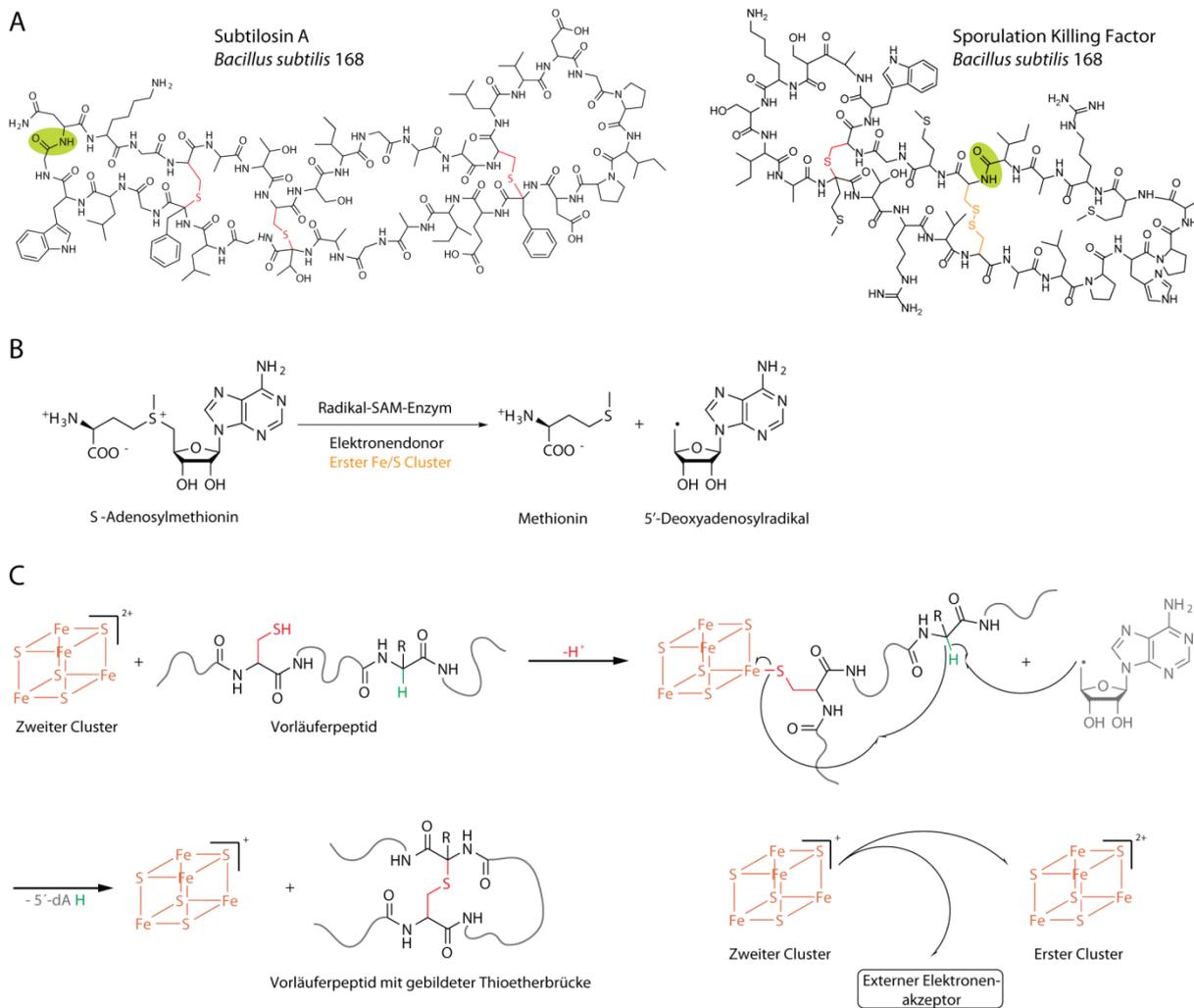


Abbildung 6 – Sactipeptide (nach Flöhe *et al.* 2013) [62]. **A** Strukturen von Subtilisin A und SKF aus *B. subtilis*. Thioetherbrücken sind rot, Disulfidbrücken orange dargestellt. Die Peptidbindung der Makrozyklisierung ist hellgrün hinterlegt. **B** Allgemeiner Mechanismus der radikal-SAM-Spaltung. **C** Putativer Mechanismus der Thioetherbrückenknüpfung bei Sactipeptiden. Wohin das Elektron für die Regenerierung des zweiten Clusters übertragen wird, ist unbekannt.

Die Bioaktivitäten der von verschiedenen *Bacillus*-stämmen produzierten Sactipeptide erstrecken sich im Moment vor allem auf antibiotische Aktivität gegen andere gram-positive Spezies oder gegen die eigene Art, wie es bei SKF der Fall ist. Dabei ist nur für Subtilisin A eine mögliche Wirkungsweise durch Inkorporation in der Membran und Ausbildung von Kanälen bekannt [63,64]. Zur Rolle des Leaderpeptids bei den Sactipeptiden gibt es bisher nur wenige experimentelle Daten. Bekannt ist nur, dass die Thioetherbrückenbildung das Leaderpeptid benötigt [57]. Möglicherweise findet auch eine Art von Vorfaltung des gesamten Peptids statt, so dass in einer Art von Reißverschlussmechanismus eine Thioetherbrücke nach der anderen synthetisiert wird und zum Schluss die Makrozyklisierung stattfinden kann [57,65].

1.3.4 LAPs

Die Abkürzung LAP steht für Lineare Azol(in)-enthaltende Peptide. Die ersten Arbeiten an dieser Gruppe der RiPPs datieren auf den Beginn des 20. Jahrhunderts zurück [66,67]. Aber erst im Jahr 2000 wurden die LAPs als eigene Familie der RiPPs definiert [68]. Ein Vertreter der LAPs, das Microcin B17, war das erste RiPP, dessen Biosynthese *in vitro* rekonstituiert wurde [69,70]. Die LAPs zeichnen sich durch die Präsenz von Thiazol- und (Methyl-)Oxazol-Heterozyklen aus, die aus Cystein-, Serin- oder Threoninresten gebildet werden. Diese Cyclodehydratisierungsreaktion wird ähnlich zu den Lanthipeptiden von einem bifunktionalen oder zwei Enzymen (C/D) durch eine Phosphataktivierung katalysiert (Abbildung 7A) [71,72]. Es findet aber keine Eliminierung statt, sondern die Phosphorylierung begünstigt den nukleophilen Angriff des Alkohols/Thiols auf den Carbonyl und erleichtert den anschließenden Abgang des Carbonylsauerstoffs als Phosphat. Das gebildete Azolin wird in einem zweiten Schritt von einer FMN-abhängigen Dehydrogenase (B) zum Azol oxidiert [69,73]. Die BCD Biosynthesemaschinerie zur Erzeugung der Azole findet sich homolog auch bei den Thiopeptiden, Cyanobactinen und Botromycinen (siehe 1.3.5, 1.3.6 und 1.3.7). Weitere Modifikationen, die bei den LAPs auftreten können, sind Acetylierung, Methylierung und Dehydrierung [71,74,75].

Die Bioaktivitäten der bisherigen Vertreter dieser Gruppe sind antimikrobiell wie bei Microcin B17 (DNA Gyrase Inhibitor) und Plantazolicin oder sie modulieren den Sekundärmetabolismus und die Morphogenese in Streptomyceten (Goadsporin) [75-77].

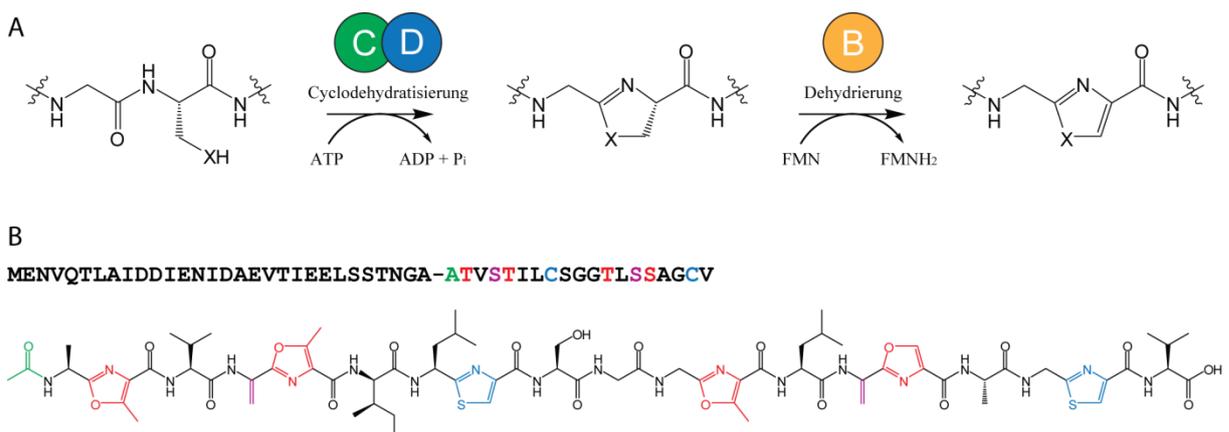


Abbildung 7 – Lineare Azol(in)-enthaltende Peptide (LAPs). **A** Mechanismus der Heterozyklisierung. X = O für Oxazol(in), X = S für Thiazol(in). **B** Struktur des LAP Goadsporin und Sequenz seines Vorläuferpeptids. PTMs sind farbig markiert: Oxazole aus Serin und Threonin in Rot, Thiazole aus Cystein in Blau, Dehydroalanine in Magenta und die N-Acetylierung in Grün.

1.3.5 Thiopeptide

Thiopeptide sind eine große und bereits lange bekannte Familie der RiPPs [78-80]. Wie die LAPs, tragen sie meist mehrere Thiazol- und Oxazolringe, die in gleicher Weise von homologen Enzymen synthetisiert werden. Ihr klassenspezifisches Merkmal ist aber eine ungewöhnliche Makrozyklisierung, die zu einem unterschiedlich substituierten stickstoffhaltigen Sechsring in einer von drei Oxidationsstufen (Piperidin, Dehydropiperidin oder Pyridin) führt. Des Weiteren finden sich oft dehydrierte Aminosäuren, die analog zu den Lanthipeptiden biochemisch synthetisiert werden, sowie weitere Zyklisierungen in Thiopeptiden. Der zentrale Sechsring wird möglicherweise über eine [4+2] Cycloaddition von zwei Dehydroalaninen generiert [81]. Die Inaktivierung eines Gens (*tcIM*) der Thiocillinbiosynthese führte zur Akkumulation eines linearen Peptids, das zwei vorhergesagte Dehydroalanine enthält und somit die Hypothese der Cycloaddition stützt [82]. Eine weitere Besonderheit der Thiopeptide findet sich in der *d* und *e*-Serie dieser Gruppe, da hier das Leaderpeptid nicht durch proteolytische Spaltung sondern durch Eliminierung vom zentralen Sechsring aus abläuft [70].

Die meisten der Thiopeptide sind antimikrobiell gegen gram-positive Bakterien wirksam, während sie nicht in der Lage sind die äußere Membran von gram-negativen Bakterien zu durchdringen [83-85]. Das intrazelluläre Ziel der antibakteriellen Aktivität ist dabei das Ribosom [86-88]. Es wurden aber auch Antimalaria- [89-91] sowie Antitumor-Aktivitäten [92-94] der Thiopeptide beschrieben.

1.3.6 Cyanobactine

Eine weitere interessante Gruppe der RiPPs bilden die Cyanobactine. Sie wurden zuerst als cytotoxische Naturstoffe aus Manteltieren aus tropischen Korallenriffen isoliert [95]. Sie werden jedoch von symbiontischen Cyanobakterien produziert [96-98]. Ihr klassenspezifisches Merkmal ist neben der sehr oft, aber nicht immer vorhandenen Heterozyklisierung die *head-to-tail* Makrozyklisierung bei einer relativ geringen Größe von 6 bis 20 Aminosäuren (Abbildung 8A) [99]. Die Biosynthese wird von mehreren konservierten Enzymen übernommen. Zwei Serin Proteasen (A und G) katalysieren die Freisetzung und Makrozyklisierung des Kernpeptids aus dem Vorläuferpeptid (E) [99-101]. Optionale Enzyme sind Cyclodehydratasen (D), die für die Bildung der Azolringe zuständig sind,

Thiazoline/Oxazoline Dehydratasen, Tyrosinprenyltransferasen (F) sowie zwei konservierte Proteine unbekannter Funktion (B und C).

Von besonderem Interesse sind die Vorläuferpeptide der Cyanobactine. Sie bestehen aus einem N-terminalen Leaderpeptid mit bis zu drei Kernpeptiden, die C- und N-terminal von 4–5 aa langen RS eingerahmt sind (Abbildung 8B) [24,102]. Sofern Heterozyklen im Cyanobactin vorhanden sind werden diese zuerst gebildet [103,104]. Dann wird der N-terminale Teil von Protease A [105], anschließend der C-terminale Teil von Protease G abgespalten und gleichzeitig, die Makrozyklisierung katalysiert [105-107]. Weitere Modifikationen wie die Oxidation der Azoline oder die Prenylierung finden wahrscheinlich erst nach der Makrozyklisierung statt [108,109].

Die Bioaktivitäten der Cyanobactine sind sehr unterschiedlich und reichen von antitumoralen und antiviralen über antimikrobielle Aktivitäten bis hin zu Protease-Inhibition [99,110,111].

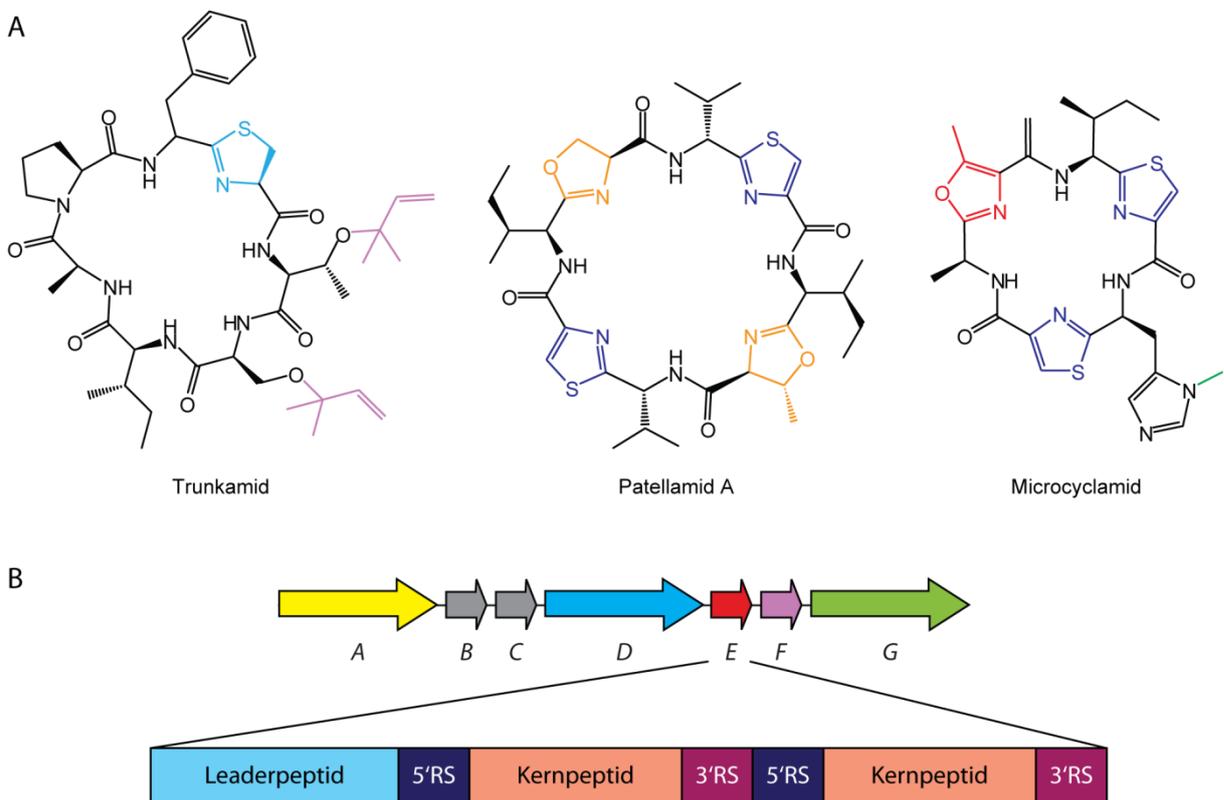


Abbildung 8 – Cyanobactine. **A** Strukturen der Cyanobactine Trunkamid, Patellamid A und Microcyclamid. PTMs sind farblich markiert: Oxazole aus Serin und Threonin in Rot, Oxazoline in Orange, Thiazole aus Cystein in Blau, Thiazoline in Cyan, Prenylierungen in Lila und N-Methylierung in Grün. **B** Allgemeiner Gencluster eines Cyanobactins. Die Heterocyclase D (cyan) bildet Thiazoline und Oxazoline, die Protease A (gelb) schneidet zwischen 5'RS und Kernpeptid, die Protease/Cyclase G (grün) schneidet zwischen Kernpeptid und 3'RS und zyklisiert das Kernpeptid. Weitere PTMs können folgen z.B. Prenylierung durch Enzym F (lila) oder Oxidation.

1.3.7 Bottromycine

Die Bottromycine sind eine noch recht junge Familie von RiPPs mit einzigartigen Modifikationen [112]. Bisher sind erst wenige sehr ähnliche Vertreter bekannt, die sich nur durch unterschiedliche Methylierungsmuster unterscheiden. Die beiden strukturellen Besonderheiten sind neben den angesprochenen O- und C-Methylierungen, die Makrozyklisierung als Amidin und ein decarboxylierter C-terminaler Thiazolring.

Das Vorläuferpeptid ist hierbei eine Besonderheit unter den RiPPs, da es kein Leaderpeptid, sondern eine 35 – 37 aa lange C-terminale Sequenz, das Followerpeptid, besitzt, welches aber vermutlich eine sehr ähnliche Funktion wie ein Leaderpeptid übernimmt [27-29]. Für die drei unterschiedlichen C-Methylierungen sind drei verschiedene radikal-SAM-Methyltransferasen zuständig, die sich teilweise auch bei den Proteusinen wiederfinden [27,28,113]. Die O-Methylierung wird durch eine O-Methyltransferase katalysiert [27]. Die weiteren Modifikationen, wie die Heterozyklisierung und die Makrozyklisierung werden vermutlich von zwei Enzymen, die YcaO-artige Domänen enthalten, katalysiert [27-30]. Für die Freisetzung des Kernpeptids, also die Abspaltung des N-terminalen Met und des Followerpeptids finden sich drei potentielle Enzyme, zwei putative Proteasen/Hydrolasen und eine putative Aminopeptidase. Möglicherweise ist letztere auch an der Makrozyklisierung beteiligt. Die oxidative Decarboxylierung wird wahrscheinlich durch die im Gencluster codierte Cytochrom P450 Oxidase vermittelt [29].

Die Bioaktivität der Bottromycine ist besonders interessant, da sie antibakterielle Aktivität gegen Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* sowie Vancomycin-resistente *Enterococci* gezeigt haben [114-116].

1.3.8 Proteusine

Die beiden sehr stark cytotoxischen Polytheonamide A und B sind bisher die einzigen Vertreter der Proteusine, die eine sehr ungewöhnliche Familie innerhalb der RiPPs darstellt (Abbildung 9A) [117-119]. Mit 48 aa Länge gehören sie neben den *bacterial head-to-tail* zyklisierten Peptiden zu den größten RiPPs. Trotz ihrer Größe wurde zunächst eine NRPS-Herkunft für sie angenommen, da sie eine große Anzahl nicht-proteinogener Aminosäuren wie β -Hydroxy- β -Methylaminobuttersäure und *tert*-Leucin sowie D-Aminosäuren enthalten. Die Rolle einiger Enzyme in der Biosynthese konnte durch Coexpressionsexperimente ermittelt werden [120]. Im ersten Schritt werden von einer einzigen radikal-SAM-homologen

Epimerase (PoyD) vermutlich alle Epimerisierungen vorgenommen. Dabei wird wahrscheinlich radikalisch ein Wasserstoff von einer Seite abstrahiert und von der andern addiert. Die Epimerisierung findet gerichtet und nicht in einer Gleichgewichtsreaktion statt. Der ungewöhnliche N-Terminus des Polytheonamids wird aus einem Threoninrest durch Dehydratisierung mittels des Enzyms PoyF und anschließende vierfache Methylierung mittels PoyB/C (beides radikal-SAM-Methyltransferasen) generiert [113,120]. In einem weiteren Schritt wird das Leaderpeptid proteolytisch abgespalten (PoyH/J) und eine spontane Desamidierung liefert das finale α -Keton (Abbildung 9C). Die acht N-Methylierungen werden regiospezifisch von nur einer N-Methyltransferase, PoyE, katalysiert. Die noch nicht charakterisierten weiteren PTMs sind die vier Hydroxylierungen von je zwei Valin- und Aspartatresten, für welche PoyI als putative Fe(II)/ α -Ketoglutarat-abhängige Oxygenase in Frage kommt, und die insgesamt 17 C-Methylierungen von fünf verschiedenen Aminosäuren für die möglicherweise ebenfalls PoyB und PoyC in Frage kommen.

Die Rolle des Leaderpeptids ist zwar noch ungeklärt, jedoch ist es mit 96 aa ungewöhnlich lang und zeigt Homologie zu Nitrilhydratasen [121]. Durch *Genome Mining* wurde in der Nähe von radikal-SAM-Enzymen ein weiterer Typ von langen Leaderpeptiden gefunden, welche Homologie zu Nif11 Stickstofffixierungsproteinen zeigt. Diese Art von Leaderpeptiden findet sich auch bei Lanthipeptiden, die von marinen Cyanobakterien produziert werden [121,122].

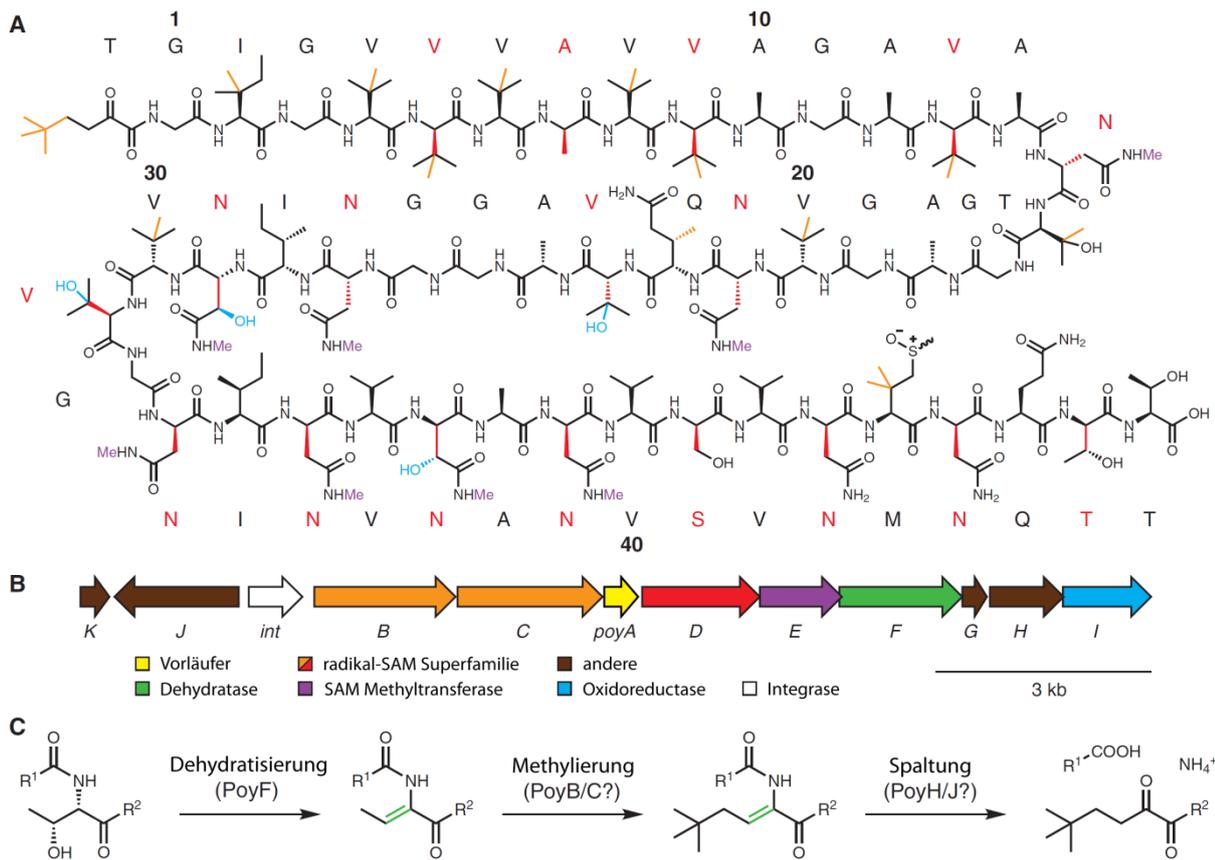


Abbildung 9 – Proteusine (nach Freeman et al. 2012) [120]. A Struktur des bisher einzigen Vertreters Polytheonamid. Die PTMs sind farbig markiert: C-Methylierungen in Orange, Epimerisierungen in Rot, N-Methylierungen in Lila, Hydroxylierungen in Hellblau. **B** Gencluster des Polytheonamids. Die Gene sind anhand ihrer Homologie bzw. sofern bekannt ihrer katalytischen Aktivität klassifiziert und analog zu den PTMs in Teil A farbig markiert. **C** Putativer Syntheseweg zum ungewöhnlichen N-Terminus über Dehydratisierung, mehrfache Methylierung und Leaderpeptidabspaltung.

1.3.9 Microviridine

Bei den Microviridinen handelt es sich um eine Gruppe von linearen RiPPs, die über ihre Seitenketten ω -Ester- und/oder ω -Amid-Makrozyklen ausbilden. Dabei werden die Lactone zwischen Aspartat/Glutamat und Serin/Threonin, die Lactame zwischen Aspartat/Glutamat und der ϵ -Aminogruppe von Lysin geformt [123].

Die drei Lacton- und Lactamstrukturen werden von zwei zur RimK-Familie [124] gehörenden ATP-grasp-Ligasen eingeführt [125,126]. Dabei wird zunächst der größere der beiden Lactonringe, dann der kleinere von der ω -Ester-Ligase MvdD und zuletzt der Lactamring von der ω -Amid-Ligase MvdC gebildet [125,127]. Das Enzym MvdB, eine GNAT-Typ N-Acetyltransferase katalysiert die N-Acetylierung der ersten Aminosäure [125].

Interessanterweise findet sich kein für eine Protease codierendes Gen im Cluster, so dass noch unklar ist, wie das Leaderpeptid abgespalten wird.

Das Leaderpeptid hat aber sehr wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Prozessierung, da es eine konserviertes PFFARFL Motiv enthält, das essentiell für die PTMs ist [128].

Die Microviridine stellen potente Proteaseinhibitoren im nanomolaren Bereich dar. So inhibiert z.B. Microviridin B spezifisch Elastase [129] und Microviridin J eine Protease vom Trypsin-Typ [130].

1.3.10 Bacterial head-to-tail zyklisierte Peptide, Amatoxine/Phallotoxine, Cyclotide und Orbitide

Zuletzt sollen hier noch einige RiPPs vorgestellt werden, die sich vor allem durch ihre Kopf-zu-Schwanz-Zyklisierungen auszeichnen, bevor zum Hauptthema der Arbeit, den Lassopeptiden, übergegangen wird. Die *bacterial head-to-tail* zyklisierten Peptide unterscheiden sich vor allem durch ihre Größe von 35 – 70 aa von anderen RiPPs (Abbildung 10A). Durch ihre Größe sind sie in der Lage eine definierte Struktur, die Saposin-Faltung, aus vier α -Helices einzunehmen [131,132]. Der Mechanismus der Zyklisierung ist bisher noch nicht verstanden, könnte aber auf einer ATP-Aktivierung des C-Terminus basieren, da in den Genclustern ATP-bindende Proteine codiert werden [133].

Im Gegensatz zu den eben besprochenen RiPPs, stammen die Amatoxine/Phallotoxine aus Pilzen [134] und die Cyclotide und Orbitide sind pflanzlichen Ursprungs [135,136]. Alle drei Gruppen haben eine Kopf-zu-Schwanz-Zyklisierung und sind etwas (Cyclotide: 28 – 37 aa) oder sogar deutlich kleiner (Amatoxine/Phallotoxine und Orbitide: 7 – 9 aa).

Amatoxine/Phallotoxine tragen mit unterschiedlichen Hydroxylierungen und einer intramolekularen Thioetherbrücke von einem Cystein zu einem Tryptophan weitere PTMs, deren Biosynthese aber noch nicht verstanden ist (Abbildung 10B) [137].

Cyclotide zeichnen sich neben ihrem Makrozyklus durch die Ausbildung von drei definierten und strukturfixierenden Disulfidbrücken aus, wodurch der sog. *cystine knot* gebildet wird (Abbildung 10C) [138-140]. Weitere PTMs sind für diese RiPP-Familie bisher nicht bekannt. Der genaue Mechanismus der Makrozyklisierung ist auch hier unklar, aber es könnten Asparaginyln-Endoproteasen an der Synthese beteiligt sein [141,142]. Ob die Ausbildung der Disulfidbrücken Proteindisulfidisomerasen benötigt, wird ebenfalls diskutiert [143]. Klar ist

aber bereits, dass das Leaderpeptid wohl von entscheidender Bedeutung für eine vermutlich stattfindende Vorfaltung und die anschließende Prozessierung ist [144].

Die Orbitide sollen an dieser Stelle nur kurz erwähnt werden als pflanzliche makrozyklische Peptide ohne Disulfidbrücken [136,145], die selten weitere PTMs wie Hydroxylierungen [146,147] oder N-Methylierungen [148] enthalten, meist jedoch unmodifiziert vorliegen (Abbildung 10D). Ihre Biosynthese ist ebenfalls weitgehend unverstanden. Sie werden aber aus recht großen Vorläuferpeptiden hergestellt, die mehrere Kernpeptide und daher N- und C-terminale Erkennungssequenzen enthalten [149].

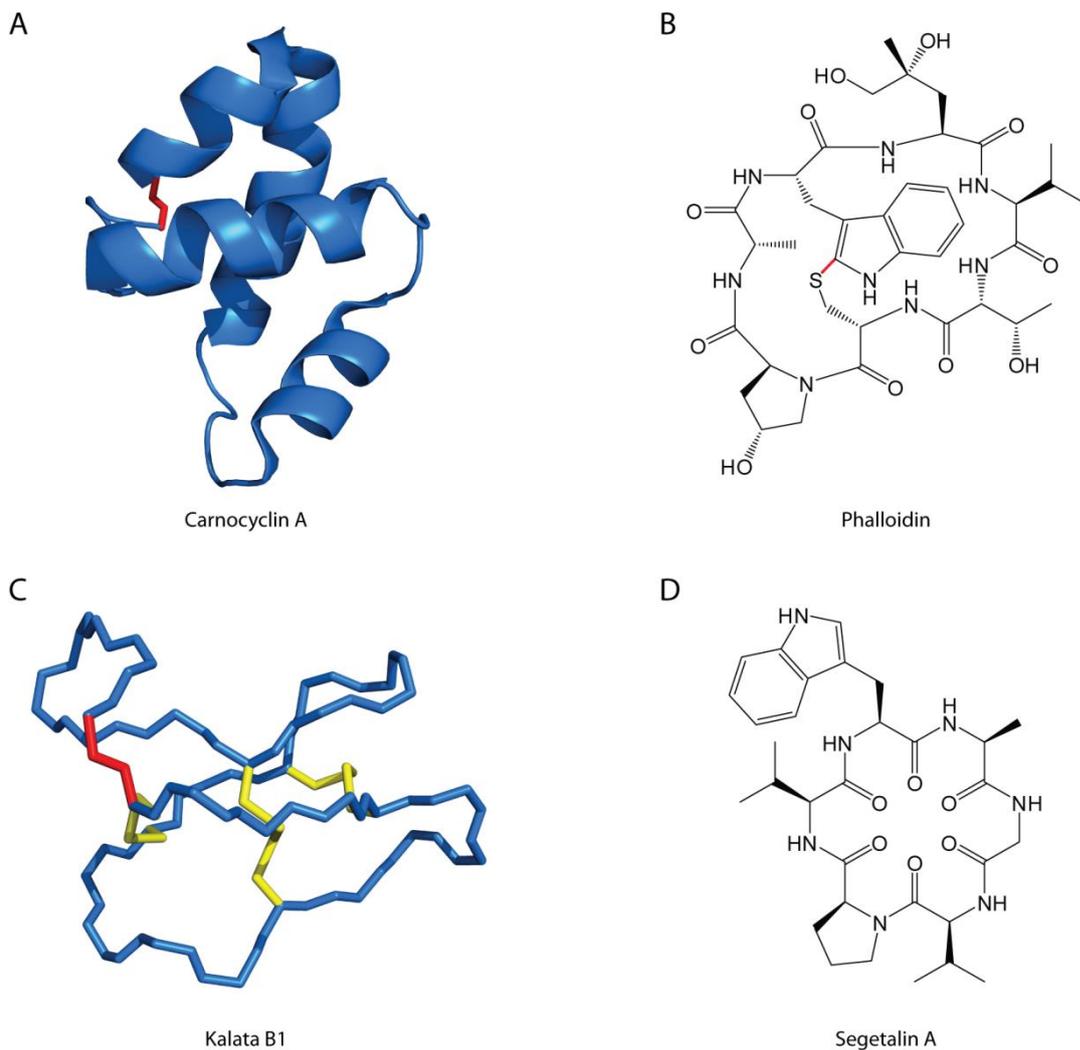


Abbildung 10 – Verschiedene Kopf-zu-Schwanz zyklisierte Peptide. A bacterial head-to-tail zyklisiertes Peptid Carnocyclin A (PDB: 2KJF) als Cartoon mit der Zyklisierungspeptidbindung in Rot. **B** Phallotoxin Phalloidin mit der ungewöhnlichen Thioetherbrücke zwischen Cystein und Tryptophan in Rot. **C** Cyclotid Kalata B1 (PDB: 1NB1) als Peptidrückgrat dargestellt mit der Zyklisierungspeptidbindung in Rot und den Disulfidbrücken in Gelb. **D** Orbitid Segetalin A.

1.4 Lassopeptide

Lassopeptide sind im Vergleich zu den bisher vorgestellten RiPPs aus chemischer Sicht nur sehr wenig post-translational modifiziert. Ähnlich wie die Cyclotide oder Orbitide verfügen sie als enzymatisch katalysierte PTM nur über einen Makrozyklus. Dieser ist jedoch nicht *head-to-tail*, sondern vom N-Terminus zu einer sauren Seitenkette geknüpft, so dass kein zyklisches, sondern ein verzweigt-zyklisches Produkt entsteht. Diese Peptide bestehen aus 16 – 21 Aminosäuren und werden sowohl von gram-negativen als auch gram-positiven Bakterien produziert [150]. Die angesprochene Makrolactamzyklisierung findet mit der Aminogruppe eines N-terminal gelegenen Glycins oder Cysteins und der an Position 8 oder 9 positionierten sauren Seitenkette eines Glutamats oder Aspartats statt. Das Besondere der Lassopeptide ist ihre dreidimensionale Faltung. Der extrazyklische Teil des Peptids, auch Schwanz genannt, ist durch den Makrolactamring gefädelt und ähnelt daher einem geknüpften Knoten oder einem Lasso, was dieser Peptidgruppe ihren Namen verleiht. Der Schwanz ist dabei entweder kovalent durch Disulfidbrücken oder nicht kovalent durch sterische Wechselwirkungen in seiner Lage fixiert. Anhand der Gegenwart dieser Disulfidbrücken werden Lassopeptide in verschiedene Klassen eingeteilt [151]. Klasse I Lassopeptide haben vier konservierte Cysteinreste und bilden zwei Disulfidbrücken aus, wodurch eine komplexe Dreiringstruktur entsteht, die besonders stabil ist. Zur Klasse III der Lassopeptide, welche sich durch das Vorhandensein von zwei Cysteinresten und einer Disulfidbrücke auszeichnet, existiert bisher nur ein Vertreter, das BI-32169 [152]. Die Klasse II Lassopeptide tragen keine Cysteine und bilden daher auch keine Disulfidbrücken aus. Die Stabilisierung ihrer Struktur findet ausschließlich durch sterische Wechselwirkungen statt, weswegen sich meist sehr große Aminosäuren im C-terminalen Peptidteil befinden [150].

Bisher wurden die meisten Lassopeptide aus Actinomyceten isoliert und durch systematische Bioaktivitätsscreenings gefunden. Daher haben sie auch einige ungewöhnliche Bioaktivitäten, die von antiviraler Aktivität gegen HIV [153,154], Inhibition des Glucagonrezeptors [152], des Endothelinrezeptor Typ B [155,156] und dem Atrial Natriuretic Factor [157,158] bis hin zu antimikrobieller Aktivität reichen [159-161]. Diese Aktivitäten entsprechen höchstwahrscheinlich nicht den natürlichen Funktionen der Peptide, sondern sind durch die Screenings zufällig gefunden worden. Die antimikrobielle Aktivität könnte schon eher der natürlichen Funktion der Lassopeptide entsprechen. Für das bestuntersuchte Lassopeptid Microcin J25 und Capistrin wurden die Wirkmechanismen aufgeklärt und das molekulare Ziel identifiziert [162,163]. Mccj25 blockiert den Substratkanal der bakteriellen RNA-

Polymerase, so dass keine neuen NTPs mehr binden können und somit die Transkription zum Erliegen kommt.

1.4.1 Lasso peptide der Klassen I, II und III

Die zu Beginn dieser Arbeit 2010 bekannten Klasse I Lasso peptide haben alle sehr ähnliche Sequenzen und wurden aus Streptomyceten isoliert. Die Peptide Siamycin I (MS-271 oder NP-06) [153,161,164-166], Aborycin (RP 71955) [154,167,168] und Siamycin II [166,169] unterscheiden sich nur durch den Austausch von Ile und Val an den Positionen 4 und 17. Sie alle haben 21 Aminosäuren und vier konservierte Cysteine an den Positionen 1, 7, 13 und 19, welche zwei Disulfidbrücken zwischen Cys1-Cys13 und Cys7-Cys19 bilden. Der Makrolactamring wird zwischen Cys1 und Asp9 geknüpft. Der 12 Aminosäuren umfassende extrazyklische Teil bildet eine 6 aa lange Schleife oberhalb und einen 6 aa langen Schwanz unterhalb des Rings aus. Die Fixierung ist vermutlich hauptsächlich auf die Disulfidbrücke zwischen Cys7 und Cys19 zurückzuführen, da diese Schwanz und Ring kovalent miteinander verknüpft. Die zweite Disulfidbrücke schränkt die Beweglichkeit vermutlich weiter ein, so dass eine enorm rigide Struktur entsteht (Abbildung 11A).

Tabelle 3 – Übersicht über die zu Beginn dieser Arbeit bekannten Lasso peptide mit 3D-Struktur.

Lasso peptide	Sequenz	Länge (Ring)	Produzent	Bioaktivität
Klasse I				
Siamycin I (MS-271)	CLGVGSCNDFAGCGYAIVCFW	21 (9)	<i>Streptomyces</i> sp.	Myosin light chain Kinase Inhibitor
Aborycin (RP71955)	CLGIGSCNDFAGCGYAVVCFW	21 (9)	<i>Streptomyces</i> sp.	Anti-HIV, antimikrobiell
Siamycin II	CLGIGSCNDFAGCGYAIVCFW	21 (9)	<i>Streptomyces</i> sp.	Anti-HIV, antimikrobiell
Klasse III				
BI-32169	GLPWGCPSPDIPGWNTPWAC	19 (9)	<i>Streptomyces</i> sp.	Glucagon- rezeptorantagonist
Klasse II				
Capistruin	GTPGFQTPDARVISRFGFN	19 (9)	<i>B. thailandensis</i>	antimikrobiell
Lariat B	GSQLVYREWVGHSNVIKPGP	20 (8)	<i>Rhodococcus</i> sp. K01-B0171	antimikrobiell
Microcin J25	GGAGHVPEYFVVGIGTPISFYG	21 (8)	<i>E. coli</i>	antimikrobiell
RES-701-1	GNWHGTAPDWWFFNYW	16 (9)	<i>Streptomyces</i> sp.	Endothelin- rezeptorantagonist

Das einzig bekannte Lassozeptid der Klasse III, BI-32169, verfügt über zwei Cysteinreste, die eine Disulfidbrücke ausbilden. Obwohl es bereits 2004 isoliert wurde, wurde erst 2010 die 3D-Struktur parallel durch NMR-spektroskopische [170] und kristallographische Methoden [171] aufgeklärt (Abbildung 11B). Die Cysteinreste befinden sich an den Positionen 6 und 19 und sind daher fast exakt gleich positioniert wie eine der Disulfidbrücken der Klasse I Lassozeptide. Der Makrolactamring wird allerdings zwischen Gly1 und Asp9 ausgebildet. Der extrazyklische Teil ist 10 aa lang und teilt sich in die oberhalb des Rings liegende 5 aa lange Schleife (10 – 14) und den unterhalb des Rings liegenden 5 aa langen Schwanz (15 – 19) (Abbildung 11B). Die Fixierung wird wiederum über die Disulfidbrücke vermittelt, obwohl auch große Reste, wie Trp17 im Schwanzbereich vorkommen, die vermutlich auch für den Strukturerehalt ausreichen würden.

Die Klasse II der Lassozeptide hat die meisten Mitglieder. Ihnen allen gemein ist das Fehlen von Disulfidbrücken und das Vorhandensein von Glycin an Position 1. Zu Beginn dieser Arbeit waren die Peptide Microcin J25 [172-174], Capistruin, welches durch *Genome Mining* in der Gruppe Marahiel isoliert wurde [175], sowie die Peptide RES-701-1 [176,177] und die Lariatine [159,178] bekannt. Die Peptide Anantin [157,158] und Propeptin [160,179] werden im gleichen Zuge genannt, da ihre Primärsequenzen auf Lassozeptide passen. Es wurde jedoch bisher keine 3D-Strukturen veröffentlicht, die das belegen könnten. Schließt man diese beiden in die Betrachtung ein, stellt man fest, dass in der Klasse II der Lassozeptide eine größere Vielfalt, was den Ringschluss angeht, herrscht. Bei Anantin liegt ein Achtring mit Aspartat, bei Microcin und den Lariatinen liegen Achtringe mit Glutamat vor. Bei RES-701-1, Propeptin und Capistruin handelt es sich um Neunringe mit Aspartat. Auch die Peptidlängen variieren aufgrund der größeren Zahl der Klassenmitglieder stärker zwischen 16 und 21 aa (siehe Tabelle 3). Beispielhaft für diese Klasse der Lassozeptide ist die Struktur von Microcin J25 gezeigt. (Abbildung 11C).

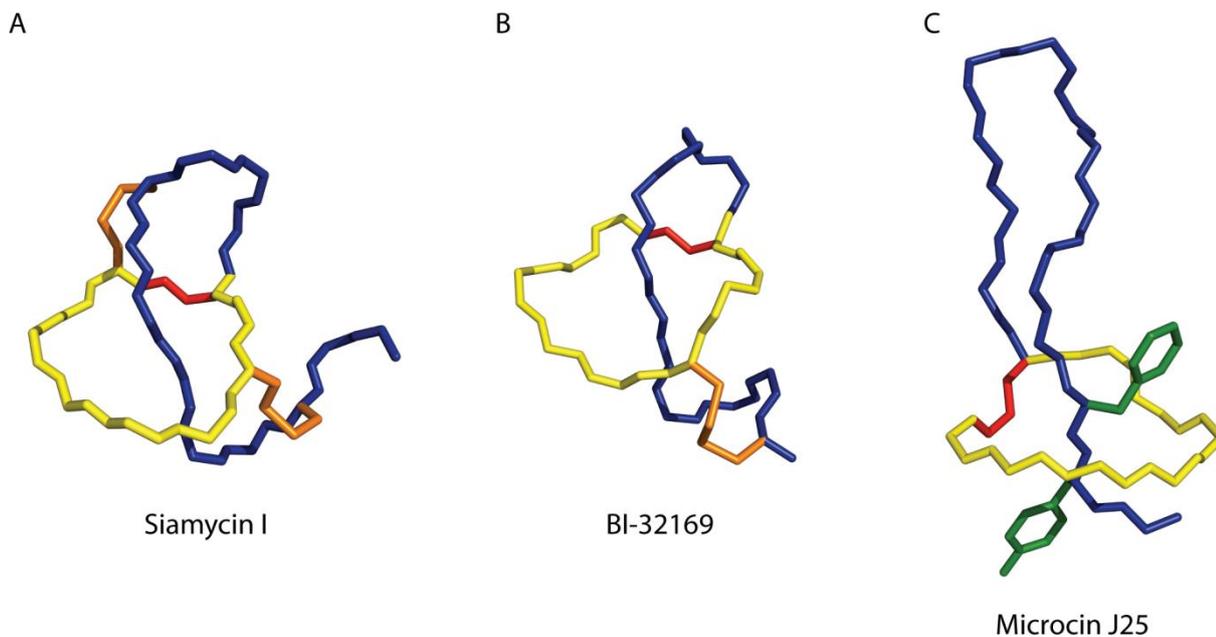


Abbildung 11 – Die drei Klassen der Lassoptide. **A** Siamycin I als Beispiel eines Klasse I Lassopeptids (PDB: 1RPB). **B** BI-32169 das bisher einzige Klasse III Lassopeptid (PDB: 3NJW). **C** Microcin J25 als Beispiel eines Klasse II Lassopeptids (PDB: 1Q71). Rückgratkatome der Makrolactamringe in Gelb, Rückgratkatome der extrazyklischen Peptidteile in Blau dargestellt; Seitenkette der ringschließenden sauren Aminosäure rot dargestellt; Disulfidbrücken-bildende Seitenketten von Cysteinen orange markiert; als Stöpsel fungierende Reste grün hervorgehoben.

1.4.2 3D-Strukturen der Klasse II Lassoptide

Da die Lassoptide der Klasse II nur durch sterische Wechselwirkungen in ihrer Faltung stabilisiert werden, sind sie vor allem strukturell sehr interessant. Für die vier Lassoptide deren 3D-Strukturen bekannt sind, liegen folgende Situationen der strukturellen Fixierung vor. Microcin J25 hat Phe19 und Tyr20 als Stöpsel auf beiden Seiten eines Achtrings mit Glutamat (Abbildung 12C und D). Diese Struktur ist so stabil, dass sie gegen chaotrope Reagenzien wie Harnstoff oder Guanidiniumchlorid unempfindlich ist und sogar das Autoklavieren übersteht [180,181].

Bei Capistruin wird Arg11 als oberer und Arg15 als unterer Stöpsel für einen Neuring mit Aspartat angesehen (Abbildung 12A und B) [175]. Bei einer Schleife von nur 5 aa Länge ist aber fraglich ob überhaupt ein oberer Stöpsel notwendig ist, da die Schleife wahrscheinlich nur unwesentlich enger gezogen werden kann. Auch Capistruin ist stabil gegen die längere Exposition bei Temperaturen von 95 °C. Im Schwanz von Capistruin befinden sich noch weitere, sterisch anspruchsvolle Reste, Phe16 und Phe18. Auch diese könnten möglicherweise die Lassofaltung stabilisieren. Im Zuge einer Mutagenesestudie, in der ein allgemeiner Alanin scan durchgeführt wurde, konnte auch gezeigt werden, dass die Phenylalaninreste an

Position 16 und 18 ausreichen um die Lassofaltung zu stabilisieren. Eine interessante Beobachtung wurde aber bei einer Variante gemacht bei der zwei große Reste im Schwanz gegen Alanin substituiert wurden (R15A_F16A). Auch diese Variante wurde als Lassozeptid produziert, war aber nicht mehr stabil gegen thermische Entfaltung bei 95 °C [182]. Dies stellte somit die erste Erzeugung eines hitzelabilen Lassozeptids aus einem nativ hitzestabilen Molekül dar. Es zeigt vor allem auch, dass Phe16, nicht aber Phe18 die Lassofaltung stabil erhalten kann. Dies ist ein erster Hinweis auf die Voraussetzungen für die Lassofaltung, da nicht nur die Größe des Rings und der Stöpsel, sondern auch deren Lage von essentieller Bedeutung ist.

Das Lassozeptid Lariat in stellt ebenfalls eine Besonderheit in struktureller Hinsicht dar. In der C-terminalen Sequenz ist keine besonders große Aminosäure vorhanden, der man direkt die Rolle des Stöpsels zuordnen kann. In der 3D-Struktur ist Ser13 die erste Aminosäure unter dem Ring, gefolgt von Asn14 (Abbildung 12E und F). Damit hat Lariat in neben RES-701-1 die kleinste bekannte Schleife oberhalb des Rings mit nur 4 aa Länge. Eigentlich sollte Serin als Stöpsel auch bei einem Achtring mit Glutamat zu klein sein um allein die Faltung zu erhalten. Diese wird vermutlich dadurch stabilisiert, dass die hydrophoben Seitenketten des Rings Leu4, Val5, Tyr6 nach unten gerichtet sind und das Loch im Ring dadurch etwas abschirmen [178]. Dies eröffnet eine weitere Perspektive auf die Lassofaltung, da weiterhin die Position der Seitenketten von Bedeutung sein kann.

Die Struktur von RES-701-1 beinhaltet einen Neunring mit Aspartat, eine Schleife von ebenfalls nur 4 aa und einen Schwanz von 3 aa Länge (Struktur nicht gezeigt). Damit ist RES-701-1 das bisher kürzeste bekannte Lassozeptid [156]. Der untere Stöpsel ist Tyr14, während Asn13 oberhalb des Rings liegt. Bei einer solch kleinen Schleife wird aber vermutlich kein oberer Stöpsel benötigt um die Beweglichkeit des Schwanzes zu unterbinden. Insgesamt ist die extrazyklische Sequenz von RES-701-1 von sterisch anspruchsvollen Resten dominiert (WFFNYYW). Leider sind an diesem Peptid keine Mutagenesestudien vorgenommen worden, so dass keine weiteren Informationen zu anderen Möglichkeiten der Stabilisierung bekannt sind. Es ist aber anzunehmen, dass Tyr15 und Trp16 ebenfalls als Stöpsel wirken könnten.

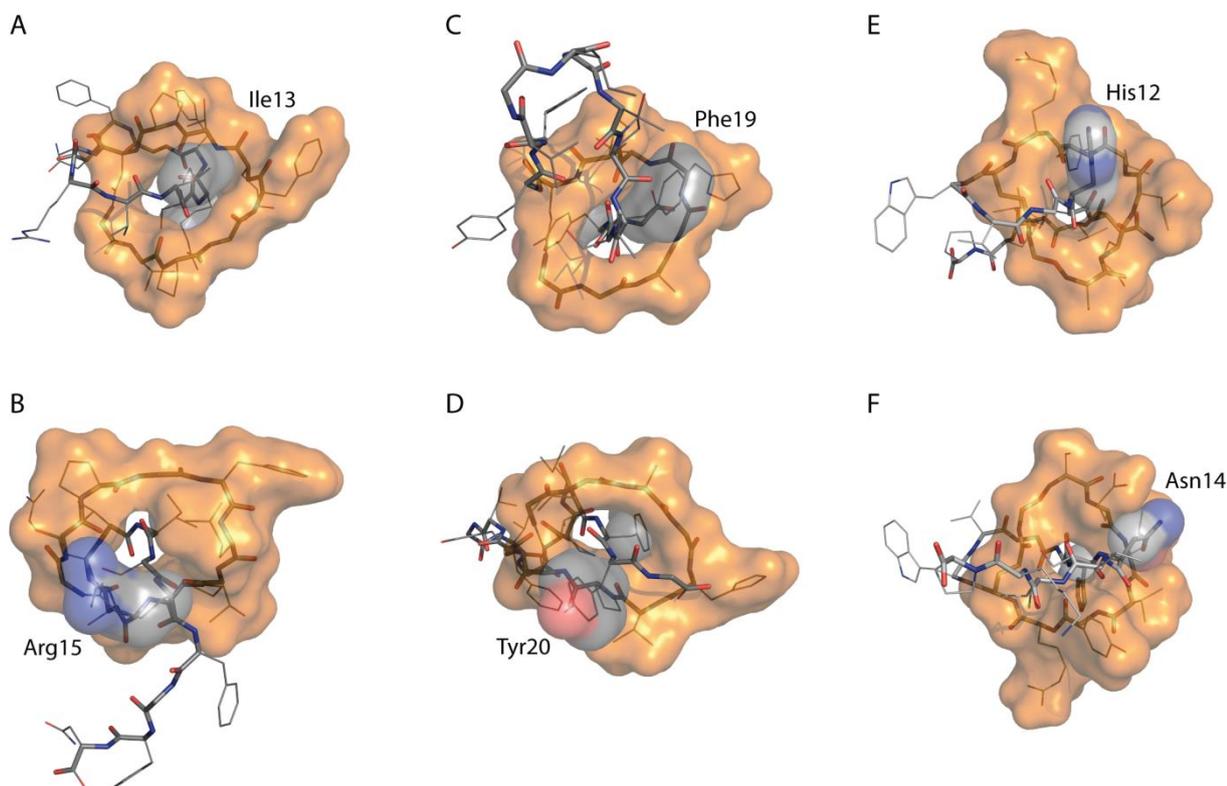


Abbildung 12 – 3D-Strukturen der Klasse II Lassopeptide. A und B Capistrin von oben und von unten, C und D Microcin J25 von oben und von unten, E und F Lariatrin von oben und von unten; Rückgrate als Sticks, Seitenketten als Linien dargestellt; Farbe nach Atomen (grau = C, rot = O, blau = N), Makrolactamringe (orange) und Stöpselseitenketten als Oberflächen dargestellt.

1.4.3 Gencluster und Biosynthese der Lassopeptide

Zu Beginn dieser Arbeit waren nur die beiden Gencluster von Microcin J25 [183] und dem durch *Genome Mining* identifizierten Capistrin [175] bekannt. Diese Gencluster enthalten nur vier für die Produktion der Lassopeptide essentielle Gene A, B, C und D (Abbildung 13A). Die Gene *mcjA* und *capA* codieren für das Vorläuferpeptid, aus dem das fertige Produkt generiert wird. Das Vorläuferpeptid besteht aus einem N-terminalen Leaderbereich und dem C-terminalen Kernpeptid. Aufgrund der wenigen bekannten Sequenzen konnte noch keine RS zugeordnet werden. Es ist durch eine Mutagenesestudie, die im Laufe dieser Arbeit veröffentlicht wurde, bisher lediglich bekannt, dass die Position -2 an der in beiden Fällen ein Threonin zu finden ist, für Microcin J25 nur gegen die sterisch ähnlich großen Reste Leu, Ile, Val, Cys, Ser und Ala ausgetauscht werden kann [184]. Für Capistrin war die Toleranz noch etwas geringer, da auch die Varianten T-2A und T-2L nicht detektiert werden konnten. Das einzige, weitere Erkennungsmerkmal im Vorläuferpeptid könnte die Aminosäure an Position 1 des Kernpeptids sein, die für alle bisher bekannten

Klasse II Lasso peptide konserviert ist, und für Capistrin und Microcin J25 nicht ausgetauscht werden konnte [182,185]. Die weiteren, an der Biosynthese beteiligten Proteinprodukte der Lasso peptide biosynthese gene cluster wurden McjB/CapB und McjC/CapC genannt. McjB und CapB zeigen in ihren C-terminalen Bereichen nur eine schwache Homologie zu eukaryotischen Transglutaminasen [186]. Es ist jedoch bekannt, dass bakterielle Homologe häufig eine Proteaseaktivität zeigen und so konnte eine mögliche katalytische Triade aus Cys-His-Asp in beiden Proteinen identifiziert werden. Der N-terminale Bereich der beiden putativen Proteasen zeigt sehr schwache Homologie zu bestimmten Adenosin-Kinasen aus Säugetieren [186]. McjC und CapC zeigen Homologien zu Asparagin-Synthetasen und verfügen über eine Bindungstasche für ATP [186]. Ihre Rolle in der Lasso peptide biosynthese ist daher vermutlich die Aktivierung der sauren Seitenkette und die Bildung des Makrolactamrings. In einer während dieser Arbeit veröffentlichten Studie konnten diese beiden vermuteten Rollen der Enzyme im Mccj25-Cluster und ihre katalytisch aktiven Reste bestätigt werden (Abbildung 13B) [187]. Zusätzlich wurde deutlich, dass die beiden Enzyme McjB und McjC voneinander abhängig und allein nicht funktionsfähig sind. Interessanterweise zeigte sich für McjB ebenfalls die Abhängigkeit von ATP, wobei jedoch nicht AMP und Pyrophosphat als Nebenprodukte entstanden wie bei McjC, sondern ADP und Phosphat. Da die Spaltung einer Peptidkette normalerweise keine Energie benötigt, stellt sich die Frage ob McjB und vor allem sein N-terminaler Bereich noch eine weitere Funktion haben. Die besondere Stabilität von Microcin J25 deutet darauf hin, dass das Peptid die Lasso faltung einnehmen muss bevor der Makrolactamzyklus geschlossen wird. Diese Vorfaltung könnte unter ATP-Verbrauch durch McjB vermittelt werden. Bei den Proteinen McjD und CapD handelt es sich um *ATP-binding-cassette* (ABC-) Transporter, die den Transport des nativen Naturstoffs aus der Zelle ermöglichen.

Im Laufe dieser Arbeit wurde der Biosynthese gene cluster des Lariatins identifiziert und untersucht [188]. Dieser besteht aus 5 ORFs, die etwas anders organisiert sind als bei Mccj25 oder Capistrin. In Anlehnung an die Empfehlungen aus einem aktuellen Review über RiPPs [22], wird die Nomenklatur der Gene und Proteine im Lariatin cluster angepasst. Das Gen *larA* codiert für das Vorläuferpeptid, gefolgt von *larC* (urspr. *larB*), *larB1* (urspr. *larC*) und *larB2* (urspr. *larD*), die für die Synthesemaschinerie codieren, und *larD* (urspr. *larE*), welches für den ABC-Transporter codiert (Abbildung 13A). Es zeigte sich durch Homologievergleiche, dass in diesem Cluster das B-Protein in zwei Teile gespalten vorliegt. Die katalytische Triade der Proteaseaktivität findet sich im B2-Protein, während das B1-Protein homolog zum N-terminalen Teil der vollständigen B-Proteine ist. Des Weiteren zeigt sich eine Homologie

dieses kleinen Proteins zu PqqD aus dem PQQ-Biosynthesegencluster. Dessen Funktion ist zwar noch ungeklärt, es wird aber vermutet, dass es an PqqE, ein Maturierungsenzym der PQQ Biosynthesemaschinerie, bindet und es stabilisiert oder seine Wechselwirkung mit dem Vorläuferpeptide PqqA verbessert [189,190]. Diese *pqqD-like* Domäne kann durch BLAST-Analyse auch in Proteinen aus anderen RiPP-Genclustern wie den Sactipeptiden gefunden werden. Auch wenn die N-terminalen Bereiche der vollständigen B-Proteine nicht direkt Homologie zu PqqD zeigen, kann angenommen werden, dass sie die gleiche Funktion einnehmen.

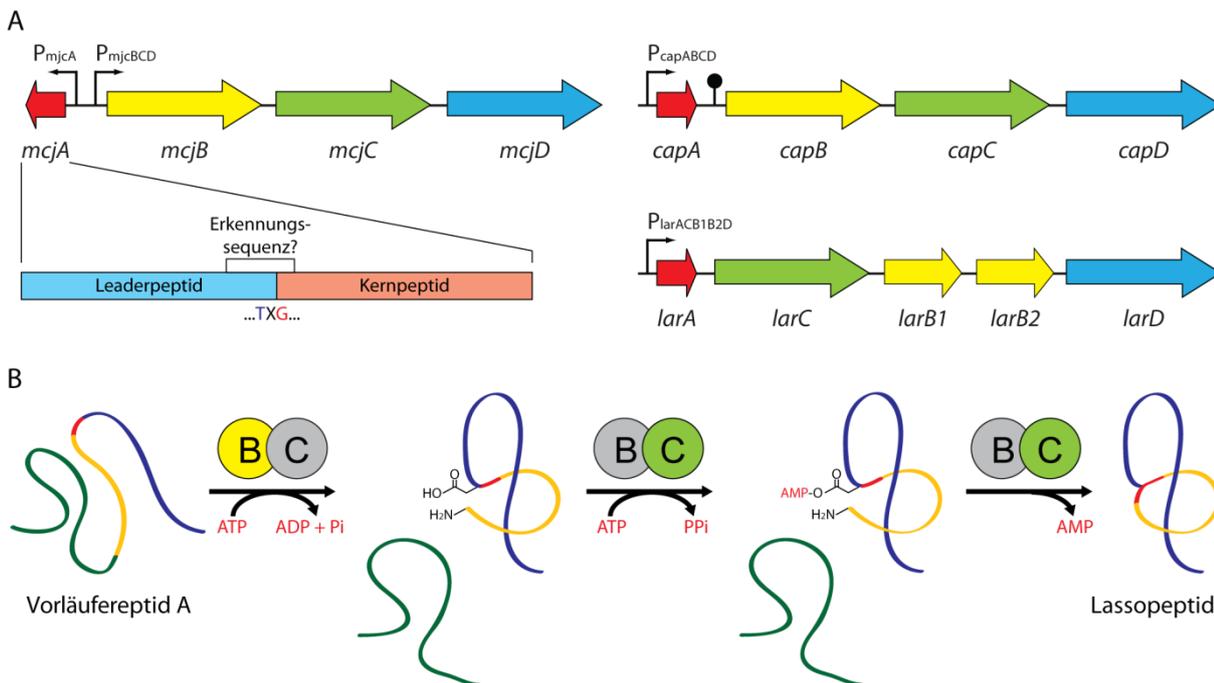


Abbildung 13 – Gencluster und Biosynthese der Lassozeptide. **A** Die drei bisher bekannten Lassozeptidbiosynthesegencluster und ihre unterschiedlichen Organisationen. Aufbau eines Lasso-Vorläuferpeptids mit der möglichen Erkennungssequenz TXG. **B** Biosynthese der Lassozeptide; aktives Enzym farblich hervorgehoben; Export durch D-Protein nicht dargestellt.

1.5 Genome Mining als Methode zur Identifikation neuer Naturstoffe

Unter *Genome Mining* wird die bioinformatische Analyse von sequenzierten genetischen Informationen in Datenbanken und deren Vergleich mit Sequenzen, deren Proteinprodukte charakterisiert oder deren Funktionen zumindest bekannt sind, verstanden. Durch diese Vergleiche können die Funktionen der Proteine, die von diesen katalysierten biochemischen Reaktionen und sogar neue Naturstoffe, die von biosynthetischen Genclustern produziert

werden, vorhergesagt werden [191-194]. Diese Methode hat seit 1995 durch die massenhafte Sequenzierung von prokaryotischen Genomen enorm an Bedeutung gewonnen [195].

Für die nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) hat sich dieser Ansatz schon sehr gut bewährt. Es stehen sehr vielseitige Werkzeuge zur Verfügung, die komplette Genome vollautomatisch innerhalb von Stunden nach NRPS-Clustern durchsuchen können (antiSMASH) [196,197]. Dabei können durch Vergleiche der Sequenzen die Domänenorganisation der Synthetasen, sowie die Spezifität der Adenylierungsdomänen mit teilweise sehr hoher Genauigkeit vorhergesagt werden. Zusätzlich können in der Nähe befindliche ORFs auf die Homologie ihres Proteinprodukts mit bekannten regulatorischen, modifizierenden oder am Export bzw. an der Aufnahme beteiligten Proteinen überprüft werden. So kann das von der NRPS produzierte Naturprodukt und eventuell sogar dessen Funktion (z.B. Siderophor) vorhergesagt werden [198].

Bei ribosomal synthetisierten, peptidischen Naturstoffen ist die Vorgehensweise ähnlich [199]. Dabei wird nach Homologen eines Modifizierungsenzyms gesucht, das möglichst charakteristisch für das jeweilige RiPP ist. Alternativ kann nach Homologen zu bekannten Vorläuferpeptiden gesucht werden. Dieser Ansatz hat jedoch zum Nachteil, dass Vorläuferpeptide in der Regel recht klein (<60 aa für prokaryotische RiPPs) sind und meist nur sehr kurze konservierte Bereiche von nur wenigen Aminosäuren besitzen.

Da es sich bei Lassozeptiden um RiPPs handelt, können diese beiden Herangehensweisen verfolgt werden. Eine Besonderheit dieser Peptidfamilie ist die sehr geringe chemische, posttranslationale Modifikation. Die Makrozyklisierung und damit die Einführung der Isopeptidbindung sorgt für einen Wasserverlust, der sich in einer Massendifferenz von 18 Da zum linearen Peptid bemerkbar macht. Dadurch sind Lassozeptide sehr einfach massenspektrometrisch nachweisbar. In einem initialen *Genome Mining* in unserer Arbeitsgruppe in dem nach Homologen von McjB gesucht wurde, konnte der Capistruin-Gencluster gefunden werden. Dieser wurde auf seine Funktionalität überprüft und der Naturstoff wurde aus dem nativen Produzentenstamm isoliert und seine 3D-Struktur NMR-spektroskopisch aufgeklärt [175]. Dies bestätigt nochmals, dass das *Genome Mining* eine mächtige Methode darstellt um neue Naturstoffe und speziell RiPPs zu finden.

2. Aufgabenstellung

Naturstoffe stellen eine reichhaltige Quelle potentieller pharmakologisch wirksamer Substanzen dar. Ihre chemische und strukturelle Diversität verdanken sie ihren teilweise komplexen Biosynthesemaschinerien, die verschiedenste Reaktionen chemo-, regio- und stereoselektiv katalysieren können. Die Suche nach neuen Naturstoffen, ihre Charakterisierung auf mögliche Bioaktivitäten sowie das Verständnis ihrer Biosynthesemaschinerien ist ein wesentliches Ziel der biochemischen Forschung.

Ziel dieser Arbeit sollte zunächst sein, erneut ein *Genome Mining* auf breiter Basis mit alternativen Algorithmen durchzuführen um möglichst viele potentielle Lasso-peptidbiosynthese-egencluster zu identifizieren. Unter diesen sollten besonders geeignete herausgesucht werden um durch die Isolierung und Charakterisierung von neuen Lasso-peptiden die Wirksamkeit des *Genome Mining* Ansatzes zu bestätigen. Bei den in ihrer Funktionalität bestätigten Cluster sollte wenn möglich auch die Biosynthesemaschinerie untersucht werden. Im weiteren Verlauf sollten ungewöhnliche Cluster untersucht werden, die nicht den gängigen Kriterien entsprechen um so neuartige Lasso-peptide zu isolieren, zu charakterisieren und ihre Biomachinerien zu beleuchten.

3. Materialien

3.1 Geräte

Tabelle 4 – Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller und Bezeichnung
Autoklav	Fedegari Autoclavi SPA FVA3/A1
Analysewaage	Sartorius
Brutschrank	Köttermann 2736
Dokumentation von DNA-Agarosegelen und SDS-Polyacrylamidgelen	Cabertech Kamera CS 1 Mitsubishi Thermodrucker video copy processor
Elektrophoresekammern	Agarose-Gelkammer (Feinmechanik, Phillips-Universität Marburg)
Elektroporations-Pulser	Bio-Rad Gene Pulser und Pulse-Controller
HPLC-System (präparativ)	Agilent 1100 HPLC-Serie: DAD-Detektor, Pumpe, Fraktionskollektor
HPLC-MS-System (hochauflösend)	Thermo Fisher Scientific LTQ-FT Agilent 1100 HPLC-System: Vakuumentgaser, DAD-Detektor, Quaternäre Pumpe, Autosampler
HPLC-MS-System	Hewlett-Packard MSD 1100 Agilent 1260 HPLC-System: Vakuumentgaser, DAD-Detektor, Quaternäre Pumpe, Autosampler, Fraktionskollektor
HPLC-Säulen	C18HTec-Säule (250 x 21 mm) Nucleodur C18ec-Säule (250 x 5 mm) Synergi Phenomenex 4µ RP column (250 x 2 mm) Nucleodur C18ec-Säule (125 x 2 mm) CC Nucleosil 300-8 C18-Säule (125 x 2 mm)
Konzentrator	Eppendorf concentrator 5301
Luftschüttler	infors Multitron II, New Brunswick Scientific Innova 4300 Incubator Shaker
Lyophilie	Christ Gefriertrocknungsanlage ALPHA 2-4 LSC
Nanodrop-Photometer	PEQLab ND-1000

Gerät	Hersteller und Bezeichnung
NMR-Spektrometer	Bruker Avance 600
pH-Meter	Schott CG 840
Photometer	Pharmacia Biotech Ultrospec 3100 pro
Pipetten	Research Pipettes 2,5 µL, 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1 mL, 5 mL
Reinstwasseranlage	Seral Seralpur Pro90CN
SDS-PAGE-Kammer	Mini-Protean 3 (Bio-Rad)
Thermocycler	Mastercycler personal (Eppendorf)
Vortexer	Scientific industries Vortex Genie 2
Zentrifugen	Heraeus Biofuge pico Sorvall RC 26 plus (Rotoren SS34, SLA3000) Sorvall RC 5B Plus Kendro Megafuge 1.0R Kendro Minifuge RF Eppendorf Centrifuge 5415D Eppendorf Centrifuge 5810R (Rotor A-4-62)

3.2 Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5 – Verwendete Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Hersteller (Vertriebsort)	Produkte
Agilent Technologies (Böblingen, Deutschland)	2,5-Dihydroxybenzoesäure, <i>E. coli</i> Arctic Express
Amersham Biosciences	IPTG, Hefeextrakt, Coomassie Brilliant Blue G und R250, Agar Nr. 1
AppliChem (Darmstadt, Deutschland)	Kanamycin
Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland)	<i>Asticcacaulis excentricus</i> CB 48 <i>Caulobacter</i> sp. K31
Eppendorf (Hamburg, Deutschland)	1,5 mL und 2,0 mL Reaktionsgefäße
Eurogentech (Seraing, Belgien)	Agarose, Elektroporationsküvetten
GATC (Konstanz, Deutschland)	DNA-Sequenzierung
Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)	<i>E. coli</i> BL21(DE3), <i>E. coli</i> TOP10
Millipore (Billerica, MA, USA)	Dialysemembran (0,025 µm Porengröße)

Hersteller (Vertriebsort)	Produkte
New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)	Phusion DNA-Polymerase, Desoxyribonukleotide, 1 kb-DNA-Ladder, Proteinmarker, Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Liagse
Novagen	pET28a(+), pET41a(+)
Promega	Trypsin, Chymotrypsin
Qiagen (Hilden, Deutschland)	QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick PCR Purification Kit
Roth	Acrylamid, β -Mercaptoethanol, Ethidiumbromid
Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)	Pipettenspitzen, Falcon Tubes, Mikroreaktoren
Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)	Grundchemikalien, Amberlite XAD16, Oligonukleotide, Carboxypeptidase Y
VWR (Darmstadt, Deutschland)	Sterilfilter (0,20 μ m und 0,45 μ m)

3.3 Vektoren

3.3.1 pET28a(+)

Der pET28a(+) Vektor wurde für die Expression von Einzelproteinen aus den Lasso-peptidbiosyntheseclustern benutzt. Der im Vektor vorhandene N- und C-terminale His₆-Tag, ermöglicht die Reinigung über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Durch Mutagenese wurde dem Vektor aber auch ein Strep2-Tag verliehen, der die Reinigung über Strep-Tactin-Affinitätschromatographie ermöglicht. Der Expressionsbereich steht unter Kontrolle eines T7 Promoters. Ebenfalls im Vektor vorhanden sind das Gen *lacI*, das für den Lac-Repressor codiert, sowie ein Resistenzgen gegen Kanamycin (50 μ g / mL).

3.3.2 pET41a(+)

Für die heterologe Expression der Lasso-peptidbiosynthesecluster wurde der pET41a(+) Vektor verwendet. Dieser verfügt über einen N-terminalen GST (Glutathion-S-transferase)-Tag, der eine Reinigung über Glutathion-Affinitätschromatographie ermöglicht und die Löslichkeit vieler Proteine erhöhen kann. Das zur Klonierung vorgesehene ORF enthält eine

Schnittstelle für die Protease Thrombin, welche benutzt werden kann, um nach der Expression das Zielprotein von GST abzuspalten. Zusätzlich sind noch N- und C-terminale His₆-Tags auf dem Plasmid vorhanden. Für die Expression der kompletten Gencluster wurden allerdings *NdeI*-Schnittstellen verwendet, die den GST- und His₆-Tag entfernen. Des Weiteren verfügt der Vektor über das Gen für den Lac-Repressor, sowie ein Resistenzgen gegen Kanamycin (50 µg / mL).

3.4 Oligonukleotidprimer

Durch die vielen generierten Mutanten ist die Anzahl der verwendeten Oligonukleotidprimer sehr groß. Beispielhaft sollen die zur Klonierung der Cluster verwendeten Primer, sowie jeweils ein Set Primer für *round-the-horn* und SLIM Mutagenese aufgelistet werden.

Tabelle 6 – Ausgewählte Oligonukleotidprimer. Eingebaute Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen. Durch Mutagenese neu eingefügte Sequenzen sind kursiv geschrieben. Die neu eingefügte ribosomale Bindestelle (rbs) ist fett markiert.

Primernamen	Zweck	Sequenz
FW_Primer_0830A_NdeI	Klonierung Astex222x-Cluster	GGATTAC <u>CAT ATG</u> CAT ACC CCC ATT ATT TCG GAA ACG GTC
RV_Primer_0832C_XhoI	Klonierung Astex222x-Cluster	ATAT <u>CTC GAG</u> TTA GGT CCG CGG ACG GCG C
CK31_198x_A1_NdeI_FP	Klonierung CK31_198x-Cluster	GGATTAC <u>CAT ATG</u> ACC CCG ATC CAA TCC AAG TTC TGC CTT CTG
CK31_198x_C_XhoI_RP	Klonierung CK31_198x-Cluster	ATAT <u>CTC GAG</u> TCA TGA GAC CCT GAG CTT GGC TTC CCA GG
CK31_2238_A1_NdeI_FP	Klonierung CK31_22xx-Cluster	GGATTAC <u>CAT ATG</u> AAT ACG CTC AAG ACC CGG CTG ATC CG
CK31_2241_C_XhoI_RP	Klonierung CK31_22xx-Cluster	ATAT <u>CTC GAG</u> TTA GGC GCC GCG CGC TTC CCA G
K31_198xB_SLIM_FPS	SLIM-Basis FP für rbs-Insertion	CTT TGG CTC GCC CAG GAC GTC CAT GC

Primername	Zweck	Sequenz
K31_198xB_SLIM_FPL	SLIM-Mutations FP für rbs-Insertion	AGAGGAGAAATTAACC ATG CCC CTT TGG CTC GCC CAG GAC GTC CAT GC
K31_198xA2_SLIM_RPS	SLIM-Basis RP für rbs-Insertion	TTA GGG CCA GTA GGT CTG CGA GCT CAT G
K31_198xA2_SLIM_RPL	SLIM-Mutations RP für rbs-Insertion	GGG CAT GGTTAATTTCTCCTCT TTA GGG CCA GTA GGT CTG CGA GCT CAT G
198xLeaderDel1_RtH_RP	<i>round-the-horn</i> RP für Deletion	CAT ATG TAT ATC TCC TTC TTA AAG TTA AAC AAA ATT ATT TCT AGA GGG GAA TTG
198xLeaderDel1_RtH_FP	<i>round-the-horn</i> FP für Deletion	CTG CGG CTC ATC CGT GTC GGG CG

3.5 Mikroorganismen

3.5.1 *E. coli* TOP 10

Der *E. coli* Stamm TOP10 (Invitrogen) wurde routinemäßig für alle Klonierungen, Mutagenesen und zur Amplifizierung von Plasmid-DNA für Sequenzierungen verwendet.

Genotyp: *E. coli* F- mcrA Δ (mrr_hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1
deoR araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) enaA1 nupG

3.5.2 *E. coli* BL21 (DE3)

Dieser Stamm wurde zur Expression von Einzelgen- und Clusterkonstrukten verwendet. Er ist ein effizientes Expressionssystem, da ihm die OmpT- und Lon-Protease fehlen. Des Weiteren ist ein Gen für die T7-RNA-Polymerase nach dem *lacUV5* auf dem Chromosom inseriert worden. Dies ermöglicht die IPTG induzierte Expression von unter T7-Promotor-Kontrolle stehenden Genen.

Genotyp: *E. coli* F- ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])

3.5.3 *E. coli* ArcticExpress (DE3)

Dieser Expressionsstamm wurde speziell für die Expression von schwer löslichen Proteinen designt. Statt der üblichen Standardtemperaturen wird hier bei 12 °C exprimiert um eine möglichst langsame Expression zu erreichen, die die korrekte Faltung von Proteinen verbessern kann. Dazu trägt der Stamm statt der *E. coli* Chaperone GroEL/ES, welche bei niedrigen Temperaturen nur sehr schlechte Aktivität zeigen, zwei Proteine aus *Oleispira antarctica*: Cpn10 und Cpn60.

3.5.4 *Asticcacaulis excentricus* CB 48

Asticcacaulis excentricus CB 48 (ATCC 15261) ist ein aerobes, gram-negatives, in Süßwasser vorkommendes Alphaproteobakterium, das erstmals 1964 beschrieben wurde [200]. Sein Lebenszyklus ist sehr ähnlich zu den nahe verwandten *Caulobacter* Spezies. Unterschiede zu den *Caulobacter* sind das Flagellum in der motilen Phase sowie der Stalk in der Stationären Phase, welche an einem Ende der stäbchenförmigen Zelle, aber nicht mittig angeordnet sind. Das adhäsive Material zur Anheftung an Oberflächen wird auch nicht an der Stelle des Stalks sekretiert sondern an den Zellpolen.

3.5.5 *Caulobacter* sp. K31

Caulobacter sp. K31 ist ein aerobes, gram-negatives, in Süßwasser vorkommendes Alphaproteobakterium. Es dient unter anderem als Modellorganismus für die Zelldifferenzierung aufgrund seines ungewöhnlichen Lebenszyklus mit einer asymmetrischen Zellteilung. Ein frei im Wasser vorkommender *Caulobacter* besitzt ein an einem Zellpol mittig befindliches Flagellum zur Fortbewegung. Diese auch Schwärmerzelle genannte Form ist nicht in der Lage sich fortzupflanzen. Hierzu muss die Zelle sich durch die Sekretion von adhäsivem Material und die Ausbildung eines Stiels an eine Oberfläche anheften. In dieser Stielzellenform ist das Bakterium dann in der Lage sich zu teilen, wobei die Tochterzelle genau am vom Stiel aus gegenüberliegenden Zellpol entsteht. Diese Tochterzelle besitzt

wiederum ein Flagellum und kann sich frei im Medium verbreiten, bevor sie einen neuen Zyklus beginnt.

3.6 Kulturmedien

Die für die Aufzucht und Kultivierung der Bakterien verwendeten Medien wurden standardmäßig für 20 min bei 121 °C und 1,5 bar autoklaviert. Für die Herstellung von Festmedium wurden vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugegeben. Falls Selektionsantibiotika Verwendung fanden, wurden diese nach Abkühlen des Mediums ($T < 55\text{ °C}$) als sterilfiltrierte Stammlösungen in der folgenden Konzentration zugegeben: Kanamycin 50 µg/mL.

3.6.1 LB-Medium

LB-Medium wurde als Standardmedium zur Kultivierung von *E. coli* eingesetzt.

Bactotrypton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
Natriumchlorid	5 g/L

3.6.2 PYE-Medium

PYE-Medium wurde als Vollmedium zur Kultivierung von *A. excentricus* und *C. sp. K31* eingesetzt.

Peptone	2,0 g/L
Hefeextrakt	1,0 g/L
Magnesiumchlorid	0,2 g/L

3.6.3 PYEGR-Medium

PYEGR-Medium ist eine modifizierte Variante des PYE Mediums. Es wurde als Vollmedium zur Kultivierung von *A. excentricus* und *C. sp.* K31 eingesetzt. Die mit einem Stern gekennzeichneten sterilfiltrierten Stammlösungen wurden erst nach dem Autoklavieren zugegeben.

Peptone	2,0 g/L
Hefeextrakt	1,0 g/L
Magnesiumsulfatlösung (2 M)	0,8 mL/L
Glucoselösung (40 % w/v)*	2,5 mL/L
Riboflavinlösung (2 mg/mL)*	0,2 mL/L

3.6.4 M9-Medium

M9-Medium wurde als Screeningmedium für *A. excentricus* und als Standardmedium der heterologen Lasso-peptidfermentationen eingesetzt. Die mit einem Stern gekennzeichneten sterilfiltrierten Stammlösungen wurden erst nach dem Autoklavieren zugegeben.

Dinatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat	17,1 g/L
Kaliumdihydrogenphosphat	3,0 g/L
Ammoniumchlorid	1,0 g/L
Natriumchlorid	0,5 g/L
Magnesiumsulfatlösung (2 M)	1,0 mL/L
Calciumchloridlösung (0,5 M)	0,2 mL/L
Glucoselösung (40 % w/v)*	10,0 mL/L
Vitamin Mix (500x)*	0,2 mL/L

Der 500x M9-Vitaminmix wurde anhand der folgenden Auflistung zubereitet. Anschließend wurden 10 M NaOH solange zugegeben, bis alle Komponenten gelöst waren. Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Biotin	0,2 g
Cholinchlorid	1,0 g
Dinatrium-Adenosin-5 ['] -triphosphat	0,3 g
Folsäure	1,0 g
Myo-Inositol	2,0 g
Nicotinamid	1,0 g
Panthothensäure	1,0 g
Pyridoxalhydrochlorid	1,0 g
Riboflavin	0,1 g
Thiamin	1,0 g
ddH ₂ O	ad 300 mL

3.6.5 M20-Medium

M20-Medium wurde als Screeningmedium für *A. excentricus* eingesetzt. Die mit einem Stern gekennzeichneten steriltfiltrierten Stammlösungen wurden erst nach dem Autoklavieren zugegeben.

L-Glutaminsäure	20,0 g/L
Dinatriumhydrogenphosphat Dodecahydrat	20,0 g/L
Natriumcitrat	1,0 g/L
Kaliumchlorid	0,5 g/L
Natriumsulfat	0,5 g/L
L-Alanin	0,2 g/L
Eisensulfat Heptahydrat	0,01 g/L
Magnesiumchloridlösung (0,5 M)	2,0 mL/L
Calciumchloridlösung (0,5 M)	103 µL/L
Mangansulfatlösung (0,1 M)	346 µL/L
Thiaminlösung (10 mg/L)*	0,2 mL/L
Biotinlösung (10 mg/L)*	0,2 mL/L

3.6.6 M63-Medium

M63-Medium wurde als Screeningmedium für *A. excentricus* eingesetzt. Die mit einem Stern gekennzeichneten sterilfiltrierten Stammlösungen wurden erst nach dem Autoklavieren zugegeben.

Kaliumdihydrogenphosphat	13,6 g/L
Ammoniumsulfat	2,0 g/L
Bactotrypton	1,0 g/L
Magnesiumsulfatlösung (2 M)	1,0 mL/L
Glucoselösung (40 % w/v)*	5,0 mL/L
Thiaminlösung (10 mg/L)*	0,2 mL/L
Biotinlösung (10 mg/L)*	0,2 mL/L

4. Methoden

4.1 Bioinformatische Methoden

4.1.1 Identifikation neuer Lasso-peptidbiosynthese-egencluster mittels PSI-BLAST

Als Ausgangspunkt der bioinformatischen Studie wurde die Sequenz von McjB (*accession number* YP_007443297.1) aus dem Microcin J25 Biosynthesecluster gewählt. Auf diese Proteinsequenz wurde das *position-specific iterated basic local alignment search tool* (PSI-BLAST) angewendet, welches eine Homologiesuche in der Datenbank startet und die Treffer der ersten Runde als Ausgangspunkte für einen weiteren Suchdurchlauf auf Basis einer *position-specific scoring matrix* (PSSM) benutzt. Die dabei benutzten generellen Parameter waren 500 als maximale Anzahl der Zielsequenzen, 10 als Erwartungsschwellenwert und 3 als Wortgröße. Die benutzte Alignmentmatrix war BLOSUM62 mit den *gap*-Parametern 11 für das Öffnen und 1 für die Erweiterung einer Lücke. Als PSI-BLAST Schwellenwert für die Verwendung eines Treffers zur Erstellung der PSSM wurde 0,005 gewählt. Mit diesen Einstellungen wurde der PSI-BLAST 4 mal wiederholt und lieferte die maximale Anzahl an Resultaten.

Zu jedem identifizierten B-Homolog wurde der Datenbankeintrag angesehen und die direkt umgebenden Gene wurden auf ihre Zugehörigkeit zu Lasso-peptidgenclustern untersucht. Dabei wurde der einfach Protein-BLAST verwendet. Konnte ein Gen als Asparaginsynthetase-Homolog identifiziert werden, wurde dies als C-Protein klassifiziert. Wurden Homologien zu ABC-Transport-Proteinen oder anderen Membrantransportern gefunden, wurde eine Einstufung als D-Protein vorgenommen. Wurde ein kleines Protein von ca. 80 – 100 aa Länge mit Homologie zum PqqD-Protein aus der PQQ-Biosynthesemaschinerie gefunden, wurde es als Protein B1 eingeteilt. Kleine Proteine von 40 bis 70 aa Länge wurden auf ihre Eignung als mögliches Vorläuferpeptid untersucht. Konnte kein solches Protein in den annotierten Sequenzen gefunden werden, wurden die *upstream* und *downstream* gelegenen sowie intergenetischen Regionen der Lasso-cluster-assozierten Gene auf das Vorhandensein eines kleinen ORFs untersucht, dass die Spezifikationen für einen *precursor* erfüllt. Dafür wurde der ORF Finder von NCBI benutzt, der in einer gegebenen Sequenz alle sechs möglichen Leserastern untersucht und deren Sequenzen auflistet. Diese Sequenzen wurden von Hand auf die Tauglichkeit als Vorläuferpeptid

überprüft. Andere in der Nähe befindlichen Gene wurden per BLAST auf ihre mögliche Funktion hin überprüft. Für manche dieser Gene wurden Homologien zu HPr-Kinasen oder Sulfotransferasen gefunden, welche dann die entsprechende Zuordnung erhielten. Proteine, für die keine Homologe oder ebenfalls nur hypothetische Proteine ohne bekannte Funktion durch BLAST gefunden werden konnten, wurden als Proteine unbekannter Funktion klassifiziert. Die Grenzen eines Lassoclusters wurden nach unterschiedlichen Gesichtspunkten festgelegt. Dabei spielte die Orientierung der Gene, die Größe des intergenetischen Bereiches, das Vorhandensein von Regulatorproteinen oder bekannten Proteinen z.B. aus dem Primärmetabolismus eine Rolle.

4.1.2 Erstellung von Protein Alignments

Die Erstellung von Protein-Alignments stellt ein nützliches Werkzeug dar um Sequenzen miteinander zu vergleichen, konservierte und variable Bereiche in Proteinen zu identifizieren oder die Verwandtschaft von Proteinsequenzen durch Erzeugung von phylogenetischen Bäumen abzubilden.

Die in dieser Arbeit gezeigten Protein- und Peptid-Alignments wurden mit dem Tool ClustalW2 von EMBL-EBI erstellt [201,202]. Dafür wurden in den meisten Fällen folgende Parameter gewählt. Für das paarweise Alignment wurde die Gonnet-Matrix mit *gap*-Parametern 10 für das Öffnen und 0,1 für die Erweiterung der Lücke verwendet. Für das multiple Sequenzalignment wurde ebenfalls die Gonnet-Matrix mit den Parametern 10 für *gap-open*, 0,2 für *gap extension* und 5 für *gap-distance* benutzt. Für das Alignment von Vorläuferpeptiden wurden diese Parameter teilweise angepasst, z.B. durch Erhöhung des *gap-open* Wertes. Teilweise wurden auch Leader- und Kernpeptide getrennt einem Alignment unterzogen und anschließend zusammengefügt.

4.1.3 Identifikation von konservierten Motiven mit dem MEME Algorithmus

Hat man eine gewisse Anzahl an Proteinsequenzen bekannter Funktion zur Verfügung, kann es sinnvoll sein diese nach konservierten Motiven zu durchsuchen, da diese Motive meist mit einer sehr spezifischen Funktion assoziiert sind.

Für die Identifikation der Motive in den B-Proteinen und den Vorläuferpeptiden wurde die *Multiple EM for Motif Elicitation* (MEME)-Suite von NBCR verwendet [203]. Dabei wurden die Parameter wie folgt eingestellt. Für das erwartete Auftreten der Motive pro Sequenz

wurde 0 oder 1 gewählt. Die minimale Größe des Motivs wurde auf 6, die maximale auf 50 aa gesetzt. Die Maximale Anzahl an Motiven wurde für die jeweilige Suche entsprechend angepasst, aber mindestens auf 5 gesetzt.

4.2 Molekularbiologische Methoden

Für die grundlegenden molekularbiologischen Methoden wie Präparation chromosomaler DNA, Präparation plasmidischer DNA nach Birnboim und Doly [204], PCR, DNA-Gelelektrophorese, DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen, Photometrische DNA Konzentrationsbestimmung, Ligation mit T4 DNA Ligase, Dialyse von DNA auf Membranen, Elektroporation von kompetenten *E. coli* Zellen und die DNA-Sequenzierung nach Sanger sei an dieser Stelle auf die einschlägige Literatur, Fachbücher, Vorschriften der Enzymhersteller sowie meine Diplomarbeit verwiesen.

4.2.1 Präparation plasmidischer DNA mit Sigma-Aldrich Miniprep Kit

Bei der Plasmidpräparation mit dem GenElute™ Miniprep Kit von Sigma-Aldrich wird ähnlich verfahren wie bei der Vorschrift von Birnboim und Doly. Es erfolgt die Resuspendierung des Zellpellets einer *E. coli* Übernachtskultur mit einem Resuspendierungspuffer. Die alkalische Lyse erfolgt für 5 min durch Zugabe eines Lysepuffers, der vermutlich NaOH und SDS enthält. Die Neutralisation erfolgt durch Zugabe des Neutralisations- und Bindepuffers. Die ausgefällten Proteine, chromosomale DNA und Zelltrümmer werden abzentrifugiert (10 min, 13000 rpm) und der Überstand auf die Silikagelsäulen aufgetragen. Es wird für 30 sec bei 10000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend erfolgen zwei Waschstreps mit Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2, der Ethanol enthält. Nach dem zweiten Waschen wird erneut zentrifugiert um den Ethanol restlos von der Säule zu entfernen. Anschließend wird das Säulenmaterial zusätzlich für 5 min an der Luft getrocknet. Erst dann werden 50 bis 100 µL Elutionspuffer, je nach gewünschter DNA-Konzentration, auf die Säule gegeben, kurz einwirken gelassen und in ein neues Eppendorfgefäß abzentrifugiert. Die so erhaltene Plasmid-DNA hat eine hohe Reinheit und liegt in einer Konzentration von 30 – 100 ng/µL vor.

4.2.2 Mutagenese mit „round-the-horn“ bzw. „inverse“ PCR

Da sich in früheren Arbeiten gewisse Probleme mit der quick-change-Methode ergeben haben wurde auf eine andere Methode zur Erzeugung von Mutanten ausgewichen. Diese sog. „round-the-horn“ PCR oder auch „inverse“ PCR amplifiziert das vollständige Plasmid [205]. Die dabei eingesetzten Primer tragen eine 5'-Phosphorylierung, damit die Enden anschließend in einer *blunt-end* Ligation verknüpft werden können. Die Methode eignet sich vor allem für besonders lange Sequenzen, die ausgetauscht werden sollen, also z.B. für die Insertion von Tags, den Austausch von ganzen Peptidsequenzen oder die Inkorporation von zwei Mutationen gleichzeitig, die einen Abstand von bis zu 50 Nukleotiden haben. Die Methode ist für Punktmutationen, Insertionen und Deletionen gleichermaßen geeignet.

Die PCR wird nach Standardprotokoll mit beiden Primern durchgeführt. Anschließend erfolgt eine präparative Gelelektrophorese und Reinigung des DNA-Fragments. Vor der Eigenligation muss aber noch der DpnI-Verdau erfolgen um nicht abgetrennte Templat-DNA zu entfernen. Die *blunt-end* Ligation wird im 10 oder 20 µL Maßstab mit DNA-Mengen von mindestens 150 ng durchgeführt. Nach der anschließenden Dialyse erfolgt die Elektroporation mit der gesamten DNA.



Abbildung 14 – Schematische Darstellung der inverse PCR Mutagenese. Der blaue Bereich der Primer ist vollständig komplementär zum Vektor, der rote und oder grüne Bereich enthält Mutationen.

4.2.3 Site-directed ligation-independent mutagenesis

Da sich auch bei der Mutagenese mittels „inverse“ PCR manchmal Schwierigkeiten ergeben und die Methode aufgrund der benötigten DNA-Reinigung etwas zeitaufwendiger ist, wurde eine weitere Mutagenesestrategie angewendet. Diese als *site-directed ligation-independent mutagenesis* oder kurz SLIM bezeichnete Methode ist sehr schnell und effektiv [206,207]. Hierbei werden zwei verschiedene PCRs mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren angesetzt.

In einer PCR befindet sich immer ein Basisprimer z.B. *forward* und ein Mutationsprimer in diesem Fall *reverse*. Der Mutationsprimer enthält im 5'-Bereich die gewünschte Mutation und ist im 3'-Bereich identisch mit dem jeweiligen Basisprimer. Dieser 5'-Bereich sollte zwischen 18 und 30 Nukleotiden lang sein und ist komplementär zu dem anderen Mutageneseprimer. Bei den PCRs entstehen also Produkte, die, wenn man nur den codierenden Strang betrachtet, die mutierte Sequenz am 5' bzw. 3'-Ende tragen. Nach dem DpnI-Verdau werden die PCRs in einer anschließenden Hybridisierungsreaktion gemischt und erzeugen Hybridprodukte mit einzelsträngigen Überhängen. Diese Hybridprodukte können sich zu ringförmigen DNA-Molekülen mit Einzelstrangbrüchen organisieren, so dass sie direkt transformierbar sind. Die Vorteile dieser Methode liegen in der Schnelligkeit, da keine Reinigung der PCR erfolgen muss, und Zuverlässigkeit, da die Trefferrate der Klone sehr hoch ist. Ein Nachteil ist die Beschränkung auf Sequenzen von max. 30 Nukleotiden Länge, die auf einmal ausgetauscht werden können. Außerdem müssen im Gegensatz zur „inverse“ PCR zwei PCRs zum Laufen gebracht werden.

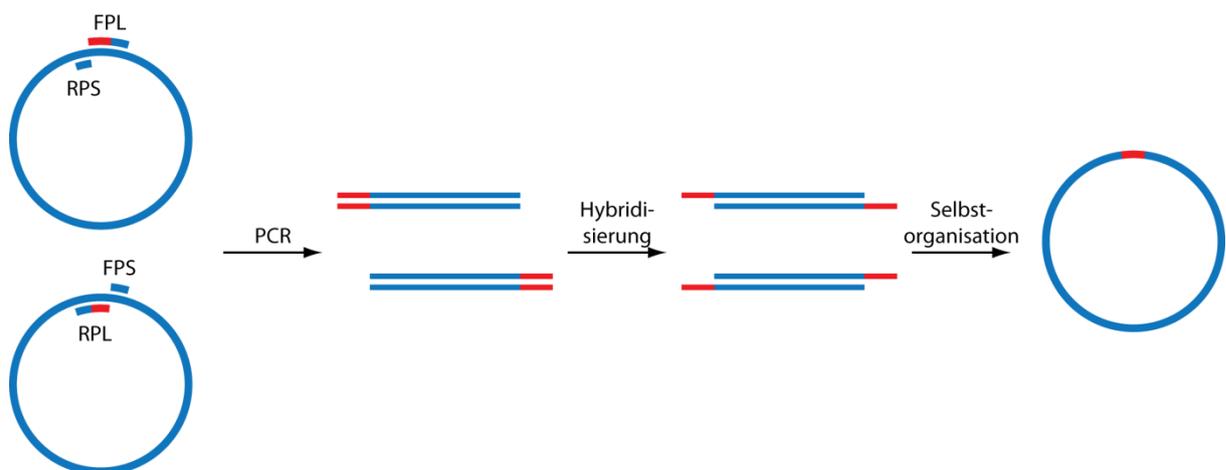


Abbildung 15 – Schematische Darstellung der SLIM Methode. Der blaue Bereich der Primer ist vollständig komplementär zum Vektor, der rote Bereich enthält Mutationen. Das mutierte Plasmid rechts trägt Einzelstrangbrüche

Die PCRs werden nach Standardprotokoll mit jeweils einem Basis- und einem Mutageneseprimer durchgeführt. Anschließend erfolgt direkt der DpnI-Verdau. Bei der Hybridisierungsreaktion werden je 10 µL der PCR-Produkte, 10 µL Hybridisierungspuffer und 20 µL Wasser gemischt. Die Hybridisierungsreaktion findet in einem Eppendorf Thermocycler mit dem Programm laut Tabelle 7 statt. Nach der anschließenden Dialyse kann direkt mit ca. 5 µL Dialysat elektroporiert werden.

Tabelle 7 – PCR-Programm der SLIM Hybridisierungsreaktion

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	99 °C	3 min	1x
Hybridisierung	65 °C	5 min	3x
Hybridisierung	30 °C	40 min	3x
Lagerung	4 °C	halten	

4.3 Proteinchemische Methoden

4.3.1 Heterologe Produktion des Astexin-1 und seiner Varianten

Ein mit dem Plasmid Astex222xABC_pET41a transformierter *E. coli* BL21(DE3) Stamm wurde über Nacht in 50 mL LB-Medium mit 50 µg/mL Kanamycin bei 37 °C und 250 rpm wachsen gelassen. Mit dieser Vorkultur wurden je 600 mL M9-Minimalmedium mit Vitaminmix und 50 µg/mL Kanamycin in einem 2 L Kulturkolben mit Schikanen auf eine OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert. Diese Kulturkolben wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 bei 37 °C bei 230 rpm wachsen gelassen und dann mit IPTG in einer Endkonzentration von 0,1 mmol/L induziert. Die Fermentation wurde für ca. 18 h über Nacht fortgesetzt. Die Kulturen wurden anschließend bei 4 °C für 20 min bei 6000 rpm abzentrifugiert. Die Pellets wurden entweder direkt extrahiert oder für die spätere Verwendung bei -20 °C gelagert.

Im Falle der mutierten Varianten änderte sich nur der Größenansatz. Diese wurden in dreifacher Ausführung im 100 mL Maßstab in 250 mL Kolben fermentiert.

4.3.2 Heterologe Produktion der Caulonodine und ihrer Varianten

Ein mit einem der Plasmide CK31_198xA1rbsBC_pET41a, CK31_198xA2rbsBC_pET41a, CK31_22xxA1rbsBC_pET41a oder CK31_22xxA2rbsBC_pET41a transformierter *E. coli* BL21(DE3) Stamm wurde über Nacht in 50 mL LB-Medium mit 50 µg/mL Kanamycin bei 37 °C und 250 rpm wachsen gelassen. Mit dieser Vorkultur wurden je 600 mL M9-Minimalmedium mit Vitaminmix und 50 µg/mL Kanamycin in einem 2 L Kulturkolben mit Schikanen auf eine OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert. Diese Kulturkolben wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 bei 37 °C bei 230 rpm wachsen gelassen. Dann erfolgte ein Temperaturshift

auf 20 °C und das Wachstum wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 fortgesetzt. Anschließend wurde mit IPTG in einer Endkonzentration von 0,1 mmol/L induziert. Die Fermentation wurde für 3 Tage fortgesetzt. Die Kulturen wurden anschließend bei 4 °C für 20 min bei 6000 rpm abzentrifugiert. Die Pellets wurden entweder direkt extrahiert oder für die spätere Verwendung bei -20 °C gelagert.

Im Falle der mutierten Varianten änderte sich nur die Größe der Ansätze. Diese wurden in dreifacher Ausführung im 30 mL Maßstab in 50 mL Mikroreaktoren bei 250 rpm fermentiert.

4.3.3 Heterologe Expression von Einzelproteinkonstrukten in pET28a

Zur Expression der Einzelproteinkonstrukte wurde ein mit dem entsprechenden Plasmid transformierter *E. coli* BL21(DE3) Stamm über Nacht in 50 mL LB-Medium mit 50 µg/mL Kanamycin bei 37 °C und 250 rpm wachsen gelassen. Mit dieser Vorkultur wurden je nach Ansatzgröße 50 bis 600 mL LB-Medium oder M9-Medium mit Vitaminmix auf eine OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert. Diese Kulturkolben wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 bei 37 °C bei 230 rpm wachsen gelassen und dann mit IPTG in einer Endkonzentration von 0,5 mmol/L induziert. Die Expression wurde dann für 2 h bei 37 °C fortgesetzt. Alternativ wurde nur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 bei 37 °C bei 230 rpm wachsen gelassen und die Temperatur auf 25 °C reduziert. Die Induktion erfolgte dann wieder bei OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6. Die Expression wurde in diesem Fall für 3 h fortgesetzt. Eine weitere Variante war es, die Temperatur auf 18 °C zu reduzieren und die Expression über Nacht stattfinden zu lassen.

Alternativ zur IPTG Induktion wurde eine natürlichere Expressionsvariante gewählt bei der dem LB-Medium von Beginn an 1,3 % Lactose zugesetzt wurden. Dabei wurde über Nacht bei 25 °C exprimiert.

Bei Verwendung des *E. coli* Stamm ArcticExpress, wurde das Anwachsen bei nur 30 °C und die Expression bei 12 °C über Nacht durchgeführt.

4.3.4 Heterologe Expression von Proteinen in Clusterkonstrukten

Für die heterologe Produktion von Proteinen in Clusterkonstrukten wurden *E. coli* BL21(DE3) Stämme mit einem der Plasmide CK31_198xA2rbsBStrep2rbsC oder CK31_198xA2rbsBrbsCStrep2 transformiert und über Nacht in 50 mL LB-Medium mit 50 µg/mL Kanamycin bei 37 °C und 250 rpm wachsen gelassen. Mit dieser Vorkultur wurde eine Expressionskultur in LB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert. Das Wachstum

erfolgte analog zu den Einzelproteinkonstrukten. Induziert wurde aber in Analogie zu den Naturstofffermentationen nur mit 0,1 mmol/L IPTG.

4.4 Naturstoffisolierung

4.4.1 Methanolextraktion von Zellpellets

Die Zellpellets nach den Lasso-peptid- oder Variantenfermentationen wurden in sehr wenig ddH₂O oder dem Rücklauf durch Vortexieren resuspendiert. Anschließend wurden ca. 10 % des Kulturvolumens an Methanol zugegeben. Die eigentliche Extraktion fand bei 4 °C für 2 h unter kontinuierlichem Schwenken statt.

Die Extraktsuspension einer präparativen Fermentation wurde für 15 min bei 6000 rpm abzentrifugiert und das Pellet verworfen. Der Überstand wurde durch einen Papierfilter filtriert und am Rotationsevaporator bei 30 °C (für die Astexine) bis 40 °C (für die Caulonodine) bis zur Trockene eingedampft. Die so erhaltenen Extraktpellets wurden je nach Verwendung und Peptid in unterschiedlichen Mengen 50 % Methanol oder 20 % Acetonitril resuspendiert.

Die Extraktsuspension von mutierten Varianten wurde in 50 mL Falcon Tubes für 15 min bei 4000 g pelletiert und der Überstand in ein neues Falcon Tube dekantiert. Der Überstand wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einer Gefriertrocknungsanlage bei 0,1 mbar bis zu 2 Tage lang getrocknet. Ein so erhaltenes Extraktpellet wurde in 400 µL 20 % Acetonitril resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand konnte anschließend direkt für HPLC-MS-Analytik oder thermische und proteolytische Stabilitätsuntersuchungen verwendet werden.

4.4.2 Trennung und Reinigung der Astexine und Varianten

Die aus den Fermentationen erhaltenen Extrakte wurden in 20 % Acetonitril resuspendiert, für 20 min bei 4000 g zentrifugiert und anschließend steriltriftriert um Schwebeteilchen zu entfernen. Die so erhaltenen klaren Überstände wurden mit einem präparativen RP-HPLC-System (Agilent 1100 Serie) über eine C18HTec-Säule (250 x 21 mm) gereinigt. Dabei wurde

der in der folgenden Tabelle aufgelistete Gradient aus Wasser / 0,1 % TFA (Solvent A) und Acetonitril / 0,1 % TFA (Solvent B) mit einer Flussrate von 18 mL/min benutzt.

Tabelle 8 – HPLC-Gradient der präparativen Reinigung der Astexine

Zeitpunkt	% Solvent B	Funktion
0 – 30 min	20 – 30	Trennung
30 – 32 min	30 – 95	
32 – 37 min	95	Waschen
37 – 39 min	95 – 20	
39 – 45 min	20	Äquilibrieren

Die Fraktionen, die die Hauptprodukte enthielten, wurden separat kombiniert, lyophilisiert und in einer zweiten HPLC weiter getrennt und gereinigt. Die zweite Reinigung wurde mit einem analytischen HPLC System (Agilent 1260 Serie) mit einem automatischen Fraktionskollektor auf einer Nucleodur C18ec-Säule (125 x 2 mm) bei einer Säulentemperatur von 50 °C und einer Flussrate von 0,2 mL/min erreicht.

Tabelle 9 – HPLC-Gradient der ersten analytischen Reinigung der Astexine

Zeitpunkt	% Solvent B	Funktion
0 – 15 min	20 – 27,5	Trennung
15 – 17 min	27,5 – 95	
17 – 20 min	95	Waschen
20 – 22 min	95 – 20	
22 – 30 min	20	Äquilibrieren

Das nach diesem Schritt sauber erhaltene Astexin-1(19) wurde lyophilisiert und für die spätere Verwendung bei -80 °C gelagert. Die hauptsächlich Astexin-1(23) enthaltenden Fraktionen wurden lyophilisiert und für eine dritte Reinigung in 15 % Acetonitril resuspendiert. Diese wurde mit dem analytischen HPLC-System auf der Synergi Phenomenex 4µ RP column (250 x 2 mm) bei 25 °C Säulentemperatur und 0,5 mL/min Flussrate mit dem folgenden Gradienten realisiert.

Tabelle 10 – HPLC-Gradient der zweiten analytischen Reinigung der Astexine

Zeitpunkt	% Solvent B	Funktion
0 – 15 min	17	Trennung
15 – 17 min	17 – 95	
17 – 20 min	95	Waschen
20 – 22 min	95 – 17	
22 – 30 min	17	Äquilibrieren

Das nach diesem Schritt sauber erhaltene Astexin-1(23) wurde lyophilisiert und für die spätere Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die Reinigung der Astexin-Varianten wurde nur eine präparative HPLC benutzt, da nicht die für NMR-Spektroskopie benötigte Reinheit erreicht werden musste. Die Varianten $\Delta 6$ und F15W wurden mit dem gleichen Gradienten wie für natives Astexin gereinigt. Für die Varianten $\Delta 7$ und R19W wurde der Gradient angepasst und lief von 25 % B auf 35 % B in 30 min. Die Wasch- und Äquilibrierschritte wurden entsprechend angepasst.

4.4.3 Trennung und Reinigung der Caulonodine

Die aus den Fermentationen erhaltenen Extrakte wurden in 20 % Acetonitril resuspendiert, für 20 min bei 4000 g zentrifugiert und anschließend sterilfiltriert um Schwebeteilchen zu entfernen. Die so erhaltenen klaren Überstände wurden mit einem präparativen RP-HPLC-System (Agilent 1100 Serie) über eine C18HTec-Säule (250 x 21 mm) gereinigt. Dabei wurde der in der folgenden Tabelle aufgelistete Gradient aus Wasser / 0,1 % TFA (Solvent A) und Acetonitril / 0,1 % TFA (Solvent B) mit einer Flussrate von 18 mL/min benutzt.

Zeitpunkt	% Solvent B	Funktion
0 – 30 min	10 – 60	Trennung
30 – 32 min	60 – 95	
32 – 37 min	95	Waschen
37 – 39 min	95 – 10	
39 – 45 min	10	Äquilibrieren

Das nach diesem Schritt in ausreichender Reinheit erhaltenen Caulonodine IV, VI und VII wurde lyophilisiert und für die spätere Verwendung bei -80 °C gelagert. Die hauptsächlich Caulonodin V enthaltenden Fraktionen wurden lyophilisiert und für eine zweite Reinigung in 20 % Acetonitril resuspendiert. Die zweite Reinigung wurde mit einem analytischen HPLC System (Agilent 1260 Serie) mit einem automatischen Fraktionskollektor auf einer semipräparativen Nucleodur C18ec-Säule (250 x 5 mm) bei einer Säulentemperatur von 25 °C und einer Flussrate von 0,8 mL/min erreicht.

Zeitpunkt	% Solvent B	Funktion
0 – 15 min	25 – 32,5	Trennung
15 – 17 min	32,5 – 95	
17 – 20 min	95	Waschen
20 – 22 min	95 – 25	
22 – 30 min	25	Äquilibrieren

Das nach diesem Schritt sauber erhaltene Caulonodin V wurde lyophilisiert und für die spätere Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.5 Analytische Methoden

4.5.1 HPLC-MS

Für die HPLC-MS-Analytik wurden zwei verschiedene Systeme eingesetzt. Ein hochauflösendes LTQ-FT ultrainstrument (Thermo Fisher Scientific), das an ein 1100 HPLC System (Agilent) gekoppelt ist, wurde für alle Extraktmessungen, thermische und proteolytische Stabilitätsassays in Extrakten und für MS-MS-Analytik von Extrakten und Reinpeptiden benutzt. Zur Detektion wurde die UV Absorption bei 215 nm aufgezeichnet. Für die Trennung der Proben wurde die CC Nucleosil 300-8 C18-Säule (125 x 2 mm) mit dem nachfolgenden Gradienten aus Wasser / 0,1 % TFA (Solvent A) und Acetonitril / 0,1 % TFA (Solvent B) bei einer Säulentemperatur von 40 °C und einer Flussrate von 0,2 mL/min benutzt.

Tabelle 11 – HPLC-Gradient der HPLC-MS-Messungen am LTQ-FT ultrainstrument

Zeitpunkt	% Solvent B	Funktion
0 – 30 min	5 – 50	Trennung
30 – 32 min	50 – 95	
32 – 37 min	95	Waschen
37 – 39 min	95 – 5	
39 – 45 min	5	Äquilibrieren

Die aus den HPLC-MS-Läufen erhaltenen Daten wurden mit der Software Xcalibur ausgewertet. Die aufgezeichnete UV-Spur wurde für die Quantifizierung der Produktion von Mutanten herangezogen. Dazu wurde über ein Signal integriert und die Integrale der UV-Signale miteinander verglichen.

Ein zweites HPLC-MS-System, das 1100 Serie MSD (Hewlett-Packard), gekoppelt an ein micropore 1260 HPCL-System (Agilent) wurde für alle Messungen benutzt, die weder Fragmentierung noch eine besonders hohe Genauigkeit der Massenbestimmung erforderten. Dies waren Tests der Reinheit von Produkten sowie Thermo- und Proteasestabilitätsuntersuchungen von Reinpeptiden. Die Detektion erfolgte in diesem System mit einem UV Detektor, der bei 214 nm aufzeichnete. Für die Trennung wurden je nach Probe unterschiedliche Gradienten und teilweise auch unterschiedliche Säulentemperaturen benutzt. Zur Trennung wurde in allen Fällen die Säule Nucleodur C18ec mit den Laufmitteln Wasser / 0,1 % TFA (Solvent A) und Acetonitril / 0,1 % TFA (Solvent B) und einer Trennungszeit von 15 min verwendet. In der folgenden Tabelle sind die Gradienten zusammengefasst.

Peptide	Messungen	Säulentemperatur	Trennungsgradient
Astexin-1(19), (23), Δ6 und F15W	Reinheit, Hitzestabilität, Proteasestabilität	50 °C	20,0 – 27,5 % B
Astexin-1 Δ7	Reinheit, Hitzestabilität, Proteasestabilität	50 °C	22,5 – 30,0 % B
Astexin-1 R19W	Reinheit, Hitzestabilität, Proteasestabilität	50 °C	25,0 – 32,5 % B
Caulonodin IV	Reinheit, Hitzestabilität	25 °C	29,0 – 36,5 % B
Caulonodin V	Reinheit, Hitzestabilität	25 °C	24,0 – 31,5 % B
Caulonodin VI	Reinheit, Hitzestabilität	25 °C	23,0 – 30,5 % B

Peptide	Messungen	Säulentemperatur	Trennungsgradient
Caulonodin VII	Reinheit, Hitzestabilität	25 °C	28,0 – 35,5 % B
Caulonodin IV, V, VI und VII	Proteasestabilität	25 °C	22,0 – 37,0 % B

4.5.2 MS-MS CID-Fragmentierung

Die MS²-Fragmentierung wurde mit kollisionsinduzierter Dissoziation (*collision-induced dissociation* CID) in der linearen Ionenfalle des LTQ-FT-Massenspektrometers durchgeführt. Die Analyse erfolgte online während der HPLC-MS-Analyse, in dem bestimmte Massen ausgewählt und diese selektiv fragmentiert wurden. Meist wurden die zweifach geladenen Ionen der Lasso-peptide für die Fragmentierung ausgewählt, da sie generell in höherer Menge bei der Ionisierung entstehen. Die gerätespezifische normalisierte Kollisionsenergie würde für alle Experimente auf 35 gesetzt. Aus den Fragmentierungsspektren können Informationen über die Aminosäuresequenz und teilweise auch über die Konformation der Peptide erhalten werden.

4.5.3 MS-MS MALDI-TOF-TOF

Die *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight* (MALDI-TOF) Analysemethode wurde gewählt um möglicherweise auftretende binäre Peptidfragmente zu detektieren, da mit einem solchen Gerätesetup recht hohe Fragmentierungsenergien erzeugt werden können und somit Mehrfachbindungsbrüche, die für die zweifelsfreie Detektion von binären Peptidfragmenten unabdingbar ist, forciert werden.

Die Messungen wurden an einem 4800 MALDI TOF/TOF Analyzer (AB SCIEX) durchgeführt. Die Proben der Reinpeptide in Lassotopologie oder entfädelt wurden mit Dihydroxybenzoesäure als Matrix auf einem MALDI-Target gemischt und für 15 min bei RT getrocknet bevor sie im Gerät gemessen wurden.

4.6 Biochemische Methoden

4.6.1 Thermische Stabilitätsuntersuchung von Lassozeptiden

Zur Untersuchung der thermischen Stabilität der Lassozeptide wurde eine Lösung, die 10 bis 20 µg eines reinen Lassozeptids enthielt, für eine definierte Zeit einer definierten Temperatur (bis zu 95 °C) ausgesetzt. Anschließend wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt und per HPLC-MS analysiert. Die benutzten Gradienten sind dem Abschnitt 4.5.1 zu entnehmen.

Die thermische Stabilität von schlecht produzierten oder nicht gereinigten Varianten wurde untersucht, indem 25 µL eines Mutantextraktes für 1 h bei 95 °C inkubiert wurden. Die Proben wurden anschließend auf 4 °C abgekühlt und per hochauflösender HPLC-MS mit dem Standardgradienten analysiert.

4.6.2 Proteolytische Stabilitätsuntersuchung von Lassozeptiden

Die Stabilität der Lassozeptide gegen proteolytischen Verdau wurde untersucht, indem 10 bis 20 µg eines reinen Lassozeptids vor oder nach Hitzebehandlung (in der Regel 1 h bei 95 °C) mit unterschiedlichen Proteasen inkubiert wurden.

Die Carboxypeptidaseassays wurden mit 0,5 bis 1,0 U Carboxypeptidase Y in einem Puffer (50 mM MES, 1 mM CaCl₂ bei pH 6,75) für 1 bis 16 h bei 25 °C durchgeführt. Für Varianten, die nicht isoliert wurden, wurden 25 µL eines Mutantextraktes vor oder nach Hitzebehandlung (in der Regel 1 h bei 95 °C) an einem Konzentrator (concentrator 5301, Eppendorf) zur Trockene eingedampft und in einem Carboxypeptidase Y-haltigen (1,0 U) Puffer (50 mM MES, 1 mM CaCl₂ bei pH 6,75) resuspendiert und 2 h bei 25 °C inkubiert.

Die Trypsinverdaue wurden mit 0,5 µg Trypsin in 50 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂ bei pH 7,6 für 1 bis 4 h bei 25 °C durchgeführt. Chymotrypsinverdaue wurden analog mit 0,5 U Chymotrypsin in 1 mM HCl für 1 bis 4 h bei 25 °C durchgeführt.

Die Assays wurden nach Ende der Inkubationszeit auf 110 µL mit ddH₂O aufgefüllt und auf Eis bis zur Messung per HPLC-MS gelagert.

4.7 Spektroskopische Methoden

4.7.1 NMR-Spektroskopie und Strukturaufklärung von Astexin-1

Zur Strukturaufklärung von Astexin-1 wurden 3,5 mg Astexin-1(23) und 3,0 mg Astexin-1(19) in je 250 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) gelöst. Die daraus resultierenden Konzentrationen waren 5,5 bzw. 5,7 mM. Der Einfluss der Temperatur auf die chemischen Verschiebungen wurde durch Aufnahme von ^1H -Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen (278 K, 283 K, 288 K, 293 K, 298 K) untersucht. Für alle weiteren Experimente wurde für Astexin-1(23) eine Temperatur von 288 K, für Astexin-(19) von 283 K gewählt. Zur sequentiellen Zuordnung wurden DQF-COSY- [208], TOCSY- [209] und NOESY-Messungen [210] mit Wasser Unterdrückung [211] durchgeführt. TOCSY-Spektren wurden mit einer Mischzeit von 80 ms, NOESY-Spektren mit 100 und 300 ms aufgenommen. Eindimensionale Spektren wurden mit 65536 Datenpunkten aufgenommen, während zweidimensionale Spektren mit 4096 Datenpunkten in der F_2 Dimension und 512 Inkrementen in der F_1 Dimension aufgezeichnet wurden. 1D- und 2D-Spektren wurden mit 32 Transienten verwendet und der Relaxationsdelay war 3,0 s. Die chemische Verschiebung ist in Bezug auf Tetramethylsilan (TMS) als Standard in ppm angegeben. Zur Referenzierung wurde H_2O verwendet, dessen Signal mit Hilfe von 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat (DSS) als internem Standard kalibriert wurde. Zur Untersuchung des Wasserstoff-Deuterium-Austauschs wurden zusätzlich ^1H - und COSY-Spektren in D_2O bei 283 K 1 h, 1 d, 7 d und 28 d nach Probenvorbereitung gemessen. Alle Spektren wurden mit Hilfe von Bruker TOPSPIN 3.1 prozessiert und NOESY-Spektren wurden in Sparky [212] analysiert.

Zur Strukturberechnung wurden die Kreuzsignale der NOESY-Spektren mit einer Mischzeit von 100 ms integriert, kalibriert als Distanzbeschränkungen eingesetzt. Die Torsionswinkel ϕ wurden mit Hilfe der gemessenen vicinalen Kopplungskonstanten $^3J_{\text{HN}\alpha}$ ermittelt, während die Winkel χ durch stereospezifische Zuordnung auf Basis der NOE-Beschränkungen und $^3J_{\alpha\beta}$ bestimmt wurden [213]. Die ermittelten Beschränkungen wurden im Simulated-Annealing-Protokoll verwendet und die Strukturberechnung mit Hilfe des Programms CYANA 2.1 [214] durchgeführt. Die Koordinaten der 20 Niedrigenergie-Strukturen, die die Struktur von Astexin-1(19) in Lösung repräsentieren, wurden bei der Protein Data Base (PDB) unter der Zugangsnummer 2M37 hinterlegt.

4.7.2 NMR-Spektroskopie und Strukturaufklärung von Caulonodin V

Zur Strukturaufklärung von Caulonodin V wurden 4,0 mg Caulonodin V in 200 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) gelöst. Die daraus resultierenden Konzentrationen waren 10,1 mM. Der Einfluss der Temperatur auf die chemischen Verschiebungen wurde durch Aufnahme von ^1H -Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen (283 K, 288 K, 293 K, 298 K, 303 K) untersucht. Für alle weiteren Experimente wurde eine Temperatur von 298 K gewählt. Zur sequentiellen Zuordnung wurden DQF-COSY- [208], TOCSY- [209] und NOESY-Messungen [210] mit Wasser Unterdrückung [211] durchgeführt. TOCSY-Spektren wurden mit einer Mischzeit von 140 ms, NOESY-Spektren mit 150 und 300 ms aufgenommen. Eindimensionale Spektren wurden mit 65536 Datenpunkten aufgenommen, während zweidimensionale Spektren mit 4096 Datenpunkten in der F_2 Dimension und 512 Inkrementen in der F_1 Dimension aufgezeichnet wurden. 1D- und 2D-Spektren wurden mit 32 Transienten verwendet und der Relaxationsdelay war 3,0 s. Die chemische Verschiebung ist in Bezug auf Tetramethylsilan (TMS) als Standard in ppm angegeben. Zur Referenzierung wurde H_2O verwendet, dessen Signal mit Hilfe von 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat (DSS) als internem Standard kalibriert wurde. Alle Spektren wurden mit Hilfe von Bruker TOPSPIN 3.1 prozessiert und NOESY-Spektren wurden in Sparky [212] analysiert.

Zur Strukturberechnung wurden die Kreuzsignale der NOESY-Spektren mit einer Mischzeit von 150 ms integriert, kalibriert als Distanzbeschränkungen eingesetzt. Die Torsionswinkel ϕ wurden mit Hilfe der gemessenen vicinalen Kopplungskonstanten $^3J_{\text{HN}\alpha}$ ermittelt, während die Winkel χ durch stereospezifische Zuordnung auf Basis der NOE-Beschränkungen und $^3J_{\alpha\beta}$ bestimmt wurden [213]. Die ermittelten Beschränkungen wurden im Simulated-Annealing-Protokoll verwendet und die Strukturberechnung mit Hilfe des Programms CYANA 2.1 [214] durchgeführt. Die Koordinaten der 15 Niedrigenergie-Strukturen, die die Struktur von Astexin-1(19) in Lösung repräsentieren, wurden noch nicht bei einer Strukturdatenbank hinterlegt.

5. Ergebnisse

5.1 *Genome Mining* als Methode zur Identifizierung neuer Naturstoffbiosynthesecuster

Das *Genome Mining* stellt eine mächtige Methode dar um neue Naturstoffe aus bekannten Genomsequenzen vorherzusagen und anschließend zu isolieren. Dies wurde für die Lassoptide eindrucksvoll durch die Isolation von Capistruin gezeigt [175]. Der dabei benutzte Ansatz ging von einer BLAST-suche nach McjB-Homologen aus. Dabei wurde die Tatsache ausgenutzt, dass die B-Proteine der Lassozeptidbiosynthesegencluster kaum Homologie zu anderen Enzymen besitzen. Eine geringe Ähnlichkeit besteht lediglich zu eukaryotischen Transglutaminasen, was auch zur Vorhersage der Funktion der B-Proteine, die katalytische Spaltung des Vorläufers, geführt hat. Parallel zu dieser Arbeit wurde von A.J. Link und Mitarbeitern ein Vorläufer-zentrierten Ansatz fürs *Genome Mining* verfolgt [215]. Für ein erweitertes *Genome Mining* wurde in unserer Gruppe erneut die Herangehensweise über die Suche nach Homologen der beiden Modifizierungsenzyme gewählt.

5.1.1 Kriterien für das *Genome Mining* von Lassozeptidbiosynthesegenclustern

Für das eigentliche *Genome Mining* wird der BLAST Algorithmus benutzt. Wird dabei McjB als Ausgangsprotein verwendet, erhält man als Ergebnis einige Homologe in verschiedenen nahe verwandten Spezies aber auch weiter entfernten (z.B. Streptomyceten). Durch diesen simplen *Genome Mining* Ansatz konnte zum Beispiel das Lassozeptid Capistruin vorhergesagt und isoliert werden. Eine weitaus größere Anzahl neuer putativer Cluster kann durch Verwendung des PSI-BLAST Algorithmus erzielt werden [216]. Dieser bezieht die bei einmaligem Durchlaufen des Algorithmus erhaltenen, über einem gewissen Schwellenwert liegenden Ergebnisse in eine weitere Suchrunde mit ein, in dem eine PSSM erstellt wird. Dadurch wird nach 4 bis 5 Durchläufen die maximale Anzahl an Hits erzeugt, welche deutlich über der in der ersten Runde erhaltenen Anzahl an Treffern liegt. In jedem Fall müssen anschließend die in direkter Nähe zu den McjB-Homologen befindlichen ORFs analysiert werden. Für einen funktionellen Lassozeptidbiosynthesegencluster bedarf es noch mindestens zweier weiterer Proteine, einem Homologen zu McjC und einem Vorläuferpeptid (entspricht McjA). In den meisten Fällen findet sich ein solches McjC-Homolog sowie ein bis drei

Vorläuferpeptide in der unmittelbaren Umgebung. Zusätzlich werden weitere Gene in der Nähe gefunden, die für Regulatoren, Transportproteine oder Proteine unbekannter Funktion codieren. Die Identifikation des Vorläuferpeptids kann meist nicht automatisiert erfolgen, da diese Peptide zu klein und zu variabel sind um sie für Homologiesuchen mit dem BLAST Algorithmus zu benutzen. Zusätzlich erschwert wird die Suche nach Vorläuferpeptiden durch die Tatsache, dass sie von automatischen Annotierungsprogrammen aufgrund ihre geringen Größe oft nicht annotiert werden, so dass sie manuell identifiziert werden müssen. Daher ist ein wesentlicher Punkt des *Genome Minings* von Lassozeptiden das Festlegen von Kriterien für den Vorläufer.

Da zwar einige Lassozeptide zu Beginn dieser Doktorarbeit bekannt waren, aber nur die dazugehörigen Gencluster von MicrocinJ25 und Capistrain, konnten nur sehr wenige Kriterien für die Vorläufer festgelegt werden.

Diese initialen Kriterien für die Vorläuferpeptide für Klasse II Lassozeptide wurden demnach wie folgt festgelegt:

- Zwischen fünf und 20 Aminosäuren vor dem C-Terminus muss ein **Aspartat** oder **Glutamat** stehen, da diese Seitenkette für die Zyklisierung benötigt wird.
- Die achte oder neunte Aminosäure vor diesem Glutamat oder Aspartat sollte ein **Glycin** sein, da alle bisher bekannten Klasse II Lassozeptide einen acht- oder neungliedrigen Ring mit Glycin an Position 1 haben.
- Die zweite Aminosäure vor diesem Glycin muss **Threonin** sein, da diese vermutlich direkt durch die Biomachinery erkannt wird [184].
- Zusätzlich sollten nach der Carboxyaminosäure noch sterisch anspruchsvolle Reste wie **Arginin**, **Phenylalanin**, **Tryptophan** oder **Tyrosin** vorhanden sein, die als Stöpsel wirken könnten.

(20 – 40 aa)... x x x **T** x **G** x x x x x (x) **D/E** x ... x **R/F/W/Y** x ...(max. 20 aa)

Diese Bedingungen wurden im Laufe dieser Doktorarbeit durch die in ersten *Genome Mining* Ansätzen erhaltenen Ergebnisse erweitert und verbessert. So wurde zum Beispiel die Möglichkeit von Siebenringen in Betracht gezogen und entsprechende Vorläufer nicht mehr außer Acht gelassen. Es wurde auch die Möglichkeit erörtert, dass Alanin und Serin als erste Aminosäure des Kernpeptids in Frage kommen können. Auch das Fehlen von sterisch anspruchsvollen Resten wurde nicht mehr als Ausschlusskriterium angesehen. Daraus ergab

sich ein recht loser Rahmen in den ein Lasso-peptidvorläufer passen muss, der jedoch zu einem größeren Aufwand bei der manuellen Analyse führt.

(20 – 40 aa)... x x x T x G/A/S x x x x x (x) (x) D/E x ... x (R/F/W/Y) x ... (max. 20 aa)

Mit diesen zuvor entwickelten Methoden war es möglich ein breites *Genome Mining* durchzuführen, für das allerdings nur Proteobakterien als Ziel ausgewählt wurden, da sich in vergangenen Projekten gezeigt hat, dass diese sehr effizient heterolog in *E. coli* exprimiert werden können, während weiter entfernt verwandte Spezies wie Actinomyceten möglicherweise besser in *Streptomyces coelicolor* exprimiert werden können.

5.1.2 Fokussiertes *Genome Mining* nach Lasso-peptidbiosynthesegenclustern in Proteobakterien mittels PSI-BLAST

Das *Genome Mining* mittels PSI-BLAST förderte 134 McjB-Homologe zu Tage, von welchen 32 einsame B-Proteine oder Teil eines unvollständigen Cluster sind [217]. Die verbliebenen 102 Treffer aus 87 Proteobakterienspezies haben in der Nähe ein McjC-Homolog und wurden daher auf die Präsenz eines putativen Vorläuferpeptids weiter untersucht. Die identifizierten Cluster lassen sich anhand ihrer Organisation in 6 Gruppen zusammenfassen:

1. 15 Cluster mit ABC-Transporter (ABCD),
2. 33 Cluster ohne ABC-Transporter mit einfachster Organisation (ABC),
3. 8 Cluster ohne Transporter mit mehreren Vorläufern (AABC oder AAABC),
4. 4 Cluster mit zusätzlichen Genen in unterschiedlicher Organisation,
5. 27 Cluster mit einem in zwei Teile geteiltem B-Protein und eventuell zusätzlichen Genen (z.B. AB1B2CX oder ACB1B2D) und
6. 15 Cluster bei denen kein Vorläuferpeptid in der unmittelbaren Umgebung identifiziert werden konnte (Abbildung 16).

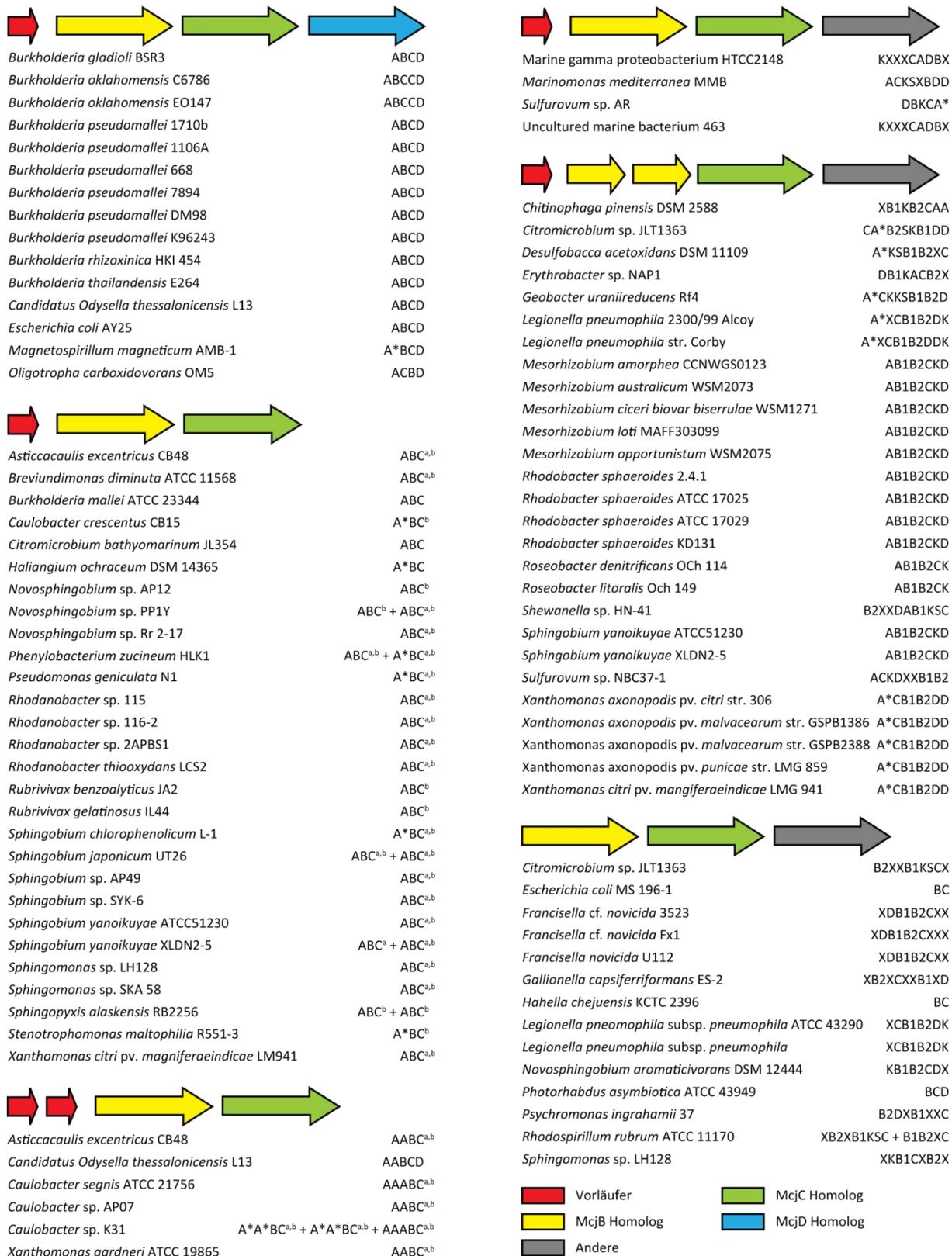


Abbildung 16 - Ergebnisse des B-Protein Genome Minings in Proteobakterien [217]. Cluster sind nach ihrer Genorganisation geordnet. Vorläufer, die mit einem Stern markiert sind, entsprechen nicht den allgemeinen Kriterien für Lasso-peptidvorläufer (Thr-2 bzw. Gly1). Cluster, die mit **a** markiert sind, haben *upstream* einen GntR-Regulator, Cluster, die mit **b** markiert sind, haben *downstream* einen invers orientierten Cluster mit einem TonB-abhängigen Rezeptor. K wird als Abkürzung für Kinase-Homologe, S für Sulfotransferase-Homologe und X für Proteine unbekannter Funktion benutzt.

Auffällig ist dabei vor allem die Tatsache, dass der immer für prototypisch gehaltene MicrocinJ25-Cluster eine Ausnahme darstellt, da kein Cluster seine konkrete Organisation teilt. Die allgemeine ABCD-Organisation scheint sich auf nur wenige Spezies zu beschränken, wobei die meisten zur Gattung *Burkholderia* gehören. Der größte Teil der identifizierten Cluster hat eine simple A_nBC-Organisation, besteht also nur aus den beiden prozessierenden Enzymen und ein bis drei Vorläufern. Diese Cluster lassen sich nochmals unterteilen in Abhängigkeit des Vorhandenseins von verschiedenen Genen in der direkten Umgebung. *Upstream* vieler dieser Cluster befindet sich ein Regulator vom GntR-Typ, während sich *downstream* ein in umgekehrter Richtung orientierter Cluster aus TonB-abhängigem Rezeptor und Oligopeptidase befindet. Meist treten sie zusammen auf, in Einzelfällen kommen sie aber auch separat vor. Eine Überraschung stellt die große Anzahl Cluster mit geteiltem B-Protein dar. Dieses Clusterarrangement wurde erstmals bei der Identifizierung des Lasso-peptidbiosynthese-genclusters des Lariatproduzenten *Rhodococcus* sp. K01-B0171 beobachtet [188]. Durch Knock-Out-Tests wurde das zusätzliche Gen *larB1* (urspr. *larC*) als essentiell eingestuft. Dieses putative Protein, das in der Clusterorganisation vor dem McjB-Homolog liegt, hat Ähnlichkeit zum PqqD-Protein aus der PQQ-Biosynthese sowie zum N-terminalen Teil der vollständigen B-Proteine und wird daher als B1 bezeichnet. Das McjB-Homolog wurde durch den PSI-BLAST identifiziert, da es den katalytischen Teil der Cysteinprotease enthält und zum C-terminalen Teil der einfachen B-Proteine homolog ist. Daher wird es als Protein B2 bezeichnet.

Einige der Cluster mit gespaltenem B-Protein, aber auch einige andere Cluster enthalten zusätzliche Gene in der Nähe, die für Proteine mit unbekannter Funktion codieren bzw. mit Funktionen, die vorher nicht mit Lasso-peptidbiosynthese-genclustern in Verbindung gebracht wurden. Es finden sich vor allem putative Kinasen vom HPr-Typ, sowie Sulfotransferasen und konservierte Proteine unbekannter Funktion. Die Gruppe der Cluster ohne eindeutig identifizierbaren Vorläufer konnte nicht weiter analysiert werden. Es bleibt allerdings die Frage ob das Vorläuferpeptid tatsächlich fehlt, es sich deutlich weiter entfernt vom Cluster befindet oder einfach aufgrund von ungewöhnlicher Sequenz nicht als solches identifiziert werden konnte.

Wie bereits eingangs erwähnt konnten 102 Cluster aus 87 Spezies identifiziert werden. Von diesen 102 enthalten 88 Cluster ein identifizierbares Vorläuferpeptid. Aufgrund des Vorhandenseins von Clustern mit mehr als einem Vorläufer, sind dies 98 an der Zahl. Ein gewisser Teil sind jedoch Vorläuferpeptide, die nicht ganz den anfänglichen Kriterien, wie Threonin an Position -2 oder Glycin an Position 1, entsprechen, so dass für die weitere

Analyse 71 erhalten blieben (vollständige Liste siehe Anhang Tabelle 1). Interessant ist an dieser Stelle die Betrachtung der Ringgrößen und ringschließenden Aminosäuren. Es scheint eine generelle Präferenz für Aspartat zu geben, da 53 Fälle mit Aspartat im Gegensatz zu 23 Fällen mit Glutamat vorliegen (Tabelle 12). Des Weiteren sind Aspartatreste eher an der Bildung von neungliedrigen Ringen beteiligt, wobei das Verhältnis mit 32 zu 21 bei achtgliedrigen Ringen nicht allzu deutlich ist. Für Glutamat ist dieses Ergebnis eindeutiger. 18-mal ist Glutamat die ringschließende Aminosäure für einen Achtring, nur in fünf Fällen würde ein Neunring entstehen. Dies deutet bereits an, dass ein Neunring mit Glutamat eine gewisse obere Grenze für Lasso peptide darstellt. Möglicherweise ist die Stabilisierung der Lasso faltung bei dieser Größe schwieriger zu realisieren. In drei Fällen wurde ein Glutamatrest nur an Position 7 des Kernpeptids gefunden, in vier weiteren Fällen ist noch ein weiterer ringschließender Rest an Position 8 vorhanden. Dies eröffnet die Möglichkeit von Lasso peptiden mit siebengliedrigen Ringen. Das Fehlen eines entsprechenden Aspartatrests an dieser Position könnte ein Hinweis auf eine untere Grenze der Ringgröße für Lasso peptide sein. Ein Siebenring mit Aspartat würde nur noch aus 22 Atomen bestehen und würde damit ein Loch formen, das möglicherweise schon zu klein für die Passage einer peptidischen Bindung ist. Bei Rotaxanen liegt die kleinste Ringgröße, durch die noch eine einfache aliphatische Kette geführt werden kann, bei 20 Atomen [218].

Tabelle 12 – Vorkommen der ringschließenden Aminosäuren und ihrer Positionen in den durch das *Genome Mining* identifizierten Vorläufern.

Aminosäure	Position 7	Position 8	Position 9	Gesamtanzahl des Auftretens
Aspartat	0	21	32	53
Glutamat	7	18	5	30

Aus den im *Genome Mining* erzielten Ergebnissen leiten sich verschiedene Projekte ab, die in der Arbeitsgruppe Marahiel bearbeitet wurden. Zunächst sollte ein weiteres Beispiel für das erfolgreiche Anwenden von *Genome Mining* gefunden werden. Dafür wurde das Bakterium *Asticcacaulis excentricus* CB48 ausgewählt, da die Gensequenz schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt zur Verfügung stand. Außerdem enthält der Organismus zwei putative Lasso peptidbiosynthesegencluster, die beide keinen ABC-Transporter besitzen. In dieser Arbeit wurde daraus das Lasso peptid Astexin-1 isoliert und charakterisiert [219]. Dieser Naturstoff wurde parallel und unabhängig zu dieser Arbeit auch von Maksimov, et al. in einem *precursor*-zentrierten *Genome Mining* isoliert [215]. Ein weiteres Projekt stellte die

Bearbeitung eines Clusters mit mehreren Vorläuferpeptiden dar. Dafür wurde das Bakterium *Caulobacter segnis* ausgewählt, da es drei Vorläufer in nur einem Cluster enthält. In der Arbeit von Julian Hegemann wurden daraus die drei Lassoptide Caulosegnin I, II und III isoliert und charakterisiert [220]. Die anschließenden Projekte sollten sich weiter von bekanntem Terrain entfernen und neue ungewöhnlichere Lassoptide zu Tage fördern. Zunächst wurde in Julian Hegemanns Arbeit die Möglichkeit von Siebenring-Lassozeptiden erörtert und es wurden aus zwei Spezies der Gattung *Xanthomonas* (*gardneri* und *citri*) die drei Lassoptide Xanthomonin I – III mit siebengliedrigen Ringen isoliert und charakterisiert. Der zweite Teil dieser Arbeit sollte sich mit der Möglichkeit anderer Aminosäuren an Position 1 des Kernpeptids beschäftigen. Dazu wurden zwei Cluster mit je zwei Vorläuferpeptiden, welche Alanin bzw. Serin an erster Position des Kernpeptids tragen, aus dem Bakterium *Caulobacter* sp. K31 ausgewählt. Aus diesen konnten die vier neuen Lassoptide Caulonodin IV, V, VI und VII isoliert und charakterisiert werden.

5.2 Bestätigung des *Genome Minings* – Isolierung und Charakterisierung des Lassopeptids Astexin-1 und seiner Varianten

5.2.1 Gencluster, Expressionskonstrukte, heterologe Produktion und Reinigung

Das aquatische Alphaproteobakterium *Asticcacaulis excentricus* CB48 (ATCC 15261) [200] wurde ausgewählt für die Bestätigung der generellen Anwendbarkeit des *Genome Mining* Ansatzes, für den es zu Anfang dieses Projekts mit Capistrain nur ein einziges Beispiel gab. Es enthält zwei putative Lassopeptidbiosynthesegencluster, Cluster 222x mit einem, Cluster 244x mit zwei Vorläuferpeptiden (Abbildung 17). Beide Cluster besitzen keinen ABC-Transporter, haben aber in direkter Nähe ein Gen, das für einen putativen GntR-Regulator codiert, sowie einen kleinen Gencluster, der für einen TonB-abhängigen Rezeptor sowie eine putative Oligopeptidase codieren.

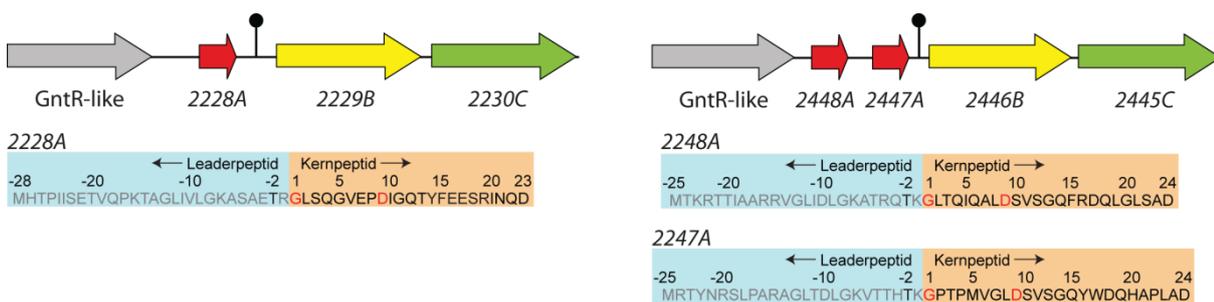


Abbildung 17 – Übersicht über die beiden Lassopeptidbiosynthesegencluster aus *Asticcacaulis excentricus* und ihre Vorläuferpeptide.

Die drei Vorläuferpeptide beider Cluster zeigen teils deutliche Unterschiede (18 % Identität, 41 % Ähnlichkeit), während die beiden *precursor* aus Cluster 244x untereinander sehr große Ähnlichkeit besitzen (49 % Identität, 69 % Ähnlichkeit). Dennoch finden sich im Vergleich aller drei Peptide konservierte Bereiche im Leaderbereich, in der Nähe der Proteaseschnittstelle, bei der Makrolactamring-bildenden Aminosäure sowie im Schwanz, wo die möglichen Stöpsel sitzen könnten (Abbildung 18). Auffällig ist ebenfalls die ungewöhnliche Länge der Kernpeptide. Es würden sich Lassopeptide mit 23 bzw. 24 Länge ergeben, was den bis dahin längsten Vertreter Microcin J25 übertreffen würde.



Abbildung 18 – Alignment der drei Vorläuferpeptide aus *Asticcacaulis excentricus*. Multiples Alignment mit Hilfe der *gonnet protein weight matrix* [221], nach Ähnlichkeit absteigend coloriert von Rot für identisch über Orange und Gelb für konserviert bis Weiß für nicht konserviert; Proteaseschnittstelle zwischen Leader und Kernpeptid mit Pfeil gekennzeichnet.

Zur Identifikation der drei möglichen neuen Naturstoffe wurde der native Produzentenstamm zunächst in verschiedenen Voll- und Minimalmedien fermentiert. Während sich in M20 und M63 Medium kein Wachstum zeigte, konnten Pellets und Überstände der Fermentationen in den Medien PYE, PYEGR, LB und M9 extrahiert und massenspektrometrisch untersucht werden. Dabei wurde aufgrund der ungewöhnlichen Länge der möglichen Produkte außer nach den Massen der vollständigen Lasso peptide auch nach Massen gesucht, die Verkürzungen um bis zu 7 aa entsprechen. Es konnten drei Massensignale identifiziert werden, die dem Volllängenpeptid des Clusters 222x, Astexin-1(23) ($m/z_{\text{obs}} = 1282,6036$ $[M+2H]^{2+}$), dem um vier Aminosäuren verkürzten Peptid (Ile20-Asn21-Gln22-Asp23) des Clusters 222x, Astexin-1(19) ($m/z_{\text{obs}} = 1047,4944$ $[M+2H]^{2+}$), sowie dem um drei Aminosäuren verkürzten Peptid (Ser22-Ala23-Asp24) des Clusters 244x, Astexin-2(21) ($m/z_{\text{obs}} = 1114,5901$ $[M+2H]^{2+}$) entsprachen. Allerdings waren die detektierten Mengen zu gering für weitere Studien oder gar die Isolation der Produkte, so dass ein heterologer Ansatz erarbeitet werden musste.

In den Studien zum Lasso peptid Capistruin hatte sich gezeigt, dass sich Lasso peptid biosynthese gen cluster aus anderen Proteobakterien in *E. coli* exprimieren lassen. Daher wurde hier ein ähnlicher Ansatz gewählt. Beide Cluster wurden jeweils einzeln in den pET41a-Vektor unter T7-Promoterkontrolle kloniert, in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert und in M9 Minimalmedium durch IPTG-Zugabe exprimiert (Abbildung 19). Der Cluster 244x mit zwei Vorläufern zeigte dabei eine schlechte Expression, was sich durch fehlende UV-Peaks der Produkte bemerkbar machte. Dennoch konnten von Astexin-2 Varianten in 24, 22, 21 und 20 Aminosäuren Länge per MS detektiert werden. Vom zweiten Vorläufer dieses Clusters wurden Astexin-3(24), (23) und (22) als Produkte massenspektrometrisch nachgewiesen.

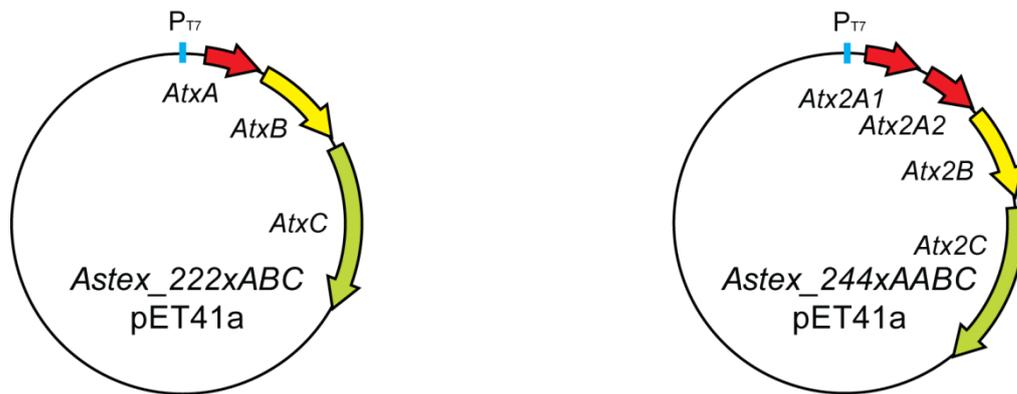


Abbildung 19 – Konstrukte der beiden putativen Lassopeptidbiosynthesegencluster in pET41a zur heterologen Expression in *E. coli* BL21(DE3) unter T7-Promoterkontrolle

Der Cluster 222x, der schon in den nativen Fermentationen die besseren Ergebnisse gezeigt hatte, zeigte die Expression von sechs per MS-Analytik detektierbaren Produkten. Diese m/z-Signale konnten dem in voller Länge vorliegenden Astexin-1(23), sowie fünf Abbauprodukten zugeordnet werden: Astexin-1(22), Astexin-1(21), Astexin-1(20), Astexin-1(19) und Astexin-1(18) (Abbildung 20). Davon waren drei Peptide mit deutlich größerer Produktion vertreten und stellen demzufolge die Hauptprodukte dar: Astexin-1(23), Astexin-1(20) und Astexin-1(19). Die beobachtete teilweise starke Verkürzung des zuerst produzierten Peptids Astexin-1(23) um bis zu 5 aa ist wahrscheinlich der langen Schwanzsequenz von 14 aa nach dem Verzweigungspunkt geschuldet. Zusätzlich ist dies bereits ein Hinweis darauf, dass die letzten fünf Reste mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht an der Stabilisierung der Lassofaltung beteiligt sind. Die produzierten, relativen Mengen der einzelnen Abbauprodukte veränderten sich nicht wesentlich bei Variation der Fermentationsdauer und -temperatur. Die Gesamtproduktionsmenge war jedoch bei 37 °C über Nacht am besten. Ein Vergleich der Intensität der UV-Signale der Hauptprodukte in Pellet- bzw. Überstandsextrakten zeigte eine etwa zehnfach höhere Menge an Lassopeptiden im Pelletextrakt. Dies war ein bis dahin nicht erwartetes Ergebnis, da sowohl Capistrin als auch Microcin J25 zum größeren Teil im Überstand zu finden sind. Andererseits handelt es sich beim Astexin-Cluster um einen der ersten Cluster ohne ABC-Transporter, die untersucht wurden. Die Mengen der Hauptprodukte Astexin-1(23) und Astexin-1(19) in diesem heterologen Fermentationsansatz waren ausreichend für eine Isolation und die anschließende Charakterisierung.

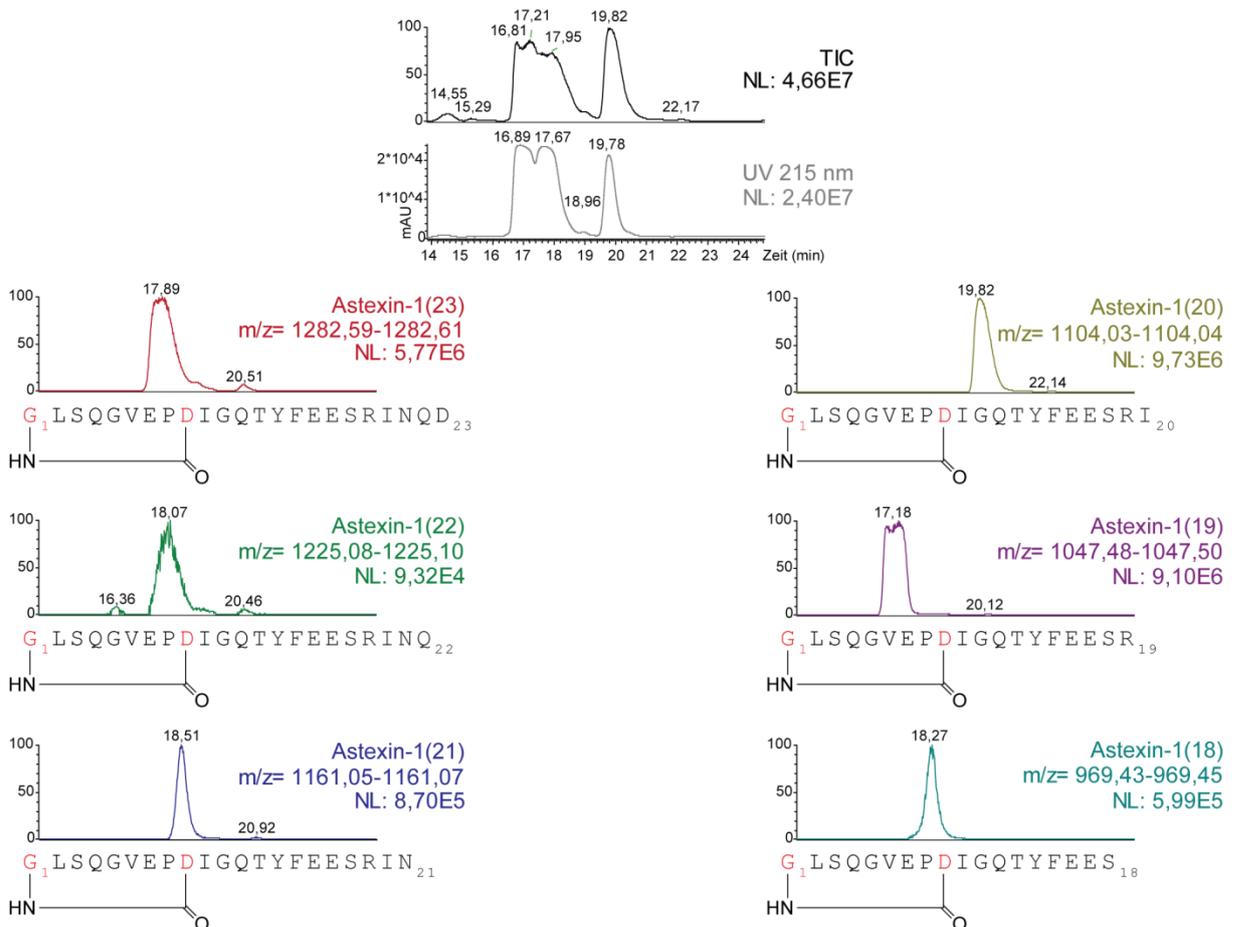


Abbildung 20 – HPLC-MS-Ergebnisse der heterologen Fermentation des 222x Cluster in *E. coli*. Die sechs detektierten Produkte, von denen drei Hauptprodukte sind, sind mit ihren EIC und den Sequenzen dargestellt.

Die Reinigung stellte zunächst jedoch ein schwieriges Problem dar. Eine einfach präparative HPLC, wie sie für Capistrin verwendet wurde, war ungenügend um ausreichend reines Lassopeptid zu erhalten. Die Retentionszeiten der Abbauprodukte waren auf der C18ec-Säule teilweise sehr ähnlich, weswegen eine zufriedenstellende Trennung der Produkte nicht möglich war. Zusätzlich stellte sich heraus, dass die Peptide bei längerer Lagerung bei RT verschiedene Reaktionen eingehen können. So kann es zur Methylierung der sauren Seitenketten in Gegenwart von Methanol und TFA, zur intramolekularen Desaminierung in Gegenwart von Wasser, sowie zu einer zunächst unbekanntem Umformung kommen, bei der sich die Retentionszeit aber nicht die Masse verändert. Die Nebenreaktionen konnten durch Vermeidung von Methanol mit Ausnahme der Extraktion, sowie möglichst kurzen Inkubationszeiten in Wasser oder anderen Lösungsmitteln und Lagerung bei möglichst tiefer Temperatur nahezu vollständig unterdrückt werden. Die weitere Reinigung und Auftrennung der Produkte erfolgte nach einer initialen präparativen HPLC mit einer HPLC im analytischen Maßstab. Mit dieser war die Trennung fast aller Produkte voneinander möglich, so dass

Astexin-1(19) in diesem Schritt als sauberes Produkt erhalten werden konnte. Lediglich das Abbauprodukt Astexin-1(18) konnte nicht vom Volllängenpeptid Astexin-1(23) getrennt werden. Dafür war noch eine weitere analytische HPLC mit einem anderen Säulenmaterial aber gleichen Laufmitteln notwendig. Das parentale Lassozeptid Astexin-1(23) konnte demzufolge nach drei Reinigungsschritten in 98 % Reinheit erhalten werden. Für die genauen Parameter der Reinigung sei auf den Methodenteil (siehe 4.4.2) verwiesen.

5.2.2 Thermische und proteolytische Stabilität

Da sich bereits während der Reinigung die Bildung eines Nebenprodukts mit der gleichen Masse abgezeichnet hatte, kam die Idee auf, dass es sich dabei um ein entfädelt Lassozeptid handelt. Es wurde daher angenommen, dass Astexin-1 im Kontrast zu Microcin J25 und Capistrain ein nicht hitzestabiles Lassozeptid darstellt. Folglich wurden die beiden isolierten Hauptprodukte Astexin-(19) und Astexin-1(23) auf ihre thermische Stabilität untersucht. Da die bisher bekannten Lassozeptide teilweise sogar das Autoklavieren bei 121 °C überstehen können [180], wurde Astexin-1(23) bei 95 °C für 1, 2, 4 und 8 h inkubiert. Dabei zeigte sich erneut das Auftreten eines zweiten Peaks im HPLC-Chromatogramm, mit der gleichen Masse aber einer unterschiedlichen Retentionszeit (Abbildung 21A). Diese Konvertierung war irreversibel, was einen eindeutigen Hinweis für eine weitreichende konformationelle Änderung der Struktur, nicht aber der chemischen Komposition darstellt. Für Lassozeptide ist dies höchstwahrscheinlich die Entfädelung zu einem verzweigt-zyklischen Makrolactampeptid. Dieser Entfaltungsprozess war nach einer Stunde bereits zu einem Großteil abgeschlossen und wurde daher nochmals bei niedrigeren Temperaturen untersucht (20 °C, 35 °C, 50 °C, 65 °C, 80 °C). Dabei zeigte sich, dass die Entfaltung bereits bei einer Temperatur von 50 °C einsetzt (Abbildung 21B). Ein quasi identisches Verhalten zeigte die verkürzte Variante Astexin-1(19), welches einen Hinweis gibt, dass die C-terminalen 4 aa nur einen sehr untergeordneten Einfluss auf die Gesamtstabilität haben (Abbildung 21C und D). Interessanterweise konnte bei Astexin-1(23) bei den Temperaturen 50 °C und 65 °C ein dritter Peak mit der gleichen Masse beobachtet werden. Dieser könnte zu einem Intermediat der Entfaltung gehören, bei dem der eigentliche Stöpsel den Ring bereits passiert hat, aber der Schwanz noch durch andere Effekte, wie z.B. der Gegenwart eines zweiten Stöpsels im Ring fixiert wird. Dieses Verhalten wurde nicht für Astexin-1(19) beobachtet, was vermutlich auf den deutlich kürzeren Schwanz zurückzuführen ist.

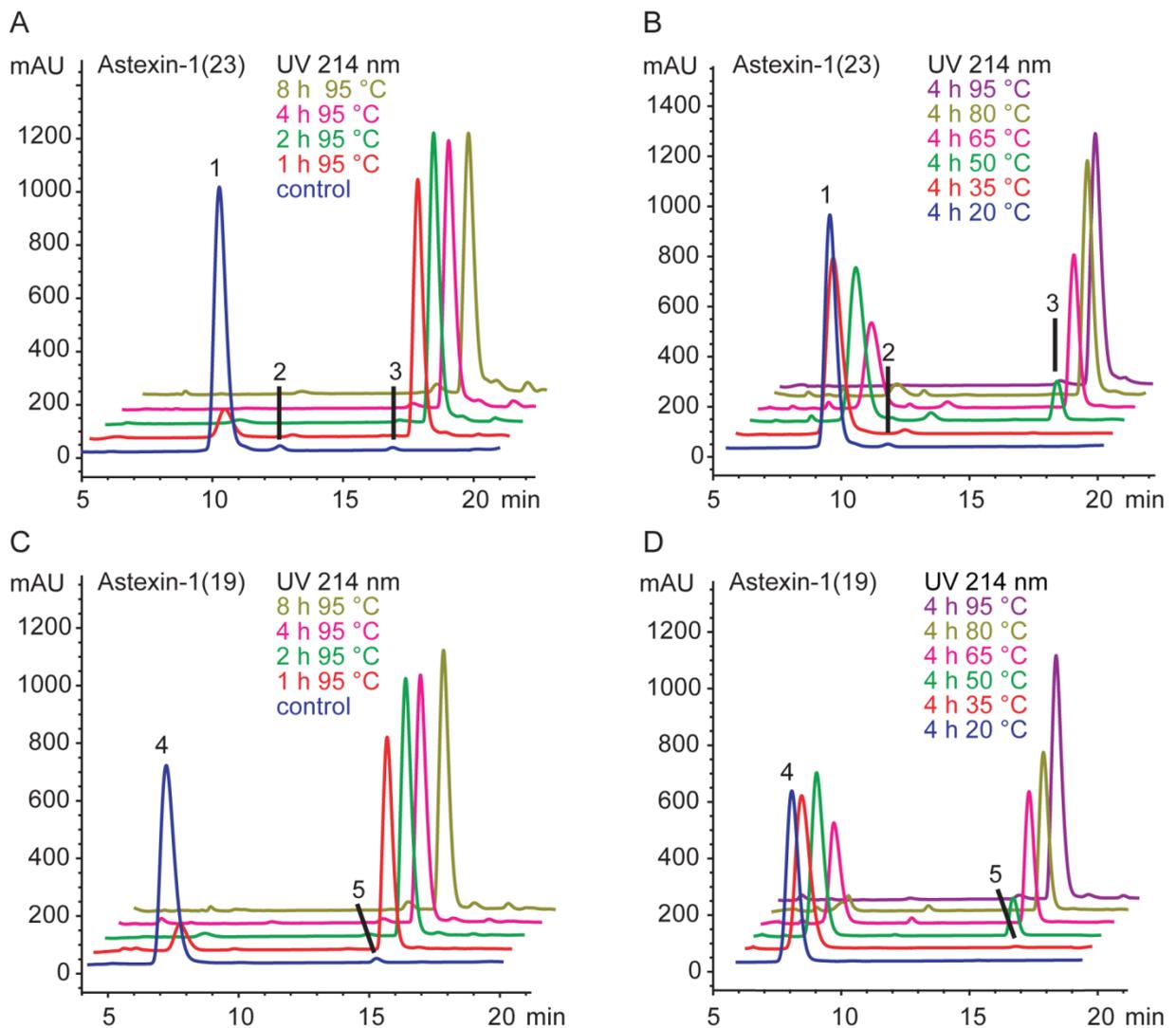


Abbildung 21 – HPLC-UV-Spuren der Hitzestabilität von Astexin-1(23) und Astexin-1(19). **A** Astexin-1(23) bei 95 °C, **B** Astexin-1(23) bei niedrigeren Temperaturen, **C** Astexin-1(19) bei 95 °C, **D** Astexin-1(19) bei niedrigeren Temperaturen. **1** Astexin-1(23) Lassozeptid, **2** Mögliches Entfaltungsintermediat von Astexin-1(23), **3** Astexin-1(23) entfädelt, **4** Astexin-1(19) Lassozeptid, **5** Astexin-1(19) entfädelt.

Für beide Astexin-1-Varianten wurden von Lassozeptid und entfädelt, verzweigt-zyklischem Peptid Fragmentierungsspektren aufgenommen (Abbildung 22A bis D). Dabei treten nur geringe Unterschiede in den Fragmentierungsmustern auf, die sich in der Intensität bestimmter Ionen bemerkbar machen. Die häufigsten Ionen bei der Fragmentierung eines Lassozeptids korrespondieren zum Verlust kleiner neutraler Moleküle wie Wasser oder Ammoniak, während verzweigt zyklische Peptide meist stärker fragmentieren und daher kleinere Fragmente die häufigsten Ionen darstellen. Mit der hier gewählten Fragmentierungsmethode und –energie war es nicht möglich die für Lassopeptide als typisch postulierten nicht-kovalent verknüpften, binären Peptidfragmente zu detektieren. Dazu wurde eine andere Analysemethode ausgewählt. Mit MALDI-TOF-TOF können ebenfalls Tandem-

Massenspektren erhalten werden, wobei größere Fragmentierungsenergien zur Verfügung stehen. Dadurch konnten tatsächlich Massensignale identifiziert werden, die zu möglichen binären Peptidfragmenten passen. Allerdings wurden die gleichen Fragmente auch in einer Probe detektiert, die nur verzweigt-zyklisches Peptid enthielt (Abbildung 22E). Daher kann die Detektion von Massen, die zu binären Fragmenten passen, nicht als Indiz für die Lassoform herangezogen werden. Erst eine MS³-Analyse könnte dies bestätigen, was mit einem MALDI-TOF-TOF gerätebedingt nicht möglich ist. Des Weiteren kann angenommen werden, dass für das Auftreten von binären Peptidfragmenten in hoher Intensität wie bei Microcin J25 ganz bestimmte Voraussetzungen gelten müssen, die längst nicht von allen Lassozeptiden erfüllt werden. Dazu zählen vermutlich das Vorhandensein eines ausreichend großen oberen Stöpsels, einer möglichst großen Schleife, sowie bevorzugt brechender Peptidbindungen (z.B. vor Prolin).

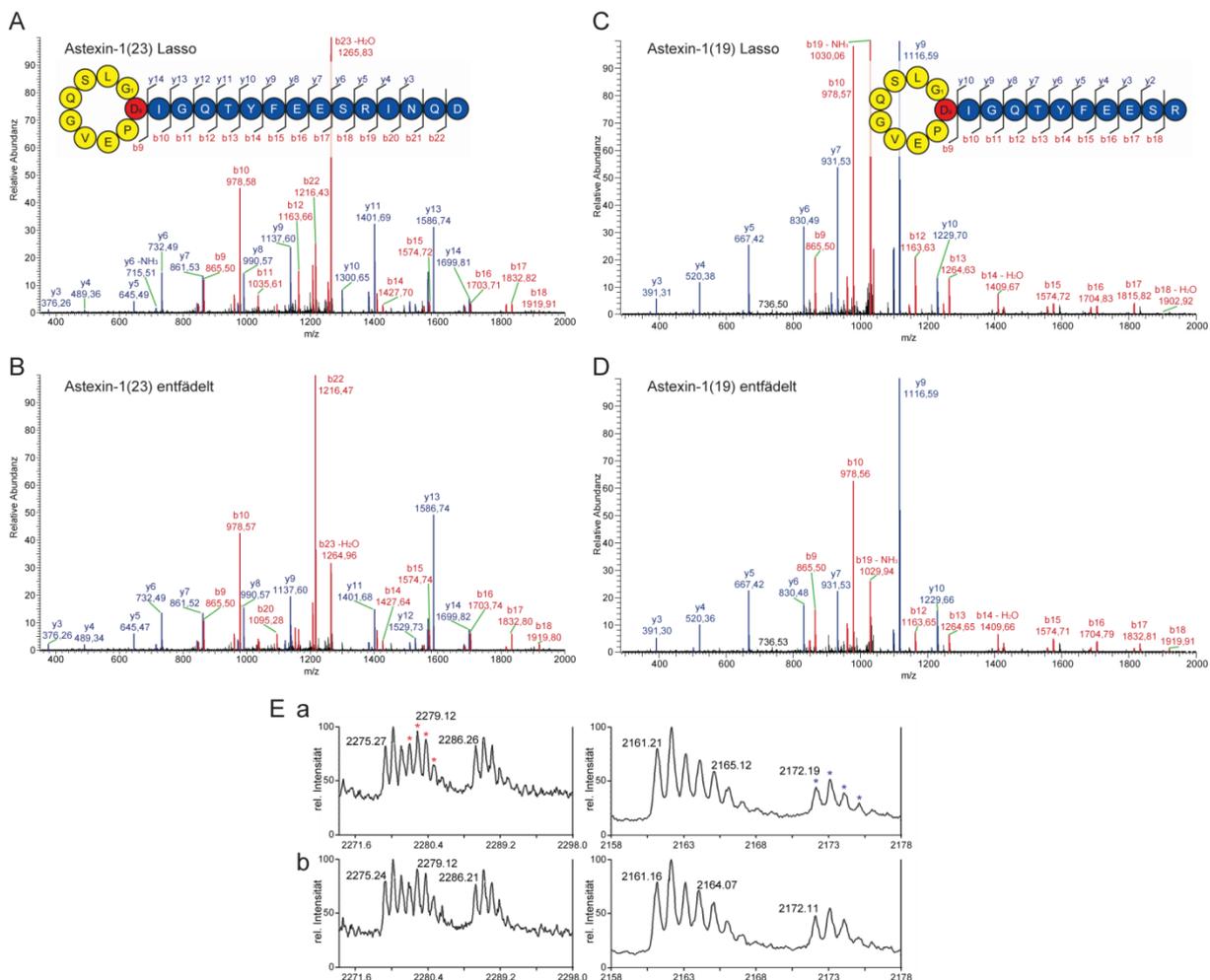


Abbildung 22 – ESI-MS² und MALDI-TOF-TOF Fragmentierungsspektren. **A** Astexin-1(23) Lassozeptid, **B** Astexin-1(23) entfädelte, **C** Astexin-1(19) Lassozeptid, **D** Astexin-1(19) entfädelte, **E** Ausschnitt aus dem MALDI-TOF-TOF Fragmentierungsspektrum von **a** Astexin-1(23) Lassozeptid und **b** entfädelte; als binäre Peptidfragmente postulierte Signale aus Maksimov *et al.* 2012 [215] sind mit Stern gekennzeichnet.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Stabilität von Lassopeptiden ist die Unempfindlichkeit gegen proteolytischen Verdau durch gewisse Enzyme. Dieser wurde für Microcin J25, Capistrin, Lariatrin und RP7155 untersucht [154,178,180,182]. Endopeptidaseverdau stellen jedoch immer eher spezielle Fälle dar, da sie mehr oder weniger spezifische Schnittsequenzen haben und teilweise sogar Makrozyklen angreifen können [180]. Ein nützlicheres Werkzeug stellt der Verdau mit Carboxypeptidase Y dar. Sie ist sehr unspezifisch und spaltet vom C-Terminus ausgehend sequentiell eine Aminosäure nach der anderen ab. Ein verzweigt-zyklisches Peptid ist sehr anfällig für diesen Verdau und wird in der Regel bis zum Ring abgebaut. Die Lassoform ist aber in der Lage Teile des extrazyklischen Bereichs zu schützen. Das Verhalten eines Peptids bei der Behandlung durch Carboxypeptidase Y erlaubt daher Rückschlüsse auf dessen Topologie und im konkreten Fall der Lassopeptide die Differenzierung zwischen Lasso- und entfaltetem Peptid. Nativ gefaltetes Astexin-1(19) wird von Carboxypeptidase Y nur sehr langsam durch Abspaltung lediglich einer Aminosäure zu Astexin-1(18) verdaut (Abbildung 23A). Ein vorher hitzebehandeltes und dadurch entfaltetes Astexin-1(19) wird schnell zu deutlich kürzeren Fragmenten (10, 11, 12, 13 aa) abgebaut (Abbildung 23B). Das gleiche sensible Verhalten zeigte sich für entfädertes Astexin-1(23). Auch hier wurden sehr kurze Abbauprodukte von 11, 12 und 13 aa Länge detektiert (Abbildung 23D). Interessanterweise war auch nativ gefaltetes Astexin-1(23) empfindlich gegenüber der Carboxypeptidase Y. Allerdings ging der Verdau eher langsam von statten und die entstehenden Produkte konnten als Astexin-1(21), (20) und (19) identifiziert werden (Abbildung 23C). Ausgehend von Astexin-1(23) konnten keine weiteren Verkürzungen als Astexin-1(19) beobachtet werden. Dies bedeutet, dass die vier C-terminalen Reste (Ile-Asn-Gln-Asp) relativ leicht zugänglich für Carboxypeptidase Y sind, während Arg19 stärker abgeschirmt zu sein scheint. Dies macht auch deutlich warum die $\Delta 4$ Variante Astexin-1(19) eines der Hauptprodukte der Fermentation darstellt aber eben auch Astexin-1(18) detektiert werden konnte.

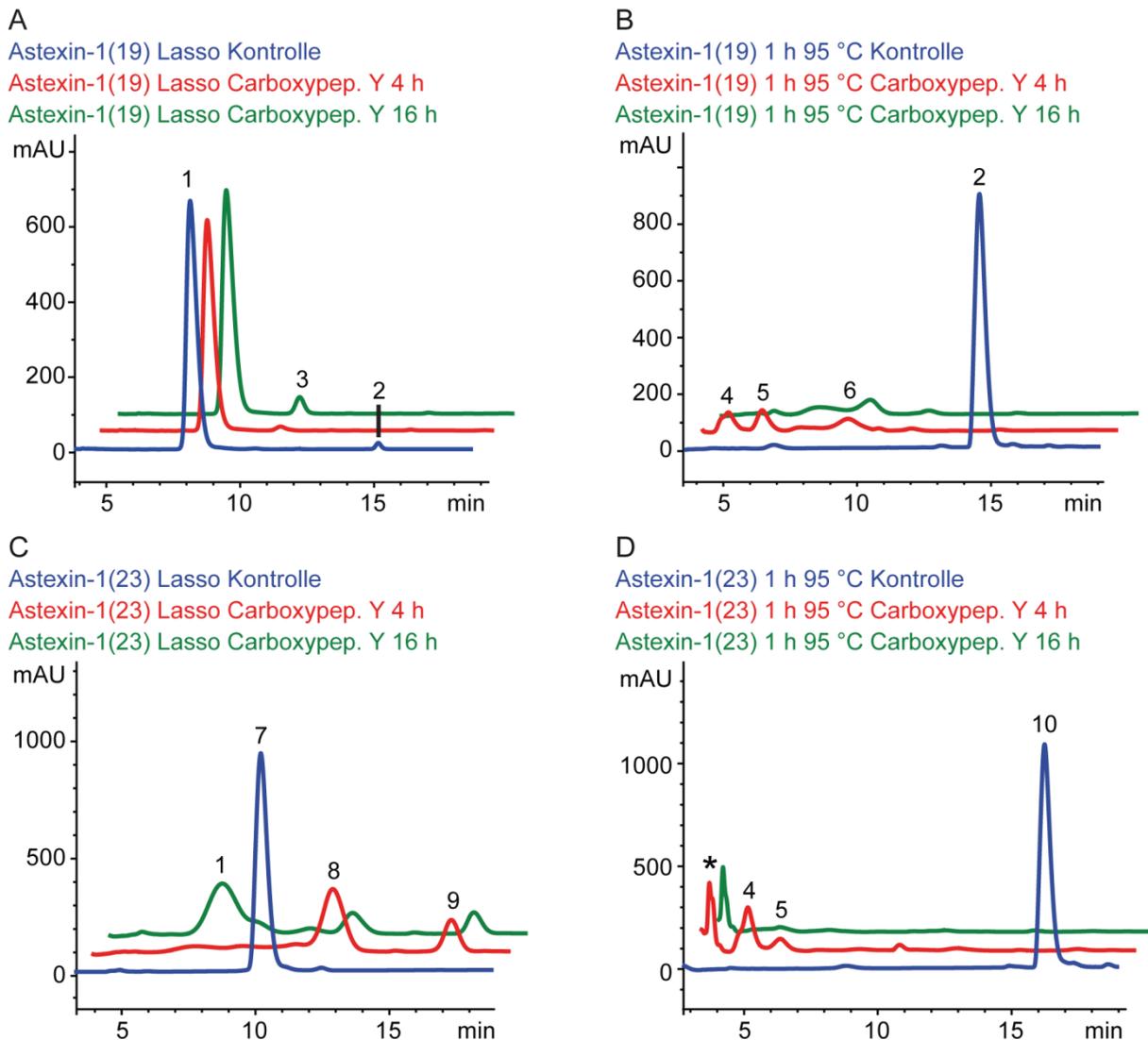


Abbildung 23 – HPLC-UV-Spuren der Carboxypeptidase Y Verdauung von Astexin-1(19) und (23) vor und nach Hitzebehandlung. A Astexin-1(19) Lassozeptid, **B** Astexin-1(19) hitzebehandelt, **C** Astexin-1(23) Lassozeptid, **D** Astexin-1(23) hitzebehandelt, **1** Astexin-1(19) Lassozeptid, **2** Astexin-1(19) entfädelt, **3** Astexin-1(18) Lassozeptid, **4** Astexin-1(12) und (13), **5** Astexin-1(11), **6** Astexin-1(10), **7** Astexin-1(23) Lassozeptid, **8** Astexin-1(21) Lassozeptid, **9** Astexin-1(20) Lassozeptid, **10** Astexin-1(23) entfädelt, * nicht identifiziert

Um die Rolle des Arg19-Restes, welcher in Astexin-1(19) die C-terminale Aminosäure darstellt, weiter zu ergründen, wurde ein Trypsin-Verdauung durchgeführt. Sollte Arg19 als einziger im Peptid vorhandener und von Trypsin erkennbarer Rest tatsächlich die Rolle des Stöpsels einnehmen, wäre er vom Makrolactamring abgeschirmt und somit nicht zugänglich. Dazu wurden Astexin-1(23) in Lasso und entfalteter Form mit Trypsin verdaut (Abbildung 24C und D). Beide wurden zu Astexin-1(19) in Lasso- bzw. verzweigt-zyklischer Topologie abgebaut, wobei die Reaktion beim entfalteten Astexin-1(23) schneller verlief. Dies zeigt in Übereinstimmung mit den Carboxypeptidase-Y-Experimenten die Zugänglichkeit des Arg19-Restes.

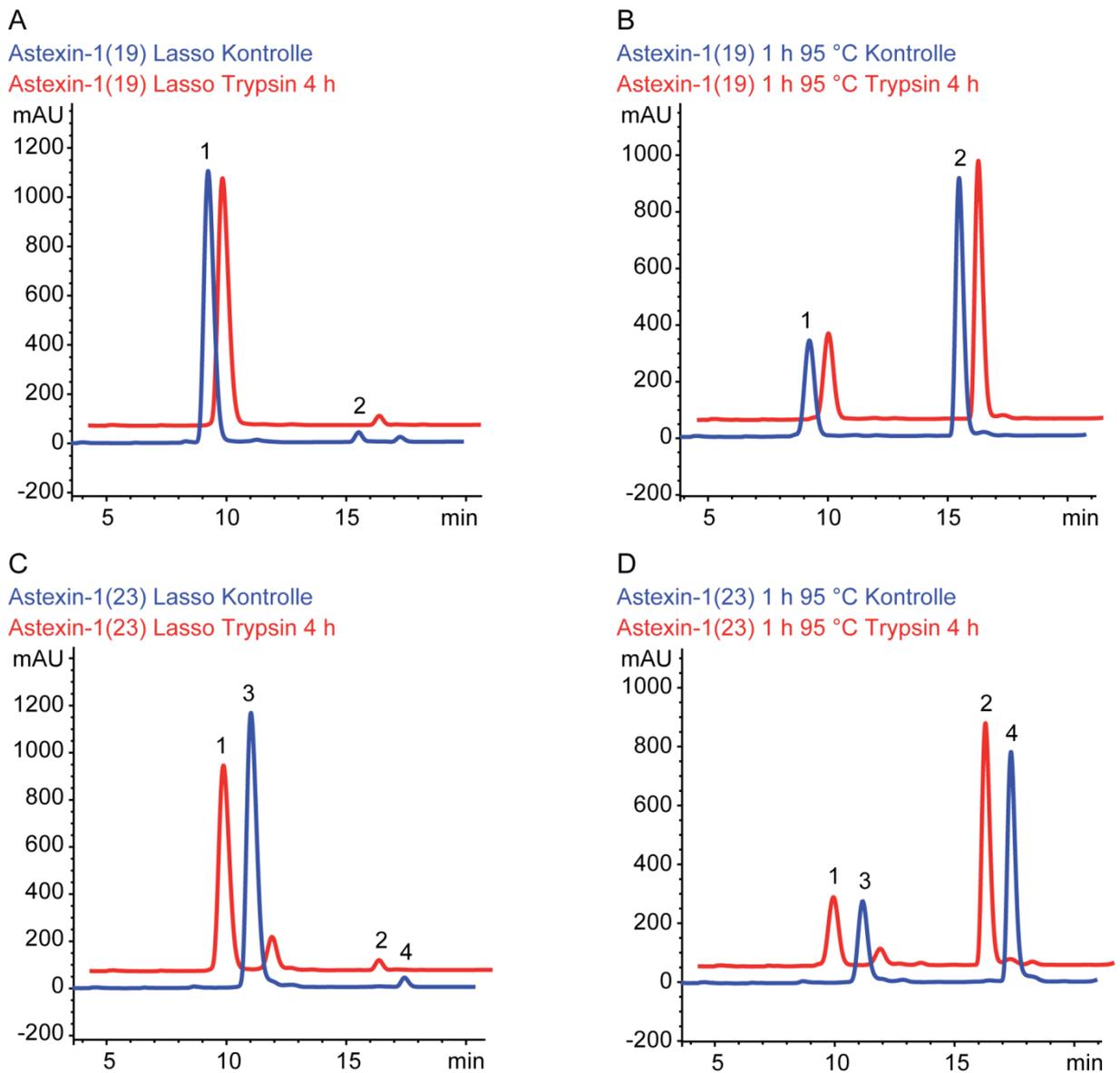


Abbildung 24 – HPLC-UV-Spuren der Trypsinverdaue von Astexin-1(19) und (23) vor und nach Hitzebehandlung. **A** Astexin-1(19) Lassozeptid, **B** Astexin-1(19) hitzebehandelt, **C** Astexin-1(23) Lassozeptid, **D** Astexin-1(23) hitzebehandelt, **1** Astexin-1(19) Lassozeptid, **2** Astexin-1(19) entfädelt, **3** Astexin-1(23) Lassozeptid, **4** Astexin-1(23) entfädelt.

5.2.3 Mutationsstudie

Da die schlechte Löslichkeit der Maturierungsenzyme bei der Untersuchung der Biosynthese von Lassozeptiden ein nahezu unüberwindbares Hindernis darstellt, hat sich die Mutationsanalyse als nützlicher Ansatz entpuppt. Die Mutationsstudien von Microcin J25 [185], Capistrain [182] und parallel zu dieser Arbeit die Studie an den Caulosegninen [220] haben gezeigt, dass Informationen über die Spezifität der Biosynthesemaschinerie oder die

relevanten Reste für die Bioaktivität erhalten werden können. Von Astexin-1 wurden mehrere Sets an Mutanten generiert um die Spezifität der prozessierenden Enzyme zu untersuchen, die Position von wichtigen Resten in der Sequenz, insbesondere im extrazyklischen Teil, zu identifizieren und die thermische Stabilität des Lasso-peptids zu verbessern.

Das bisherige Wissen über die Biosynthesemaschinerie suggeriert, dass nur wenige Reste große Relevanz für die Erkennung besitzen und demzufolge nur an diesen Positionen Substitutionen schlecht toleriert werden. Diese Reste sind ein in bisher allen bekannten Lasso-peptidvorläufern konserviertes Threonin an Position -2, sowie die am Ringschluss beteiligten Aminosäuren, in diesem Fall Gly1 und Asp9. Daher wurden folgende Varianten erzeugt: T-2A, T-2V, T-2S, R-1A, sowie G1C und D9E. Die Ergebnisse für den Austausch des konservierten Threonins stehen im Kontrast zu früheren Studien an Microcin J25 und Capistrain. Von den drei erzeugten Varianten konnten zwei nur in Spuren (T-2A und T-2S) und die dritte (T-2V) gar nicht detektiert werden (Abbildung 25). Diese geringere Toleranz der Astexin-1-Biosynthesemaschinerie gegenüber Substitutionen des Thr-2 ist bei den Microcin-J25- und Capistrainsystemen nicht zu beobachten. Letztere produzieren mit dem Wildtyp vergleichbare Mengen nach dem Austausch von Threonin mit der chemisch verschiedenen, aber sterisch ähnlich großen Aminosäure Valin [184]. Obwohl die Auswirkung der R-1A-Substitution wesentlich weniger drastisch ist, war die Produktion dieser Variante nur 20% vom nativen System. Dies ist zwar im Einklang mit der qualitativen Mutationsstudie von Capistrain, in welcher das Histidin an der letzten Position des Leaderpeptids ausgetauscht werden konnte [182], aber es zeigt, dass diese Position zwar nicht essentiell ist aber eine Rolle bei der effektiven Erkennung durch die Prozessierungsenzyme spielt. Zusätzlich geht aus den *Genome Mining* Daten hervor, dass in Proteobakterien eine deutliche Präferenz für eine positiv geladene Aminosäure (His, Lys, Arg) an dieser Position zu herrschen scheint (Anhang Tabelle 1).

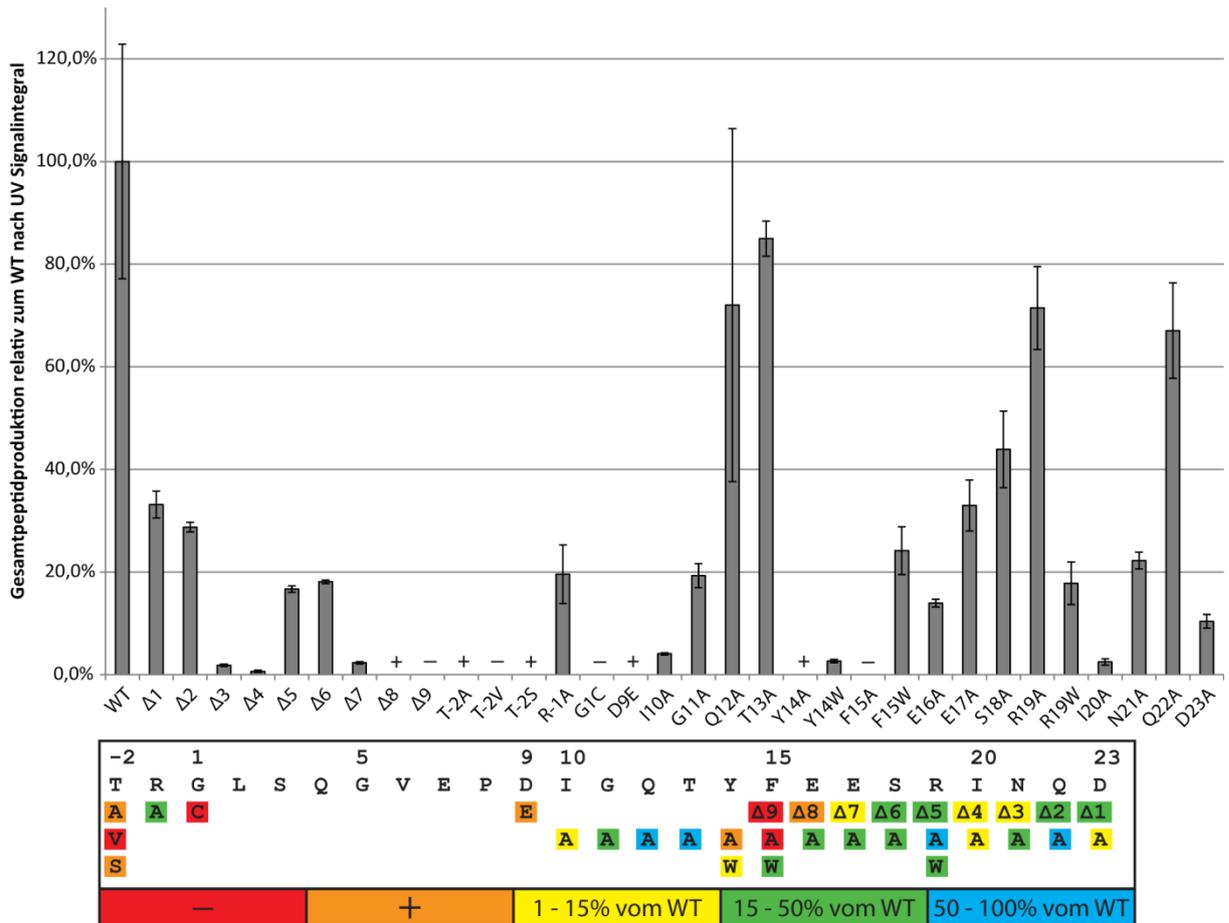


Abbildung 25 – Produktion der mutierten Varianten im Vergleich zur nativen Astexin-1 Produktion. Darstellung als Balkendiagramm und farbcodierter Sequenzdarstellung. Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen; Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar; + = per MS detektiert, - = nicht per MS detektiert.

Die Mutagenesestudien von Microcin J25 und Capistruin haben gezeigt, dass die an der Makrolactamringbildung beteiligten Aminosäuren sehr spezifisch erkannt werden und nicht austauschbar sind. Dies wird bei Astexin-1 für das Glycin an Position 1 betätigt, da ein Austausch zu Cystein die Produktion vollständig unterdrückte. Der Austausch des Aspartats gegen Glutamat an Position 9 (D9E) führte hingegen zu einem zwar schlecht produzierten, aber per MS detektierbaren Produkt. Die Retentionszeit dieser Variante war im Vergleich zum nativen Peptid um drei Minuten nach hinten verschoben, was durch eine chemisch so konservierte Mutation (Asp zu Glu) nicht vorkommen sollte. Zusätzlich zeigte die Variante nach Hitzeeinwirkung auf einen Fermentationsextrakt keine signifikante Änderung des chromatographischen Verhaltens. Des Weiteren wurde die proteolytische Stabilität der Variante untersucht in dem ein getrockneter Pelletextrakt einer Fermentation dieser Variante mit Carboxypeptidase Y verdaut wurde. In der darauf folgenden HPLC-MS Analyse zeigte

sich die Empfindlichkeit der D9E Variante gegen den proteolytischen Abbau (Abbildung 26). Daher ist anzunehmen, dass diese Variante gerade im Kontext der bereits niedrigen thermischen Stabilität des nativen Astexin-1 durch Vergrößerung des Makrolactamrings um ein Atom nicht mehr in der Lage ist eine stabile Lassoform zu erhalten. Dies würde auch die generelle niedrige Produktion erklären.

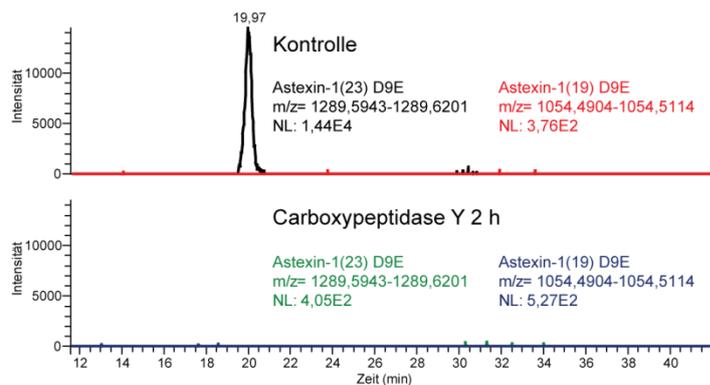


Abbildung 26 – HPLC-MS-Analyse des Carboxypeptidase Y Verdaus der D9E-Variante. Dargestellt als EIC der beiden für gewöhnlich auftretenden Hauptprodukte.

Das zweite große Set an Mutanten wurde generiert um die Toleranz im extrazyklischen Teil des Lasso-peptids für Substitutionen für eine mögliche Anwendung als *scaffold* z.B. für das *epitope-grafting* zu erörtern [222]. Zusätzlich können damit für die Biosynthese wichtige Reste identifiziert werden, die höchstwahrscheinlich an der Stabilisierung der Lassoform beteiligt sind. Dazu wurde ein Alaninscan der gesamten Schwanzsequenz von 14 Aminosäuren durchgeführt (Abbildung 25, Tabelle 13). Die allgemeine Toleranz gegen Alaninsubstitutionen war relativ gut, mit Ausnahme der Varianten Y14A und F15A, die nicht oder nur in Spuren per HPLC-MS detektiert werden konnten. Erstaunlicherweise hatten die meisten Mutationen, die die chemische und/oder sterische Beschaffenheit der Aminosäuren änderten (wie G11A, Q12A, T13A, E16A, E17A, S18A, R19A, N21A, Q22A und D23A), nur moderate Auswirkungen auf die Astexin-1-Produktion. Die sehr schlechte Produktion der Varianten Y14A und F15A deutet auf eine wichtige Rolle bei der Erkennung durch die Biosynthesemaschinerie oder dem Erhalt der Lassostruktur, also der direkten Involvierung als Stöpsel, hin. Um die konkrete Rolle dieser beiden Reste Tyr14 und Phe15 besser zu verstehen, ihre mögliche Funktion als Stöpsel zu belegen und Arg19 als einzige andere große Aminosäure als möglichen Stöpsel auszuschließen, wurde eine Kombination aus MS²-Analysen, thermischen und Carboxypeptidase-Y-Stabilitätsuntersuchungen eingesetzt. Den Ergebnissen zur thermischen und proteolytischen Stabilität der Y14A Variante nach zu

urteilen, liegt diese bereits bei der Isolierung entfädelt vor (Abbildung 27). Im Gegensatz dazu verhielt sich die R19A Variante genauso thermolabil wie natives Astexin-1, liegt aber nach der Isolierung in der Lassofaltung vor. Dieses Ergebnis, die vorherigen Beobachtungen zum Verhalten von Astexin-1(19), sowie die Detektion von Astexin-1(18) in den heterologen Fermentationen lassen Arg19 bereits als möglichen Stöpsel ausscheiden. Allerdings kann aufgrund der völligen Abstinenz der F15A Variante nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob Phe15 oder Tyr14 der Stöpsel zur sterischen Fixierung der Lassostruktur ist.

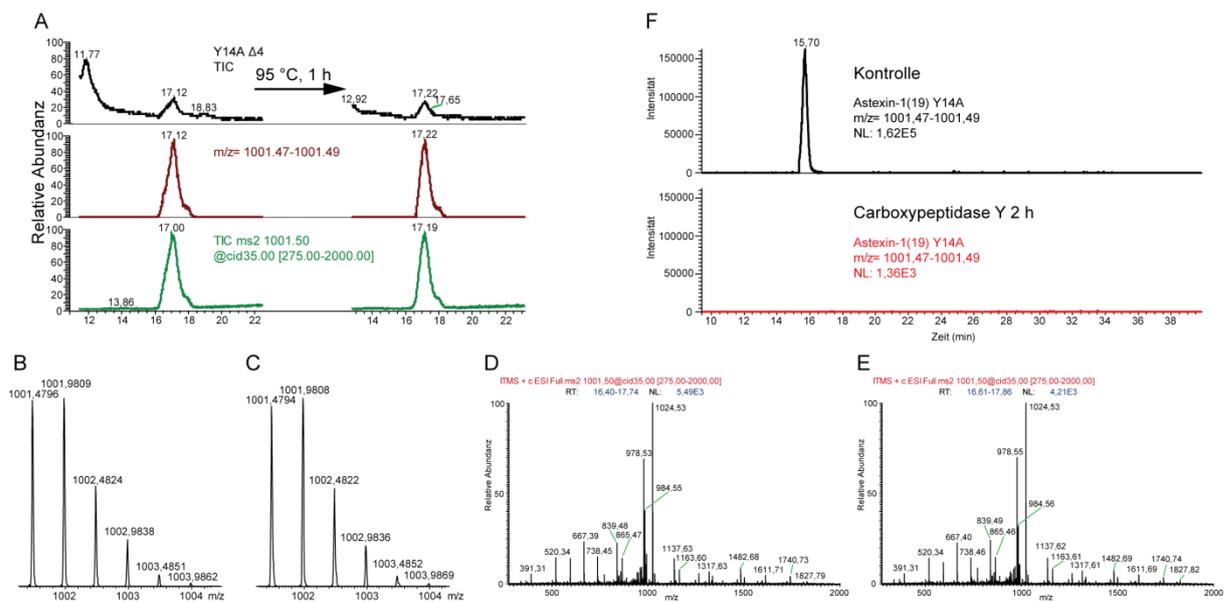


Abbildung 27 – HPLC-MS-Analyse der Entfädung und des Carboxypeptidase Y Verdau der Y14A-Variante. A Entfädung dargestellt als TIC und EIC; MS-Spektren des Peaks B vor und C nach Hitzeeinwirkung; MS²-Spektrum des Peaks D vor und E nach Hitzeeinwirkung, F Carboxypeptidaseverdau dargestellt als EIC des Hauptprodukts mit 19 aa Länge.

Zur weiteren Studie der extrazyklischen Sequenz, deren ungewöhnlicher Länge und um wichtige Bereiche zu identifizieren, wurden neun Verkürzungsmutanten Δ1 bis Δ9 generiert und analysiert, bei denen die entsprechenden Aminosäurecodons gegen das Opal-Stoppocodon TGA ausgetauscht wurden. Es konnten Verkürzungsvarianten von Astexin-1(22) (Δ1) bis Astexin-1(15) (Δ8) durch MS detektiert werden. Während die Δ8 Variante nur sehr schlecht produziert wurde, konnten die Varianten Astexin-1(22) (Δ1) bis Astexin-1(16) (Δ7) auch auf ihre thermische Stabilität hin mit HPLC-MS und MS² untersucht werden. Astexin-1(17) und (16) wurden sogar isoliert und nach Reinigung auf thermische und proteolytische Stabilität hin analysiert. Die aus diesen Studien erhaltenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass alle verkürzten Varianten bis Astexin-1(16) (Δ7) in Lassotopologie vorliegen und sich genauso hitzelabil wie natives Astexin-1(23) verhalten (Abbildung 28). Diese Ergebnisse bekräftigen

nochmals die vorherigen Resultate, welche die Reste Tyr14 und Phe15 als Schlüsselemente direkt mit der Stabilisierung der Lassostruktur in Verbindung bringen, während die Rolle eines Stöpsels für Arg19 vollständig ausgeschlossen werden kann.

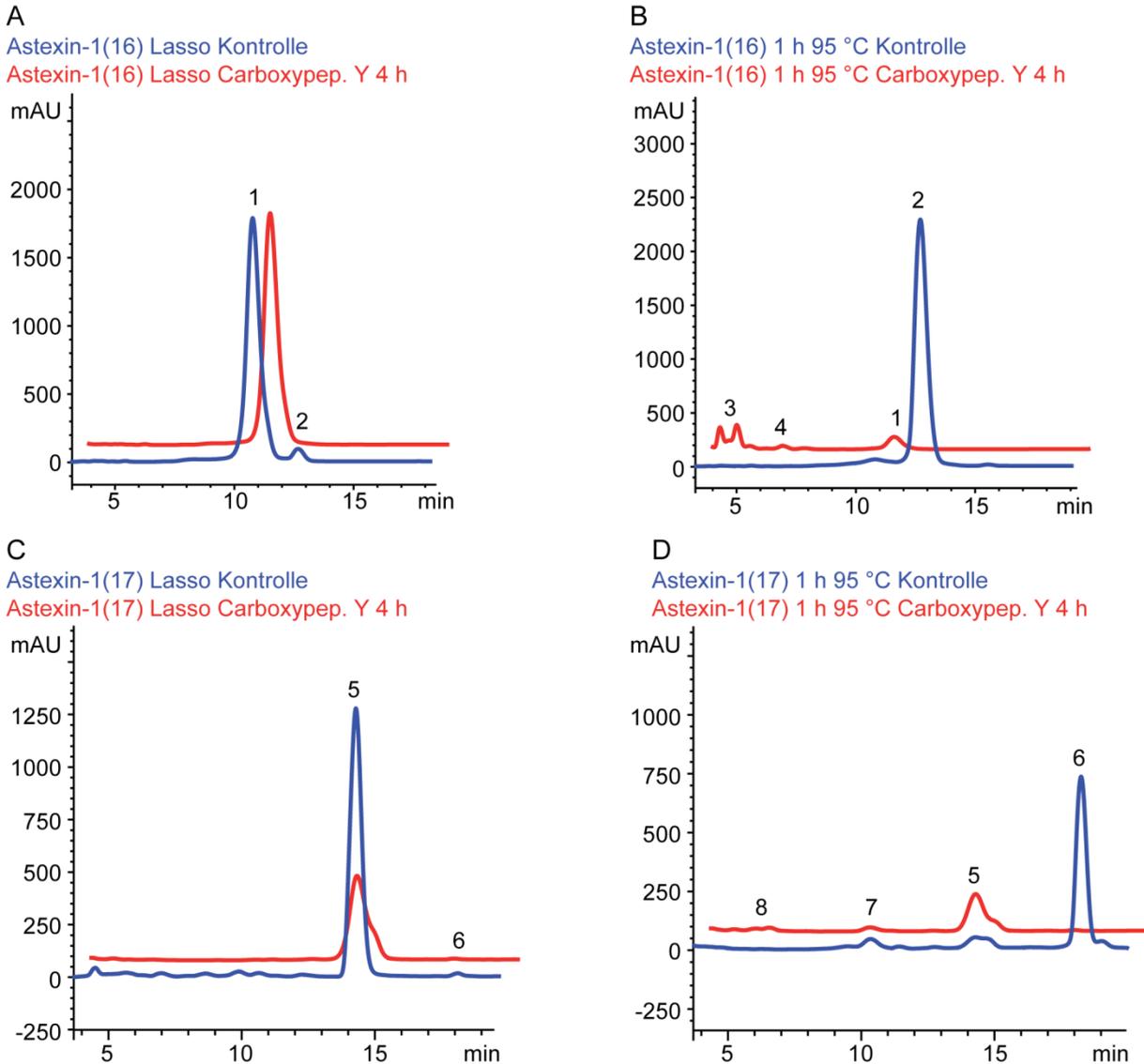


Abbildung 28 – HPLC-UV-Spuren der Carboxypeptidase Y Verdaue der Verkürzungsmutanten $\Delta 7$ und $\Delta 6$.
A Variante $\Delta 7$ Astexin-1(16) Lassozeptid, **B** Variante $\Delta 7$ Astexin-1(16) hitzebehandelt, **C** Variante $\Delta 6$ Astexin-1(17) Lassozeptid, **D** Variante $\Delta 6$ Astexin-1(17) hitzebehandelt, **1** Astexin-1(16) Lassozeptid, **2** Astexin-1(16) entfädelt, **3** Astexin-1(11) und (13), **4** Astexin-1(10), **5** Astexin-1(17) Lassozeptid, **6** Astexin-1(17) entfädelt, **7** Astexin-1(14), **8** Astexin-1(12) und (13).

Die letzte der eingangs erwähnten drei Gruppen von Mutanten beschäftigte sich mit der Frage ob das recht hitzelabile, native Astexin-1 durch Inkorporation einer Punktmutation an der richtigen Stelle stabilisiert und dadurch eine hitzestabile Variante erzeugt werden kann. Dazu wurden die drei anfangs als Stöpsel in Betracht gezogenen Reste Tyr14, Phe15 und Arg19

gegen Tryptophan ausgetauscht. Da durch die vorangegangenen Mutationsstudien Arg19 als Stöpsel praktisch bereits ausgeschlossen werden konnte, stellt diese Mutante auch eine Art Negativkontrolle dar, die zeigen sollte, dass selbst die größte proteinogene Aminosäure Tryptophan nur dann in der Lage ist ein Lasso gegen thermische Entfaltung zu stabilisieren, wenn sie an der richtigen Position liegt. HPLC-MS-Analytik, Tandem-Massenspektrometrie und der Carboxypeptidase-Y-Verdau zeigten eindeutig, dass die F15W Variante von Astexin-1 hitzestabil ist, während beide anderen Varianten (Y14W, R19W) sich wie natives Astexin-1 unter thermisch denaturierenden Bedingungen verhalten (Abbildung 29). Dies bestätigt zum einen endgültig die Rolle des Phenylalanins an Position 15 als der wichtigste Rest für den Erhalt der Lassoform, zum anderen liegt hier das erste Beispiel der Umwandlung eines nativ hitzelabilen in ein hitzestabiles Lassopeptid durch eine rationale Veränderung seiner Primärstruktur durch Mutagenese vor.

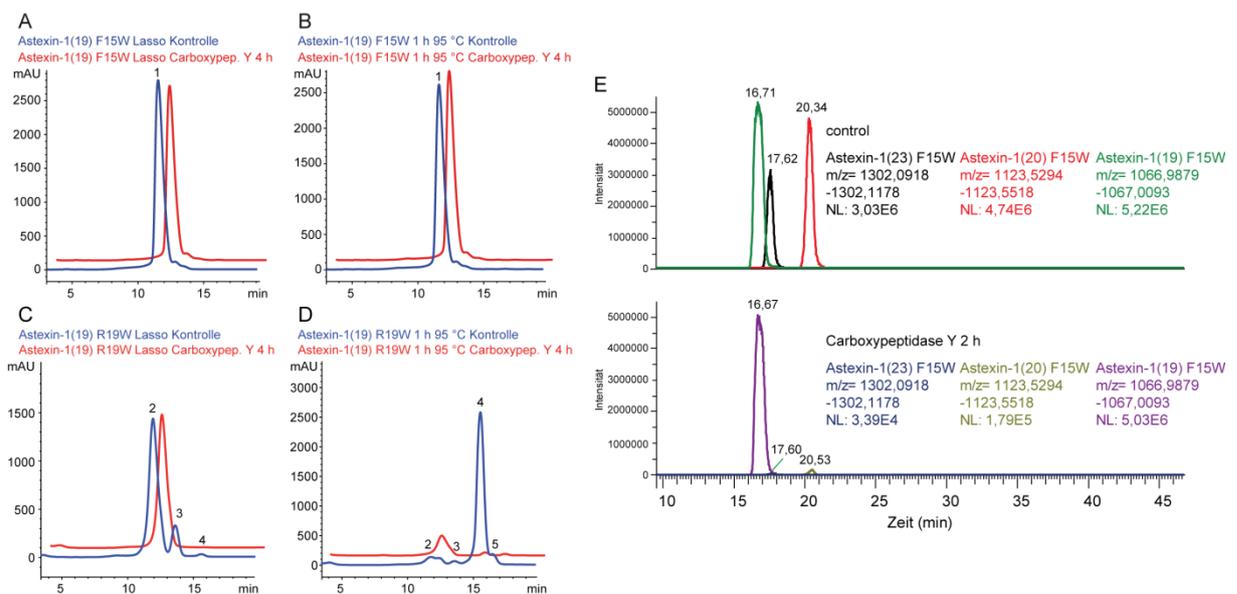


Abbildung 29 – HPLC-UV-Spuren und HPLC-MS-Analyse der Carboxypeptidase Y Verdau der F15W- und R19W-Variante. **A** Astexin-1(19) F15W-Variante Lassopeptid, **B** Astexin-1(19) F15W-Variante hitzebehandelt, **C** R19W-Variante Lassopeptid, **D** R19W-Variante hitzebehandelt, **1** Astexin-1(19) F15W-Variante Lassopeptid, **2** Astexin-1(19) R19W-Variante Lassopeptid, **3** Astexin-1(21) R19W-Variante, **4** Astexin-1(19) R19W-Variante entfädelt, **5** Astexin-1(21) R19W-Variante entfädelt. **E** HPLC-MS-Analyse eines Extraktverdaus der F15W-Variante dargestellt als EIC der drei Hauptprodukte.

Tabelle 13 – Zusammenfassung der aus der Mutationsstudie erhaltenen Daten bezüglich Produktion, Thermo- und proteolytischer Stabilität.

Mutante	Rel. Produktion durch Integration des UV-Signals in %	Thermostabil	Stabilität gegen Carboxypeptidase Y Verdau
WT	100 ± 23	nein	entfaltet nicht stabil
T-2A	durch MS detektiert	*	*
T-2V	nicht durch MS detektiert	-	-
T-2S	durch MS detektiert	*	*
R-1A	20 ± 6	*	*
G1C	nicht durch MS detektiert	-	-
D9E	durch MS detektiert	bereits entfaltet	nicht stabil
I10A	4,1 ± 0,2	nein	-
G11A	19 ± 2	nein	-
Q12A	72 ± 34	nein	-
T13A	85 ± 3	nein	-
Y14A	durch MS detektiert	bereits entfaltet	nicht stabil
F15A	nicht durch MS detektiert	-	-
E16A	14,0 ± 0,8	nein	-
E17A	33 ± 5	nein	-
S18A	44 ± 8	nein	-
R19A	72 ± 8	nein	-
I20A	2,5 ± 0,6	nein	-
N21A	22,3 ± 1,6	nein	-
Q22A	67 ± 9	nein	-
D23A	10,4 ± 1,3	nein	-
Δ1 aa	33 ± 3	nein	-
Δ2 aa	28,8 ± 0,9	nein	-
Δ3 aa	1,9 ± 0,2	nein	-
Δ4 aa	0,7 ± 0,2	nein	-
Δ5 aa	16,7 ± 0,6	nein	-
Δ6 aa	18,1 ± 0,3	nein	entfaltet nicht stabil
Δ7 aa	2,3 ± 0,2	nein	entfaltet nicht stabil
Δ8 aa	durch MS detektiert	bereits entfaltet	-
Δ9 aa	nicht durch MS detektiert	-	-
Y14W	2,7 ± 0,3	nein	-
F15W	24 ± 5	ja	stabil
R19W	18 ± 4	nein	entfaltet nicht stabil

* = gleiche Sequenz wie WT, - = nicht getestet

5.2.4 3D-Strukturbestimmung mittels NMR-Spektroskopie

Obwohl die Mutations- und Stabilitätsstudien bereits eine gute Vorhersage der Lassostruktur von Astexin-1 in Bezug auf Ringgröße und Stöpsel ermöglichen, ist die exakte Bestimmung der 3D-Struktur nur durch röntgenkristallografische oder NMR-spektroskopische Methoden möglich. Wie bereits zu Beginn dieses Kapitels erwähnt, wurde der Naturstoff Astexin-1 auch von Link und Mitarbeitern als *proof-of-principle* im Rahmen eines *precursor*-zentrierten *Genome Minings* isoliert und auch NMR-spektroskopisch untersucht [215]. Dabei wurde eine Struktur (PDB ID code 2LTI) für die Vollängenvariante Astexin-1(23) in DMSO-*d*₆ bei 295 K mit folgenden strukturellen und spektroskopischen Merkmalen vorgeschlagen:

1. Astexin-1(23) besitzt eine Lassostruktur,
2. die Isopeptidbindung wird zwischen Gly1 und Asp9 gebildet,
3. eine acht Aminosäuren lange Schleife oberhalb und ein sechs Aminosäuren langer Schwanz unterhalb des Rings, wobei Glu17 oberhalb, Ser18 mitten im Ring und Arg19 unterhalb des Rings liegen,
4. sehr ungewöhnliche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Schleife oberhalb und dem Schwanz unterhalb des Rings, die die Lassostruktur stabilisieren und
5. eine sehr geringe chemische Verschiebungsverteilung der ¹H-Signale der Amidprotonen von nur 0,7 ppm und der αH-Protonen von 1,0 ppm.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Mutations- und Stabilitätsuntersuchungen stehen im Einklang mit den Merkmalen 1 und 2, sind jedoch im Widerspruch zu Punkt 3. Die Eigenschaften 4 und 5 sind ungewöhnlich für die meisten der bisherigen NMR-Strukturen von Lassozeptiden [223].

Diese widersprüchlichen Ergebnisse und die Tatsache, dass Astexin-1(19) und Astexin-(23) sehr hydrophile Peptide sind, ermutigten uns die 3D-Strukturen dieser Peptide in wässriger Lösung mit Hilfe von ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren zu untersuchen. Proben beider Peptide wurden in 250 µL H₂O/D₂O (9:1) in einer Endkonzentration von ca. 5.5 mM gelöst. Es wurden ¹H Spektren von Astexin-1(23) in 5 K Schritten zwischen 278 und 298 K aufgenommen (Abbildung 30). Die Spektren sind im Bereich zwischen 9,65 - 6,75 ppm gezeigt und die Signale der Amidprotonen sind entsprechend ihrer Zuordnung beschriftet. Die Signale sind sehr gut aufgelöst und zeigen eine breite Verteilung sowie deutliche Unterschiede in der Temperaturabhängigkeit, was auf eine stabile Lassoform des Peptids schließen lässt [223]. Die beste Signalverteilung konnte bei 288 K beobachtet werden,

wodurch eine vollständige Zuordnung (Anhang Tabelle 2) durch Standardmethoden erzielt werden konnte.

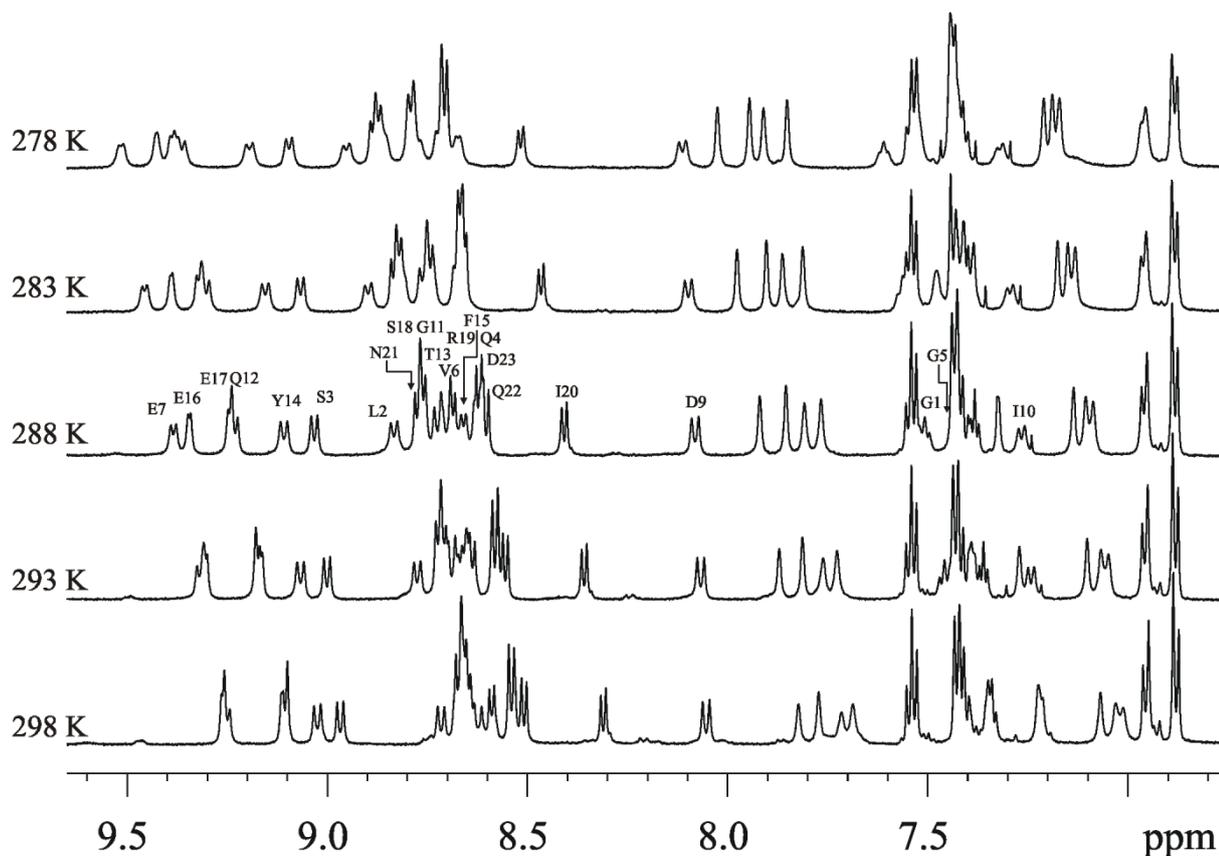


Abbildung 30 – Ausschnitt aus dem ¹H-NMR in der Region 9,65 – 6,75 ppm von Astexin-1(23) in H₂O/D₂O (9:1) bei verschiedenen Temperaturen mit vollständiger Zuordnung der Amidprotonen.

Die Spektren von Astexin-1(19) wurden in gleicher Weise und bei den gleichen Temperaturen erhalten (Abbildung 31, Anhang Tabelle 3). Ein genauer Vergleich der beiden Spektren zeigt, dass das Spektrum von Astexin-1(19) identisch mit dem Spektrum von Astexin-1(23) ist, wenn die Signale der letzten vier Aminosäuren (I20-N21-Q22-D23) subtrahiert werden. Aufgrund dieser Ähnlichkeit der Spektren und des sehr ähnlichen Verhaltens bei Temperaturänderung, kann angenommen werden, dass beide Peptide 3D-Strukturen mit großer Ähnlichkeit einnehmen. Die letzten vier Aminosäuren haben demzufolge nur einen kleinen Einfluss auf die Kernstruktur des Lasso-peptids unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen. Daher wurde die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur an Astexin-1(19) durchgeführt.

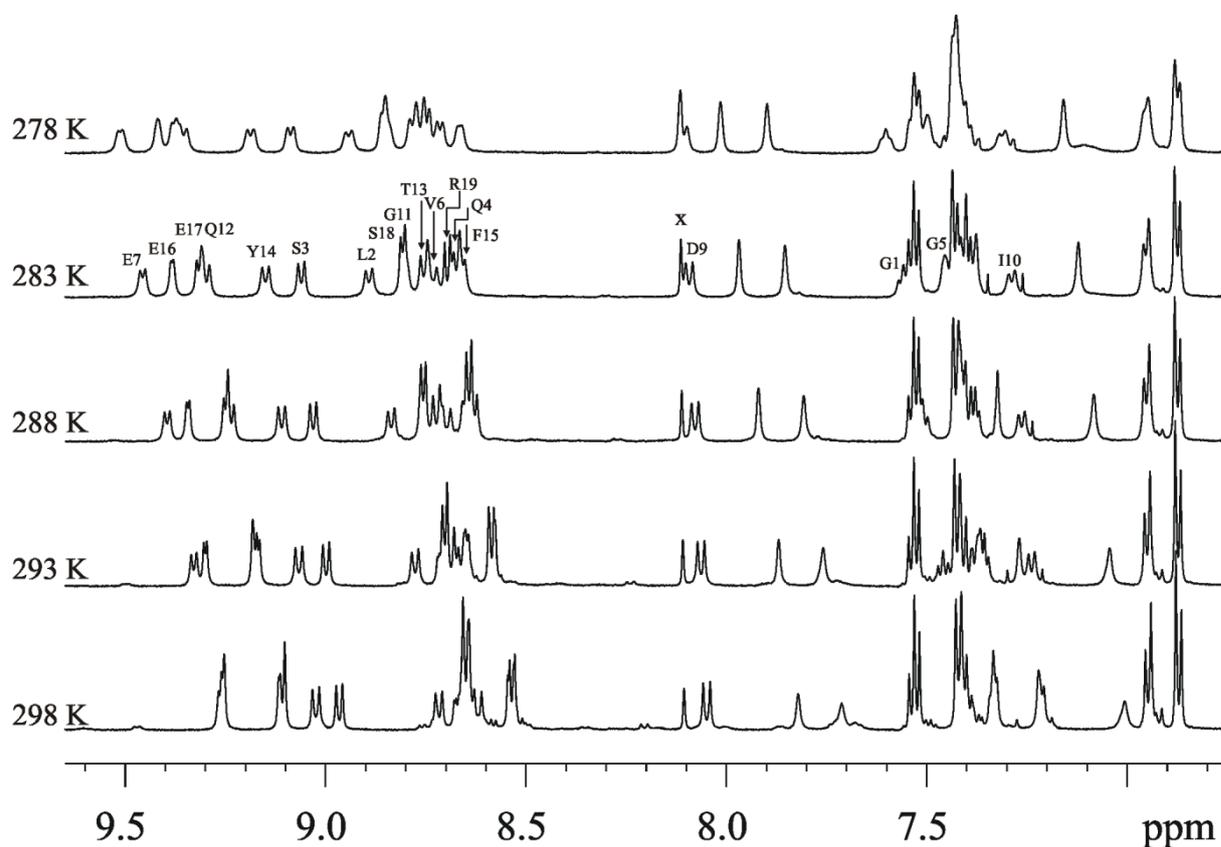


Abbildung 31 – Ausschnitt aus dem ^1H -NMR in der Region 9,65 – 6,75 ppm von Astexin-1(19) in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) bei verschiedenen Temperaturen mit vollständiger Zuordnung der Amidprotonen. X bezeichnet eine unbekannte Verunreinigung.

Aus den DQF-COSY und NOESY-Spektren (Anhang Abbildung 1) konnten alle αH und NH sequentiell zugeordnet werden. Mit Hilfe der DQF-COSY und TOCSY-Spektren konnten alle Seitenketten identifiziert werden. Es zeigte sich eine reine Konformation mit starken NOE Kontakten zwischen dem Amidproton des Glycins an Position 1 und dem βH von Aspartat 9, die einen internen Ringschluss zwischen diesen Resten beweisen. Starke αH - δH NOESY-Kreuzsignale zeigen die trans-Konformation des Prolinrests an Position 8 an. Die Temperaturabhängigkeit der ^1H -Amidsignale im Bereich zwischen 278 und 298 K der Aminosäuren Asp9, Tyr14 und Phe15 war sehr gering. Diese Amidsignale zeigten weiterhin eine starke Verzögerung beim Austausch gegen D_2O . Diese Beobachtungen deuten eine sehr starke Abschirmung der Amidprotonen dieser Aminosäuren gegen das umgebende Solvens an, was bei einem verzweigt-zyklischen Peptid nicht der Fall wäre. Zudem wurden eine ganze Reihe an weitreichenden NOE-Kontakten zwischen Ser3 und Tyr14, Glu7 und Phe15, Pro8 und Phe15, Tyr14 und Asp9, Asp9 und Gly1, Tyr14 und Gly5, Tyr14 und Val6, Gly1 und Phe15 sowie Pro8 und Tyr14 beobachtet. All diese kurzen Distanzen, die aus dem NOESY Spektrum abgeleitet werden können, sprechen für die von uns postulierte Struktur von

Astexin-1(19). Für die Strukturberechnungen wurden das Programm CYANA (v 2.1) verwendet. Die interne Isopeptidbindung wurde realisiert, in dem die Distanz zwischen dem Stickstoff von Gly1 und dem γ -Kohlenstoff von Asp9 auf 1,33 Å festgelegt wurde. Die NOE-Kreuzsignale wurden manuell in Abstandsbeschränkungen konvertiert. Dadurch konnten 169 eindeutige Abstandsbeschränkungen erhalten werden, davon 56 für das Rückgrat, 24 weitreichende Interaktionen und 89 für die Seitenketten, was einer durchschnittlichen Anzahl von 8,9 Distanzparametern pro Aminosäurerest entspricht. Des Weiteren wurden Torsionswinkelbeschränkungen der Winkel φ und χ^1 durch Analyse der vincinalen Kopplungskonstanten $^3J_{\text{HN}\alpha}$ und $^3J_{\alpha\beta}$ festgelegt.

Diese Beschränkungen wurden in die Kalkulation in CYANA einbezogen. Dabei wurden 50 zufällige Konformere als Startpunkte gewählt und die resultierenden Strukturen mit dem Programmpaket Sybyl (v. 7.3) analysiert. Dazu wurde die kovalente Gly1-Asp9-Verknüpfung festgelegt und eine Energieminimierung auf Basis der NMR-Beschränkungen mittels eines TRIPOS Kraftfeldes innerhalb von Sybyl durchgeführt. Dadurch wurden 20 Niedrigenergiestrukturen bei minimaler Verletzung der experimentellen Daten erhalten. Diese 20 Minimalenergie-Konformere zeigen eine durchschnittliche *root-mean-square-deviation* von nur 0,03 Å und repräsentieren die gelöste Struktur von Astexin-1(19) in wässriger Lösung bei 10 °C (Abbildung 32). Auf Basis der starken Ähnlichkeit der ^1H -Spektren bei Variation der Temperatur wird angenommen, dass die Struktur von Astexin-1(19) den Kern der Astexin-1(23)-Struktur in wässriger Lösung unter den gleichen Bedingungen darstellt.

Die hier präsentierte Struktur hat mit der von Link und Mitarbeitern [215] gelösten die generelle Lasso-faltung, sowie den neungliedrigen Ring gemeinsam. Allerdings zeigen sich auch deutliche Diskrepanzen in Gestalt der Durchfädelung des extrazyklischen Peptidteils durch den Ring. Es finden sich hier eine 5 aa lange Schleife oberhalb und ein für Astexin-1(19) 5 aa langer Schwanz unterhalb des Rings, wobei Tyr14 und Phe15 auf unterschiedlichen Seiten des Rings liegen und als sterische Stöpsel wirken. Des Weiteren kann ein sehr kurzes und schwaches β -Faltblatt zwischen E7P8 und Y14F15 auf Basis der beobachteten weitreichenden NOE-Kontakte definiert werden (Abbildung 32C), während man der Schleife keinen regulären *turn* zuordnen kann. Die Hauptfaktoren der Stabilisierung der Lasso-faltung sind also die beiden sterischen Stöpsel Tyr14 und Phe15 auf verschiedenen Seiten des Makrolactamrings, während wohl nur ein kleiner Beitrag vom β -Faltblatt hinzukommt und eine Stabilisierung durch einen definierten *turn* ausscheidet. Diese strukturellen Eigenschaften sind in vollständigem Einklang mit den Mutations- und

Stabilitätsstudien und erklären vor allem die Ergebnisse des Alaninscans, die Möglichkeit sehr stark verkürzte Varianten zu erzeugen, sowie die Stabilisierung der F15W Variante.

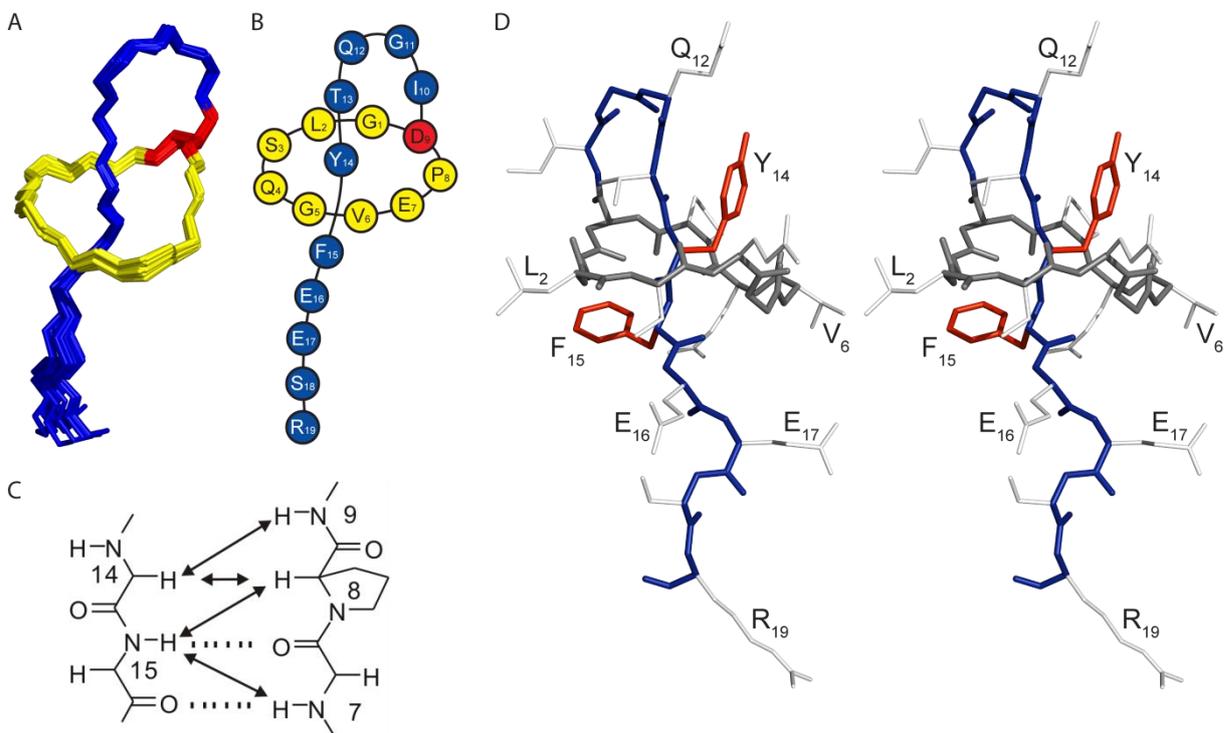


Abbildung 32 – 3D-Struktur von Astexin-1(19). **A** Überlagerung der 20 Minimalenergiestrukturen von Astexin-1(19); Dargestellt sind alle Rückgratkatome; die Isoseptidbindung ist in Rot, die verbleibenden Ringaminoacids in Gelb und die Reste im Schwanz in Blau dargestellt. **B** Schematische Darstellung der Astexin-1(19) Struktur. **C** Schematische Darstellung des kurzen β -Faltblatts zwischen E7-P8 und Y14-F15. **D** Repräsentative Durchschnittsstruktur von Astexin-1(19) als *relaxed eyes* Stereobild; Rückgrat des Schwanzes ist in Blau, des Rings in Dunkelgrau dargestellt, Seitenketten des oberen (Tyr14) und unteren (Phe15) Stöpsels sind in Rot, alle anderen sind in hellgrau dargestellt. Die Struktur ist gedreht und gekippt für eine bessere Sichtbarkeit der Seitenketten.

Für das Lassozeptid Microcin J25 wurden identische NMR-Strukturen in Methanol-*d*₃ [173,174] und DMSO-*d*₆ [172] aufgenommen, was sehr wahrscheinlich auf die rigide Lassostruktur, welche nur sehr gering von umgebenden Lösungsmittel beeinflusst wird, zurückzuführen ist. Dies eröffnet natürlich die Frage ob die in DMSO-*d*₆ aufgenommenen Astexin-1 NMR-Spektren [215] vom nativen Peptid in Lassoform stammen. Ein Vergleich der Ramachandranplots der 20 Minimumsenergiestrukturen kann einen Eindruck von der Definiertheit der Strukturen und damit der Qualität der Durchschnittsstruktur geben (Abbildung 33). Dabei fällt auf, dass die Streuung der Werte in der Publikation von Maksimov *et al.* deutlich stärker ausfällt und viele Reste bei sehr ungünstigen

Torsionswinkeln liegen, während in der hier präsentierten Strukturfamilie keine Reste in diesen Bereichen liegen.

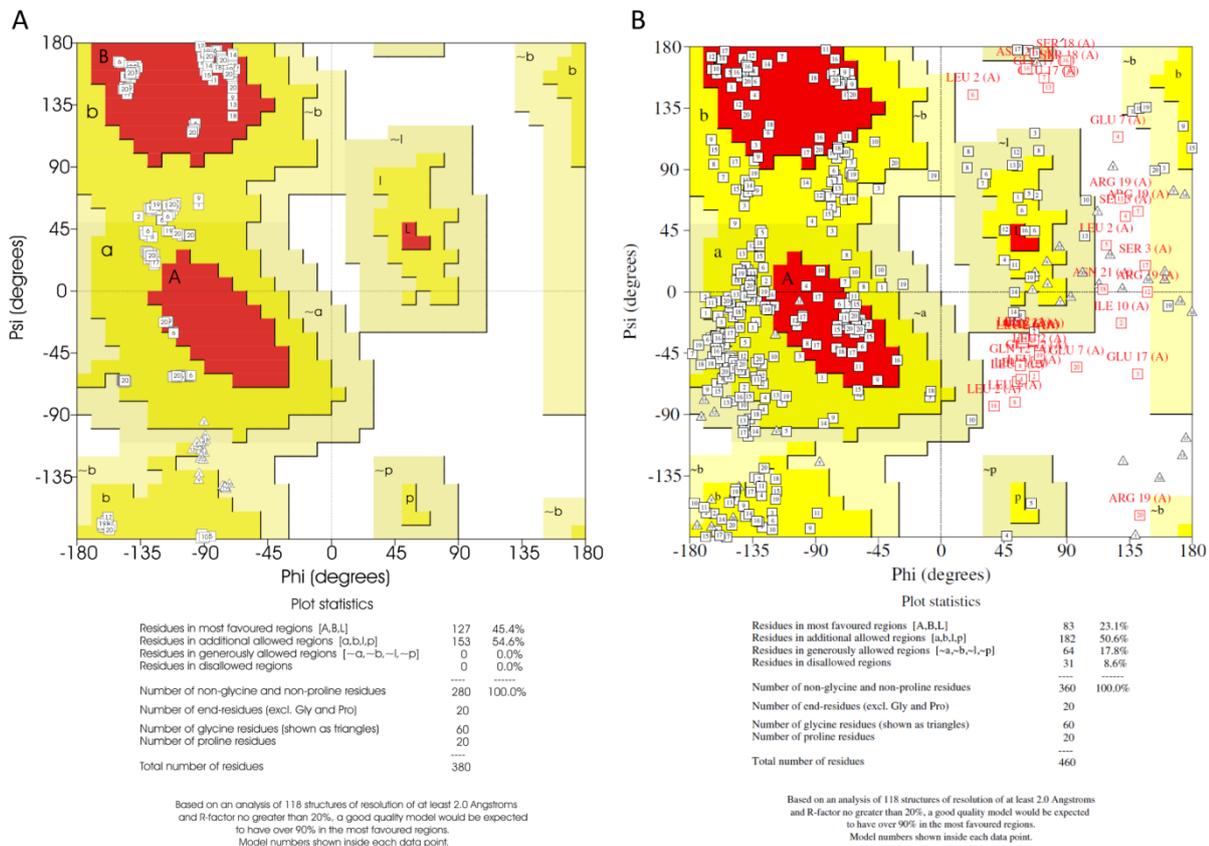


Abbildung 33 – Vergleich der beiden Ramachandranplots der in dieser Arbeit ermittelten und der von Maksimov et al. 2012 publizierten Struktur. A Plot der 20 Niedrigenergiestrukturen von Astexin-1(19) mit PROCHECK NMR erzeugt, **B** Ramachandranplot der 20 Niedrigenergiestrukturen von Astexin-1(23) aus Maksimov et al. 2012 [215].

Aufgrund der ungewöhnlichen Eigenschaften der NMR-Spektren, wie die geringe Verteilung der NH und α H-Signale (DQF-COSY Vergleich siehe Anhang Abbildung 2), und der daraus berechneten Struktur mit vielen Torsionswinkeln in ungewöhnlichen Bereichen, muss insgesamt angenommen werden, dass von Maksimov *et al.* nicht die Struktur des nativen Lasso-peptids gelöst wurde [215]. Ob stattdessen die Struktur des bei der Entfädelung beobachteten Intermediats (siehe 5.2.2) gelöst wurde, bleibt angesichts der geringen Verteilung der NH und α H-Signale, die eher typisch für ein lineares unstrukturiertes Peptid sind, fraglich.

Obwohl der Ring in dieser Lassostruktur von beiden Seiten durch die sehr großen Reste Tyr14 und Phe15 eingeklemmt ist und dadurch die Beweglichkeit des Schwanzes fixiert zu sein scheint, deuten die Hitzestabilitätsuntersuchungen etwas anderes an. Die Darstellung der

durch das Lösungsmittel zugänglichen Oberfläche der Molekülteile auf die Durchschnittsstruktur zeigt jedoch ein Loch in der Mitte des neungliedrigen Rings auf, das Vergleichbar mit der Größe einer Phenylalaninseitenkette ist und somit eine mögliche Passage andeutet. Dies erklärt sehr wahrscheinlich die beobachtete Hitzesensitivität des nativen Peptids und die Hitzestabilität der F15W-Variante.

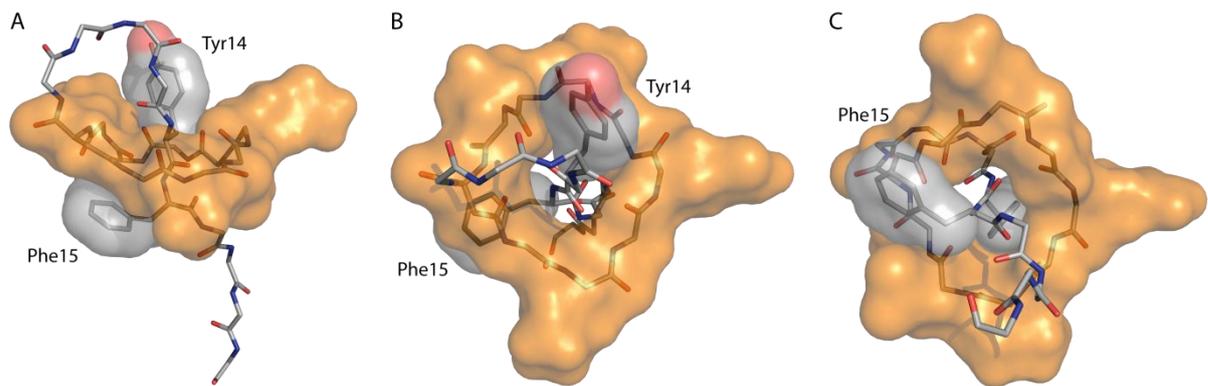


Abbildung 34 – Interaktionen des C-terminalen Peptidteils mit dem makrozyklischen Ring von Astexin-1(19). 3D-Ansicht von Astexin-1(19), bei der das gesamte Rückgrat und die Seitenketten der Stöpselaminoacide Y14 und F15 als Stäbchen und der komplette Makrolactamring sowie die Seitenketten der Stöpsel als lösungsmittelzugängliche Oberfläche dargestellt sind. Ansicht **A** von der Seite, **B** von oberhalb und **C** von unterhalb des Rings. Die Isopeptidbindung befindet sich in allen Ansichten auf der linken Bildseite.

Abschließend kann zu diesem Projekt gesagt werden, dass der *Genome Mining* Ansatz für ein weiteres Beispiel bestätigt wurde. Dabei handelt es sich neben dem Caulonodincluster [220] erst um das zweite Beispiel eines funktionellen Clusters ohne ABC-Transporter. Des Weiteren ist Astexin-1 das erste hitzelabile Lassozeptid, das durch rationale Inkorporation einer Mutation gegen thermische Entfaltung stabilisiert werden konnte.

5.3 Die Neuausrichtung der Kriterien des *Genome Minings* führt zur Isolierung von vier Caulonodinen und definiert die Klasse II Lasso peptide neu

5.3.1 Gencluster, Expressionskonstrukte, heterologe Produktion und Reinigung

Während das erste Projekt, das sich aus den Ergebnissen des *Genome Mining* entwickelt hat, diesen generellen Ansatz für Lasso peptide nochmals bestätigen sollte, war der Anspruch für Folgeprojekte höher angesetzt. Daher wurden aus den identifizierten putativen Lasso peptidbiosynthese genclustern besondere Cluster herausgefiltert. Wie bereits im *Genome Mining* Kapitel erwähnt fanden sich sowohl ungewöhnliche Clusterorganisationen mit gespaltenen B-Proteinen oder zusätzlichen Genen, die für putative Modifizierungsenzyme kodieren, als auch ungewöhnliche Vorläufer, die zu Lasso peptiden mit Siebenringen oder anderen Aminosäuren an Position 1 führen könnten. In vergangenen Ansätzen stellte die Löslichkeit der Maturierungsenzyme, welche für die biochemische Charakterisierung unabdingbar ist, ein großes Problem dar. Die Charakterisierung von Genclustern mit ungewöhnlicher Genorganisation und zusätzlichen Genen wäre daher möglicherweise sehr langwierig und schwierig. Daher wurde der Fokus zunächst auf ungewöhnliche Vorläufer gelegt. Für die einfachen ABC-Gencluster der Proteobakterien wurden durch die Isolation und Charakterisierung von Astexin-1 und parallel zu dieser Arbeit der Caulosegnine I bis III Standardprotokolle für die heterologe Expression, die Produktionsverbesserung, sowie die Erstellung von Mutanten entwickelt. Diese Methoden lassen sich auch auf ungewöhnliche Vorläuferpeptide übertragen und ermöglichen es in kurzer Zeit die Funktionalität eines Clusters zu überprüfen. Dazu wurden in der Arbeit von Julian Hegemann zwei Gencluster aus *Xanthomonas gardneri* und *X. citri* ausgewählt, die möglicherweise Siebenring-Lasso peptide generieren könnten. Für diese Arbeit wurden zwei Cluster aus dem Bakterium *Caulobacter* sp. K31 ausgewählt, da sie kein Glycin an Position 1 des Kernpeptids tragen. Dabei sollte die Frage beantwortet werden, ob die Cluster in der Lage sind Lasso peptide mit anderen Aminosäuren an der Startposition zu generieren oder ob sie durch eine Mutation stillgelegt wurden und falls dies der Fall wäre, ob sie durch eine Mutation der ersten Aminosäure zu Glycin wieder reaktiviert werden können.

Das Bakterium *Caulobacter* sp. K31 gehört zur Familie der *Caulobacteraceae* und ist ebenso wie *A. excentricus* ein aquatisches Alphaproteobakterium. Eine Besonderheit dieser Familie

ist ihr Lebenszyklus und ihre asymmetrische Zellteilung, weshalb dieser *Caulobacter* Stamm auch als Modellorganismus für Zelldifferenziation relevant ist. Er hat ein 5,5 Mbp großes Chromosom und zwei Plasmide mit 230 bzw. 180 kbp. Es konnten auf Basis der identifizierten McjB-Homologen insgesamt drei Lassozeptidbiosynthesegencluster mit sieben Vorläuferpeptiden gefunden werden (Abbildung 35).

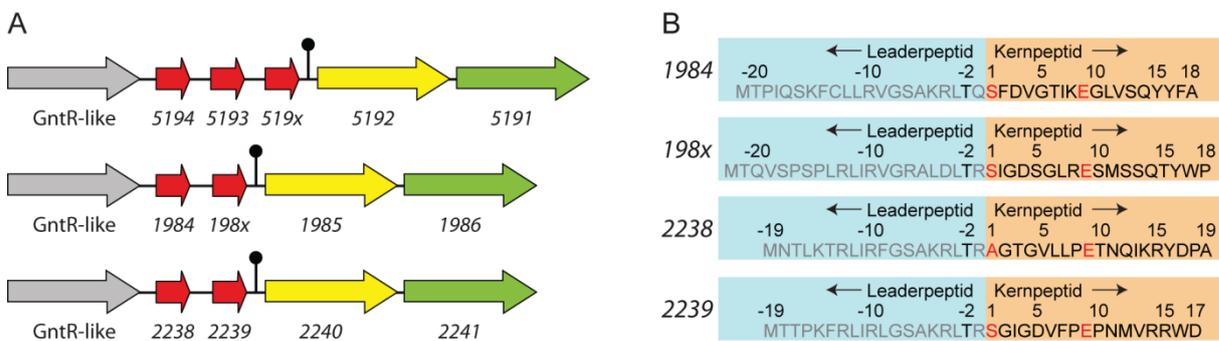


Abbildung 35 – Putative Lassozeptidbiosynthesegencluster aus *Caulobacter* sp. K31. **A** Schematische Darstellung der drei Lassozeptidbiosynthesegencluster, **B** Aminosäuresequenz der vier Vorläuferpeptide aus den beiden chromosomalen Clustern; Leader- und Kernsequenz sind farbig hinterlegt, an der Makrozyklisierung beteiligte Reste sind in Rot hervorgehoben.

Auffällig dabei ist, dass zwei Gencluster mit je zwei Vorläufern auf dem Chromosom codiert sind, während der dritte Cluster mit drei Vorläufern auf dem größeren der beiden Plasmide vorliegt. Werden die B-Proteine aller drei Cluster nach ihrer Homologie zueinander verglichen, zeigt sich eindeutig die nahe Verwandtschaft der beiden chromosomalen Cluster, während der plasmidische Cluster etwas weiter entfernt verwandt zu sein scheint. Diese Beobachtung setzt sich fort, wenn die Vorläuferpeptide miteinander verglichen werden (Abbildung 36A und B). Werden zusätzlich die B-Proteine mit anderen nahe verwandten Arten verglichen, zeigt sich, dass die zum plasmidischen Cluster ähnlichsten B-Proteine in *Rhodanobacter*, *Breviundimonas* und *Xanthomonas* gefunden werden, während für die chromosomalen Cluster *C. crescentus*, *C. segnis* und *Phenylobacterium zucineum* als nächste Verwandte gefunden werden. Dieser *Caulobacter* Stamm stellt mit seinen vielen putativen Lassozeptiden ein sehr interessantes Studienobjekt dar. Dabei kommt die Frage auf, wozu ein Bakterium drei putative Lassozeptidbiosynthesegencluster braucht, die potentiell bis zu sieben verschiedenen Lassozeptide herstellen können.

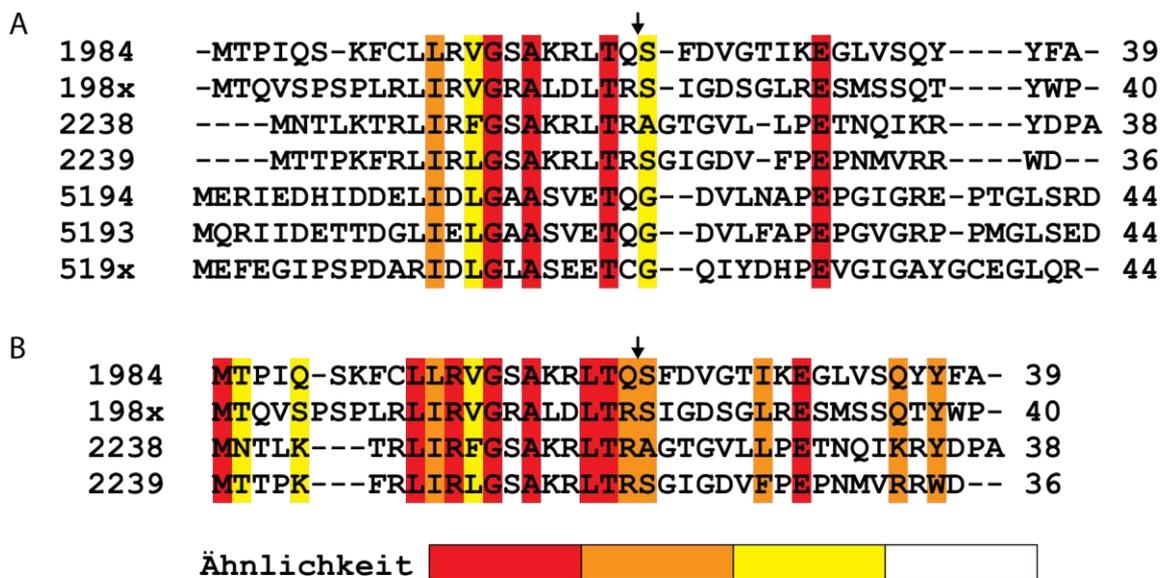


Abbildung 36 – Alignments der Vorläuferpeptide aus *Caulobacter* sp. K31. **A** Alignment aller sieben Caulonodin-Vorläuferpeptide aus drei Biosynthesegenclustern. **B** Alignment der vier Caulonodin-Vorläuferpeptide der beiden chromosomalen Biosynthesegencluster. Multiples Alignment mit Hilfe der *gonnet protein weight matrix* [221], nach Ähnlichkeit absteigend coloriert von Rot für identisch über Orange und Gelb für konserviert bis Weiß für nicht konserviert; Proteaseschnittstelle zwischen Leader und Kernpeptid mit Pfeil gekennzeichnet.

In einem parallel zu dieser Arbeit angefertigten breiten Screening von Clustern aus Proteobakterien wurde die Funktionalität des plasmidischen Clusters bewiesen und es konnten die drei Produkte Caulonodin I, II und III isoliert werden [217]. Da diese Klasse II Lasso peptide keine Besonderheiten hatten, wurden sie nicht strukturell aufgeklärt, sondern nur mit einem Set an Experimenten untersucht, das mit genügender Sicherheit Hinweise für die Lassotopologie liefern sollte. Dazu zählen neben der Tandem-Massenspektrometrie auch Hitze- und Proteasestabilitätsuntersuchungen. In dieser Arbeit wurden die beiden anderen Cluster ausgewählt, da sie, wie eingangs bereits erwähnt, ungewöhnliche Vorläuferpeptide besitzen. Die Vorläufer mit den Gennummern 1984, 198x (wurde nicht von der automatischen Annotierungssoftware erkannt) und 2239 tragen an Position 1 des Kernpeptids ein Serin, während der Vorläufer 2238 ein Alanin an dieser Position hat (Abbildung 35B und 36B).

Die in vorherigen Ansätzen erfolgreich verwendeten Expressionssysteme wurden für diese beiden Systeme erneut eingesetzt. Dazu wurden die beiden Cluster jeweils in den pET41a-Vektor kloniert. Diese Konstrukte wurden direkt für Testfermentationen eingesetzt um nach den möglichen Produkten zu suchen, sowie anschließend zur Konstruktoptimierung. Bei diesen initialen Fermentationsexperimenten zeigten sich in den LCMS-Daten der Pelletextrakte vier Ionensignale, die zu vier vorhergesagten neuen Lasso peptiden passen

(Abbildung 37). In den Extrakten des Konstrukts 198xAABC_pET41a wurde das m/z Signal 1003,5053 $[M+2H]^{2+}$, welches zum Volllängenprodukt des Vorläufers 1984 passt, sowie das m/z Signal 1982,8965 $[M+H]^+$ detektiert, welches zum nicht verkürzten Produkt des Vorläufers 198x passt. Analog dazu wurden in den Extrakten des Konstrukts 22xxAABC_pET41a Signale gefunden, die zu den Volllängenprodukten der Vorläufer 2238 (m/z 1013,0430 $[M+2H]^{2+}$) und 2239 (m/z 1956,9394 $[M+2H]^{2+}$, m/z 978,9722 $[M+H]^+$) passen. Diese vier neuen Lasso peptide wurden in Fortführung der Reihe der aus diesem Organismus isolierten Lasso peptide Caulonodin IV, V, VI und VII genannt. Zur Produktionssteigerung und für die leichtere Isolierung der reinen Peptide wurden die Konstrukte modifiziert. Zunächst wurde eine rbs anstelle der intergenetischen Region zwischen die Vorläufer und das B-Protein eingebracht. Anschließend wurde jeweils einer der beiden Vorläufer deletiert um Konstrukte zu erhalten, die nur eine Verbindung produzieren. Die vier daraus erhaltenen Vektoren sind 1984A1rbsBC_pET41a, 198xA2rbsBC_pET41a, 2238A1rbsBC_pET41a und 2239A2rbsBC_pET41a. Mit diesen war es möglich alle vier Lasso peptide in großen Mengen für die weiteren Untersuchungen zu produzieren.

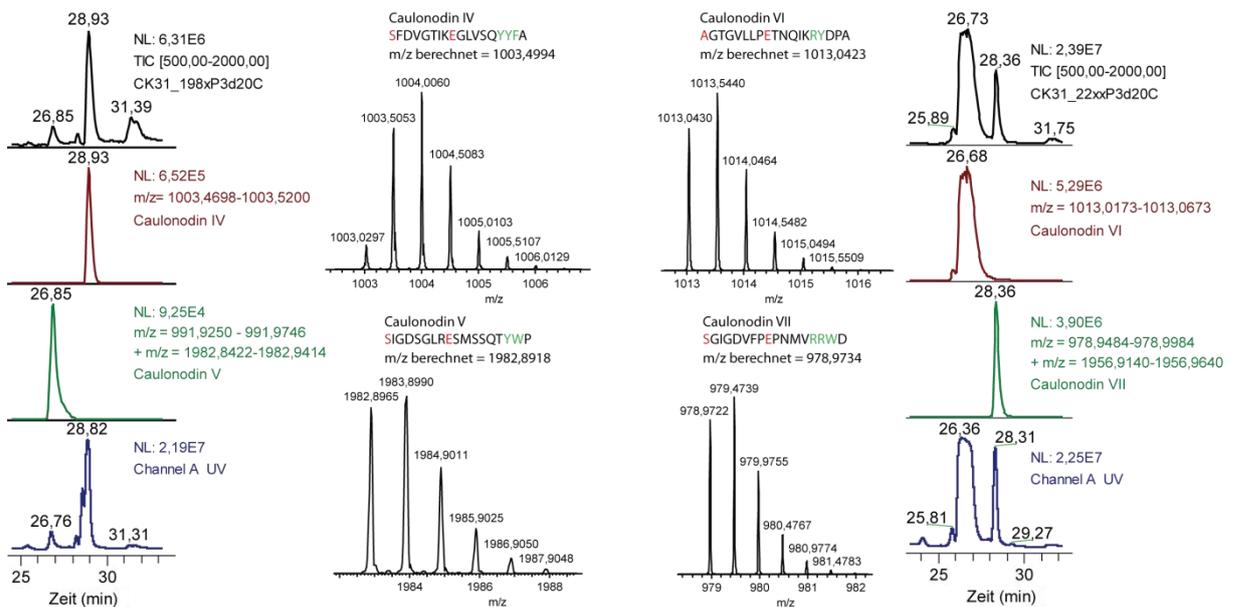


Abbildung 37 – Nachweis der Caulonodine mit HPLC-MS. Auf beiden Seiten TIC, EIC und UV-Spuren der Extrakte aus beiden Expressionskonstrukten 198xAABC_pET41a (links) und 22xxAABC_pET41a (rechts). Mittig Ausschnitte aus den Massenspektren der Caulonodine mit dargestellter Sequenz.

Die Reinigung der vier Einzelprodukte stellte sich im Gegensatz zu den Erfahrungen von Astexin-1 als sehr unproblematisch dar. Die vier Lasso peptide wurden alle in Volllänge praktisch ohne das Auftreten von Verkürzungen isoliert und konnten daher mit nur einer

präparativen HPLC in Reinheiten von über 95 % erhalten werden. Bei Caulonodin V und VII zeigte sich das Vorhandensein von Nebenprodukten im Bereich einiger Prozent mit einer Massendifferenz von jeweils 16 Da zum Hauptprodukt. Da beide Peptide Methionin enthalten, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um eine Oxidation der Methioninseitenkette vom Thioether zum Sulfoxid handelt. Die Produktionsmengen der vier Peptide waren alle recht gut. Während Caulonodin VII mit 0,7 mg/L die geringste Produktion hatte, zeigten die andern drei Caulonodine IV, V und VI Produktionen von ca. 4, 6 und sogar 10 mg/L. Von Caulonodin V wurden allerdings nur ca. 4 mg/L isoliert, da sich im chromatographischen Verhalten ein sehr breites *tailing* zeigte und so erhebliche Mengen des Peptids verworfen wurden. Die in Reinform erhaltenen Peptide wurden MS²-Studien unterzogen um die Primärsequenz und die Konnektivität zu beweisen (Abbildung 38). In zwei von vier Fällen konnte die Primärsequenz bis zum neungliedrigen Ring nachvollzogen werden. Für Caulonodin V und VI konnte durch die teilweise schlechte Fragmentierung aufgrund des Vorhandenseins von Prolin nicht alle Fragmente bis zum Ring beobachtet werden. Dennoch konnte die Primärsequenz weitestgehend bestätigt werden.

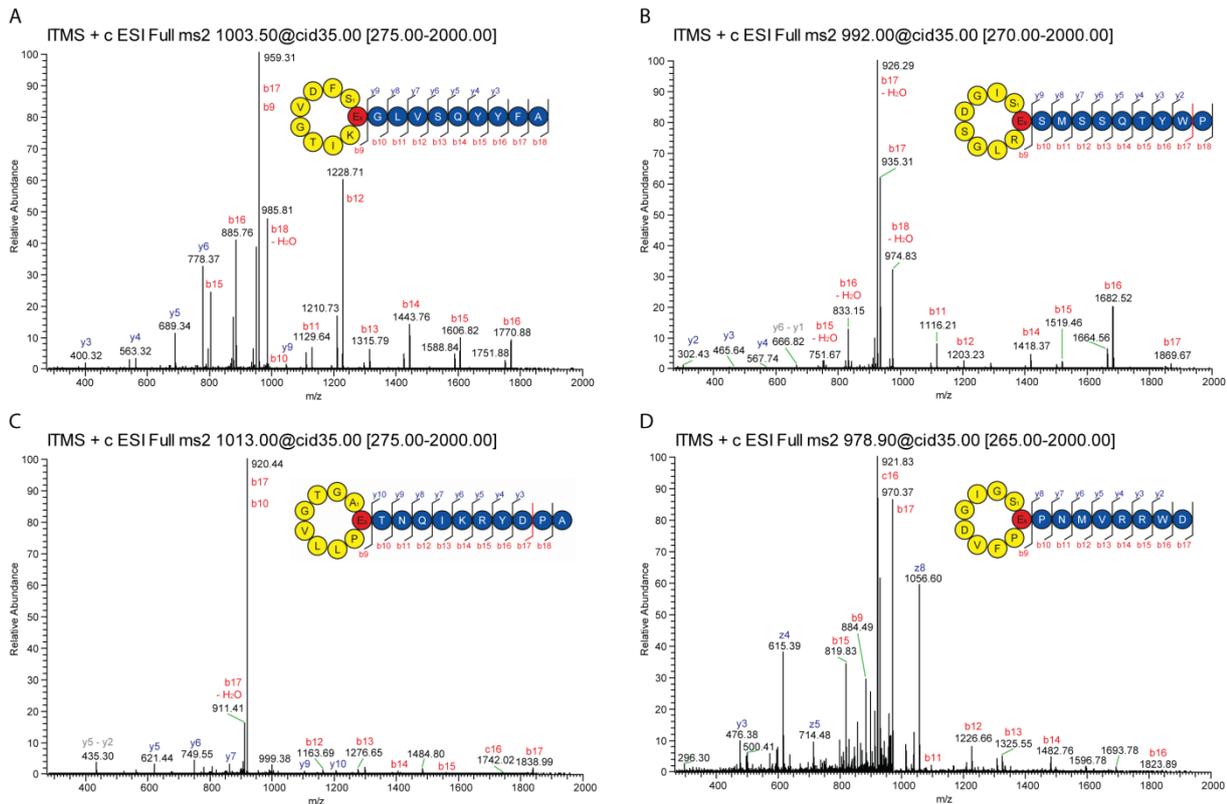


Abbildung 38 – Tandem-Massenspektren der Caulonodine IV, V, VI und VII. A Caulonodin IV, B Caulonodin V, C Caulonodin VI, D Caulonodin VII. Fragmentierung der Hauptsignale des jeweiligen Peptids ($[M+2H]^{2+}$); Fragmente der b-Serie in Rot, Fragmente der y-Serie in Blau; bevorzugte Fragmentierungsstellen durch vorhandenes Prolin in der Peptidsequenz rot markiert.

Daher konnte gezeigt werden, dass es sich bei den vier neuen Naturstoffen um die ersten Lassopeptide mit Alanin bzw. Serin an Position 1 handelt, auch wenn die dreidimensionalen Lassostrukturen noch nicht aufgeklärt sind. Mit den gereinigten Peptiden wurden anschließend analog zu den Studien von Astexin-1 thermische und proteolytische Stabilitätsuntersuchungen durchgeführt sowie MS und MS²-Spektren aufgenommen.

5.3.2 Thermische und proteolytische Stabilität

Im Gegensatz zu Astexin-1 wurden bei der Isolierung der Caulonodine IV bis VII keine weiteren Peaks mit identischen Massen detektiert. Dies ist wahrscheinlich auf die sehr schnell durchführbare einstufige Reinigung zurückzuführen und stellt kein Indiz für eine Hitzestabilität dar. Daher wurden alle vier Caulonodine einer Hitzedenaturierung bei 95 °C ausgesetzt.

Dabei zeigten sich bei Caulonodin IV und VI deutliche Veränderungen in den HPLC-Chromatogrammen. Caulonodin VI zeigte das klassische Verhalten eines hitzelabilen Lassopeptids mit der Bildung eines zweiten Peaks gleicher Masse aber unterschiedlicher Retention. Des Weiteren zeigte sich noch die Bildung weiterer Peaks, die anhand ihres Massesignals als zwei wahrscheinlich autokatalytisch entstehende Hydrolyseprodukte identifiziert werden konnten (Abbildung 39A). Zum einen hydrolysiert die Bindung zwischen Asp17 und Pro18 und generiert dadurch ein Verkürzungsprodukt. Der Ort der zweiten Hydrolyse ist nicht klar, da lediglich der Zuwachs der Masse um 18 Da beobachtet wurde, was auf die Hydrolyse einer Peptidbindung im Ring, der Isopeptidbindung oder einer Seitenkette schließen lässt.

Bei Caulonodin IV konnte unerwarteter Weise keine solche Peakverschiebung beobachtet werden. Stattdessen sank einfach die Intensität des detektierten UV Peaks in den Proben, die durch Hitze denaturiert wurden (Abbildung 39B). Bei genauerer Betrachtung des Reaktionsgefäßes zeigte sich die Bildung eines Präzipitats, d.h. dass die entfädelte Variante des Peptids deutlich schlechter in 20% Acetonitril löslich ist und zur Aggregation neigt. Auch bei höherer Konzentration von Acetonitril (bis 60%) fand diese Aggregation und Präzipitation statt, so dass keine Retentionszeit für das entfädelte Peptid aufgenommen werden konnte.

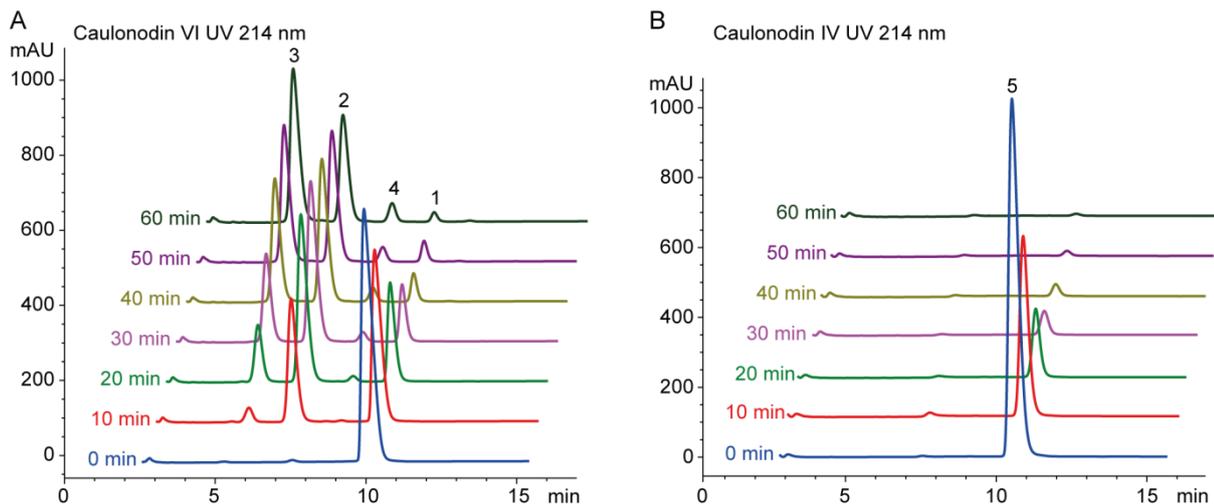


Abbildung 39 – HPLC-UV-Spuren der Hitzestabilität von Caulonodin VI und IV. A Caulonodin VI bei 95 °C, **B** Caulonodin IV bei 95 °C, **1** Caulonodin VI Lassozeptid, **2** Caulonodin VI entfädelt, **3** Caulonodin VI ($\Delta 2$) entfädelt, **4** weiteres Hydrolyseprodukt, **5** Caulonodin IV Lassozeptid.

Die Caulonodine V und VII zeigten keine Veränderungen im Retentionszeitverhalten, so dass sie zunächst als hitzestabil eingestuft wurden.

Im Zuge der Thermostabilität spielt natürlich auch die Sensitivität gegen proteolytischen Abbau eine wichtige Rolle, da sie als Kriterium der Unterscheidung zwischen Lassofaltung und entfädelter, verzweigt-zyklischer Isoform dienen kann. Im Allgemeinen sind Lassozeptide in ihrer nativen Faltung mit wenigen Ausnahmen stabil gegen Endopeptidasen wie Trypsin oder Chymotrypsin und bis zu einem gewissen Grad auch gegen Exopeptidasen wie die Carboxypeptidase Y. Daher wurden die Caulonodine IV, V, VI und VII mit Carboxypeptidase Y, Trypsin und Chymotrypsin 1 bis 4 h inkubiert. Dabei zeigte sich, dass nur Caulonodin VII eine leichte Empfindlichkeit gegen Trypsin besitzt. Nach 4 h war ein kleiner Teil des Caulonodin VII an zwei verschiedenen Stellen (nach Arg14 und Asn11) geschnitten worden. Hier reicht die Lassofaltung also nicht aus um vollständigen Schutz gegen den Angriff dieser Protease zu vermitteln. Bei den anderen Caulonodinen IV, V und VI in ihren Lassofaltungen konnten auch nach vierstündiger Exposition mit den Proteasen in keinem Fall Degradationsprodukte beobachtet werden.

Caulonodin VI wurde auch nach Hitzebehandlung nochmals mit allen drei Proteasen umgesetzt (Carboxypeptidase Y siehe Abbildung 40). Dabei wurde deutlich, dass die entfädelt Form sehr schnell von allen drei Proteasen degradiert wird, während in den Proben vorhandene Reste an korrekt gefaltetem Peptid weiterhin stabil blieben. Es ist also bereits an

dieser Stelle eindeutig klar, dass es sich bei Caulonodin VI um ein hitzelabiles Lassozeptid handelt.

Aufgrund der niedrigen Löslichkeit des entfädelten Caulonodin IV in wässrigen Lösungen, konnten keine Proteaseassays durchgeführt werden, da die Enzyme bei hohem Lösungsmittelgehalt deutlich an Aktivität verlieren.

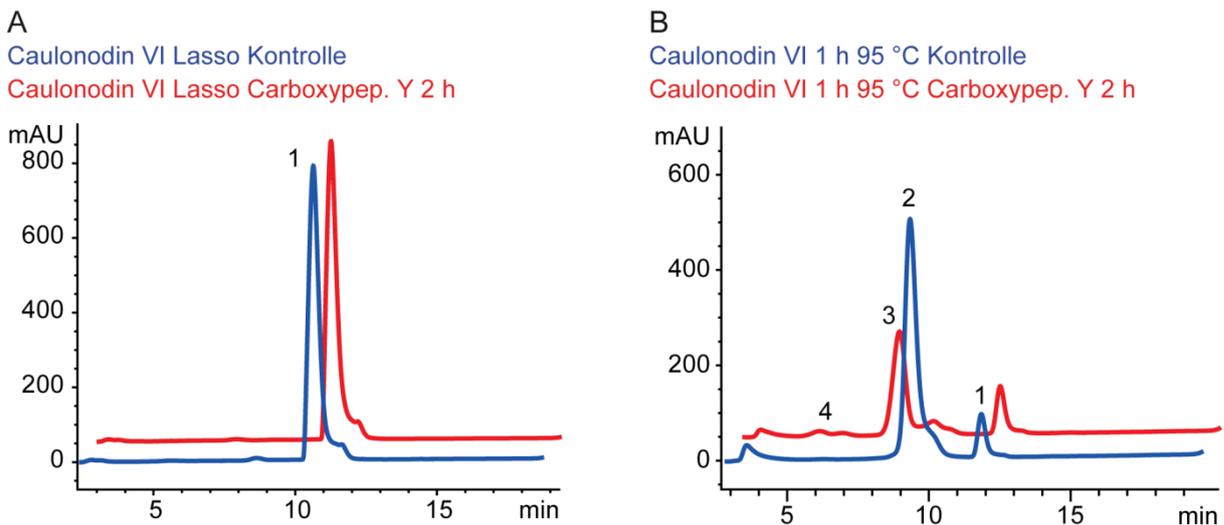


Abbildung 40 – HPLC-UV-Spuren der Carboxypeptidase Y Verdauung von Caulonodin VI vor und nach Hitzebehandlung. A Caulonodin VI Lassozeptid, B Caulonodin VI hitzebehandelt, 1 Caulonodin VI Lassozeptid, 2 Caulonodin VI entfädelte, 3 Caulonodin VI ($\Delta 9$, 10 aa), 4 Caulonodin VI ($\Delta 8$, 11 aa) und ($\Delta 7$, 12 aa).

Obwohl sich bei den Thermostabilitätsexperimenten keine Hinweise darauf zeigten, dass Caulonodin V und VII hitzelabil sind, wurden beide nach der Hitzebehandlung mit Carboxypeptidase Y umgesetzt. Dabei zeigte sich bei Caulonodin V, dass es nach der einstündigen Inkubation bei 95 °C, empfindlich gegen Carboxypeptidase Y wird (Abbildung 41A). Der nach der Hitzeinwirkung vorhandene UV Peak mit nahezu identischer Retentionszeit ist nach der Behandlung mit der Protease nicht mehr vorhanden. Caulonodin VII wurde nach Hitzeinwirkung ebenfalls fast vollständig durch Carboxypeptidase Y abgebaut. Zusätzlich finden sich hier UV Peaks, deren Massensignale zu Abbauprodukten des Lassozeptids passen (Abbildung 41B). Diese beiden Beobachtungen stellen eindeutige Indizien dar, dass eine Entfädelung stattgefunden hat, die sich in beiden Fällen jedoch kaum auf die Retentionszeit ausgewirkt hat. Dies könnte bei Caulonodin VII darauf zurückzuführen sein, dass der Sequenzteil, der die möglichen Stöpsel enthält, hydrophile (Arg) und hydrophobe (Trp) Reste enthält, während z.B. bei Astexin-1 nur hydrophobe Reste (Tyr14, Phe15) vorliegen und daher die entfädelte Form eine höhere Verweildauer auf der C18-Säule hat. Für Caulonodin V kann man die Konstanz der Retentionszeit vor und nach Entfädelung

nicht anhand der Sequenz (Tyr16, Trp17) erklären. Hier wäre eigentlich eine Erhöhung der Retentionszeit zu erwarten gewesen. Es scheinen daher noch weitere Effekte für die Retention bei einer *reverse phase* HPLC eine Rolle zu spielen.

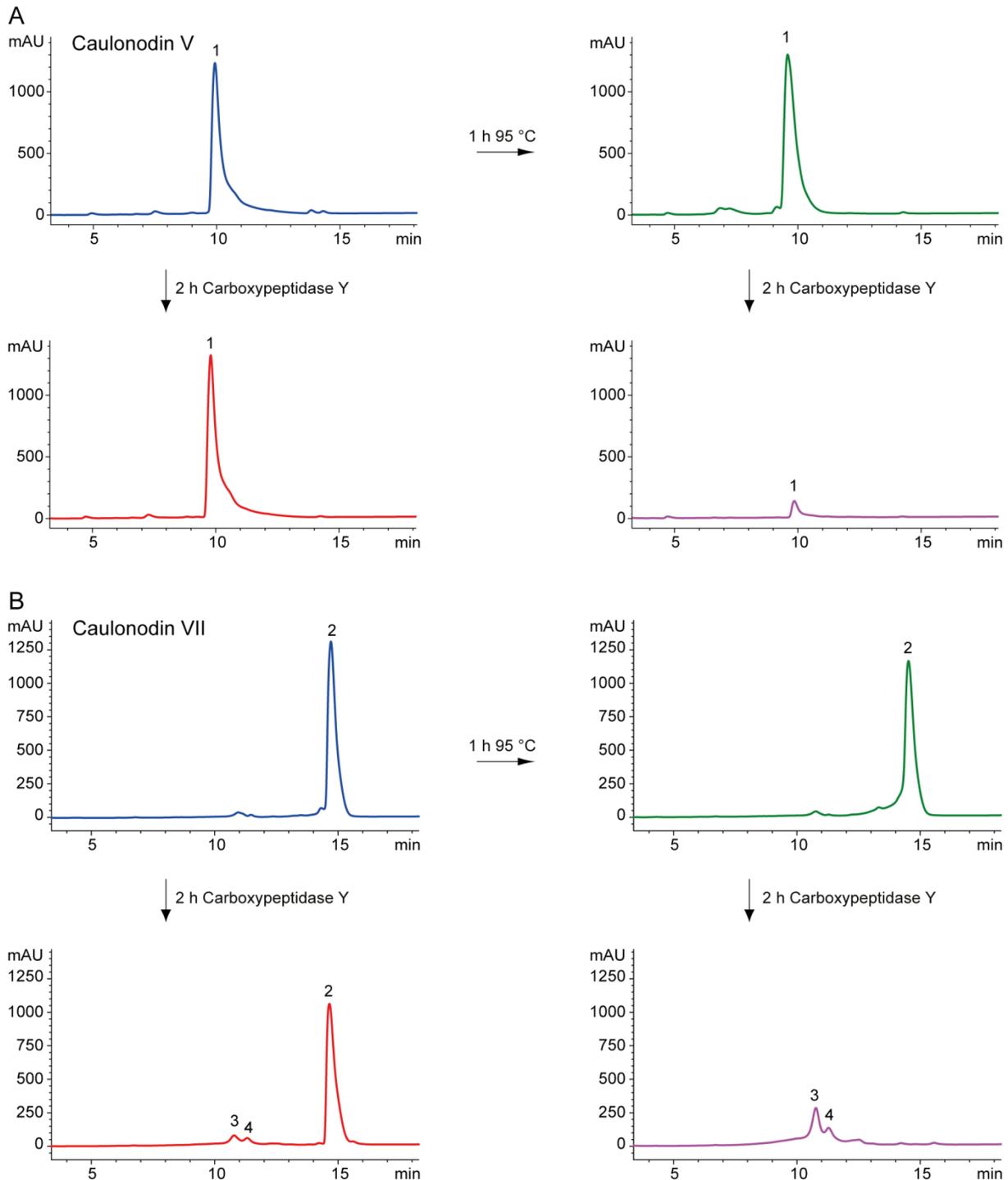


Abbildung 41 – Hitze- und Proteasestabilität der Caulonodine V und VII. **A** Caulonodin V, **B** Caulonodin VII, Kontrollprobe (blau), Carboxypeptidase Y Verdau einer Lassoprobe (rot), Hitzeinkubation einer Lassoprobe (grün), Carboxypeptidase Y Verdau einer hitzebehandelten Probe (lila); **1** Caulonodin V Lassozeptid / entfädertes Peptid, **2** Caulonodin VII Lassozeptid / entfädertes Peptid, **3** Caulonodin VII ($\Delta 6$, 11 aa), **4** Caulonodin VII ($\Delta 2$, 15 aa).

Eine weitere Information, die aus diesen Stabilitätsuntersuchungen gewonnen werden kann, ist die Tatsache, dass sich bei allen vier neuen Caulonodinen der Stöpsel sehr wahrscheinlich in der Nähe des C-Terminus befindet. Wie andere Beispiele, u.a. Astexin-1 gezeigt haben, sind sehr lange unter dem Ring liegende Sequenzen durch die Lassofaltung nicht wirksam gegen den Angriff durch Proteasen geschützt. Bei Lassozeptiden, die hauptsächlich in ihrer Vollängenform isoliert werden, wie beispielsweise Capistrin, ist die unterhalb des Rings liegende Sequenz 5 aa lang. Dies gibt also bereits erste Hinweise auf die genaue Lassofaltung der Caulonodine. Der Stöpsel ist in allen Fällen sehr wahrscheinlich unter den letzten fünf Resten zu suchen. Des Weiteren kann man aufgrund der Tatsache, dass alle vier neuen Caulonodine Neunringe mit Glutamat bilden, mittelgroße Reste wie bei Caulosegnin I [220] als Stöpsel ausschließen, so dass wahrscheinlich nur die klassischen Stöpsel Arg, Phe, Tyr und Trp in Frage kommen. Um diese Fragen zu beantworten ohne von allen vier Peptiden NMR-Strukturen aufzuklären zu müssen, sollte eine Mutationsstudie durchgeführt werden, bei der systematisch Aminosäurereste im Schwanz ausgetauscht werden.

5.3.3 Mutationsstudie

Wie sich bereits bei der Untersuchung von Astexin-1 und seiner Varianten gezeigt hat, stellt die Mutationsanalyse ein wirkungsvolles Werkzeug dar, strukturelle Daten aus der NMR-Spektroskopie zu unterstützen. Aber auch ohne eine 3D-Strukturbestimmung gibt ein auf Basis rationaler Überlegungen ausgewähltes Set an Mutanten in Kombination mit thermischen und proteolytischen Stabilitätsuntersuchungen einen guten Einblick in die dreidimensionale Lassofaltung. Aus den Mutationsstudien zu Astexin-1 konnte Phe15 als wichtigste und Tyr14 als zweite wichtige Stöpselaminosäure vorhergesagt werden. In der finalen 3D-Struktur waren diese beiden Reste oberhalb (Tyr14) und unterhalb (Phe15) des Rings positioniert. Im Umkehrschluss hatte kein anderer Aminosäureaustausch besondere Auswirkungen auf die Stabilität, so dass diese Reste nicht an der Stabilisierung der Faltung beteiligt sind, was durch die 3D-Struktur bestätigt wurde. Dieser Ansatz sollte für die Caulonodine weiter verfolgt werden. Von allen vier neuen Caulonodinen wurden daher Mutanten der möglichen Stöpsel in den letzten Abschnitten der extrazyklischen Sequenzen erstellt. Die daraus erhaltenen Vorhersagen für die Lassofaltung sollten anschließend an einem Beispiel durch 3D-Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie bestätigt werden. Die Mutationsanalyse sollte sich aber noch auf weitere Aspekte ausdehnen. Da das

Vorhandensein der Aminosäuren Alanin und Serin an Position 1 ein Novum in der Klasse II der Lassoptide darstellt, sollte besonderes Augenmerk auf die Substitutionstoleranz an dieser Position gelegt werden. Abschließend sollten durch Punktmutationen und Konstruktion von Hybridvorläufern Studien an den Leaderpeptiden durchgeführt werden. Dafür ist *Caulobacter* sp. K31 mit seinen 3 Lassopeptidbiosyntheseclustern besonders geeignet.

Werden die Sequenzen der Caulonodine IV, V, VI und VII etwas genauer betrachtet, so wird schnell deutlich, dass nur relativ wenige Reste überhaupt als Stöpsel in Frage kommen. Für Caulonodin IV sind dies die Reste Tyr15, Tyr16 und Phe17, während es für das Caulonodin V aus demselben Cluster Tyr16 und Trp17 sind. Auch wenn die Primärsequenzen der Peptide keine große Ähnlichkeit besitzen, so ist doch anzunehmen, dass die Biosynthesemaschinerie die beiden Peptide in gleicher Art und Weise falten wird. Die Stöpsel sollten demnach an den gleichen Positionen sitzen. Dies würde vor allem für die Reste an den Positionen 16 (beides Tyrosin) und 17 (Phenylalanin und Tryptophan) sprechen. Dennoch müssen alle Reste auf ihre Wichtigkeit für die Produktion und die Stabilität der Produkte überprüft werden. Für die beiden Caulonodine aus dem zweiten Cluster verhält es sich ähnlich. Während bei Caulonodin VI die Reste Lys14, Arg15 und Tyr16 als mögliche Stöpsel in Betracht gezogen werden müssen, sind dies bei Caulonodin VII Arg14, Arg15 und Trp16 (Tabelle 14). Auch hier sind die Positionen der möglichen Stöpsel konserviert und besonderer Fokus liegt auf den Resten 15 und 16, da Lysin bei einem neungliedrigen Makrolactamring mit Glutamat möglicherweise bereits zu klein für den Erhalt der Lassofaltung ist. Trotzdem werden alle Reste auf ihren Einfluss auf Produktion und Stabilität untersucht. Für die eigentliche Mutagenese wurden alle Reste einzeln gegen Alanin ausgetauscht. Zusätzlich wurden verschiedene gezielte Mutationen durchgeführt, die die Reste entweder systematisch vergrößern oder verkleinern um damit die wichtigen Positionen genau zu definieren.

Tabelle 14 – Mögliche Stöpselaminosäuren der Caulonodine IV, V, VI und VII. C-terminale Sequenzen der Caulonodine; als Stöpsel in Betracht gezogen Reste sind fett, die wahrscheinlichsten Stöpsel in Rot dargestellt.

Peptide	14	15	16	17	18	19
Caulonodin IV	Q	Y	Y	F	A	-
Caulonodin V	Q	T	Y	W	P	-
Caulonodin VI	K	R	Y	D	P	A
Caulonodin VII	R	R	W	D	-	-

Die Mutationsanalyse für Caulonodin IV zeigte zunächst das erwartete Verhalten. Während Y15A noch sehr gut produziert wurde, war dies bei Y16A schon schlechter und F17A konnte nicht mehr detektiert werden. Dies deutet bereits auf eine große Bedeutung des Phe17 in Bezug auf Erkennung durch die Biosynthesemaschinerie oder strukturelle Relevanz hin. Die Tryptophanaustauschvarianten Y15W, Y16W und F17W wurden wie erwartet alle vergleichbar zum Wildtyp produziert (Abbildung 42A). Bei der anschließenden Untersuchung der Stabilität der Varianten zeigt sich die Stärke der Mutationsanalyse. Während sich Y15A wie das native Caulonodin IV verhält und bei Hitzebehandlung entfädelt, liegt die Y16A-Variante nach der Isolation bereits zum Großteil entfädelt vor. Also ist auch Y16 sehr wichtig für die Stabilität der Faltung, wenn auch wahrscheinlich weniger bedeutend als Phe17. Die Varianten Y15W und Y16W zeigen das gleiche thermolabile Verhalten wie Wildtyp-Caulonodin IV. Eine Vergrößerung dieser Aminosäuren kann also nicht zur Stabilisierung beitragen, was darauf hindeutet, dass sich die Reste oberhalb des Rings befinden. Im Kontrast dazu steht die Variante F17W, welche eindeutig hitzestabil ist und nicht durch Proteasen angegriffen wird (Abbildung 42B). Mit nur sechs Mutanten war es also möglich zu zeigen, dass Phe17 der wichtigste Rest bei der Stabilisierung der Lassofaltung ist. Tyr16 hat zwar auch einen Einfluss auf die Stabilität, dieser ist jedoch als deutlich geringer einzuschätzen. Daraus kann für die Caulonodin IV Struktur postuliert werden, dass ähnlich wie bei Astexin-1 Tyr16 der obere und Phe17 der untere Stöpsel ist.

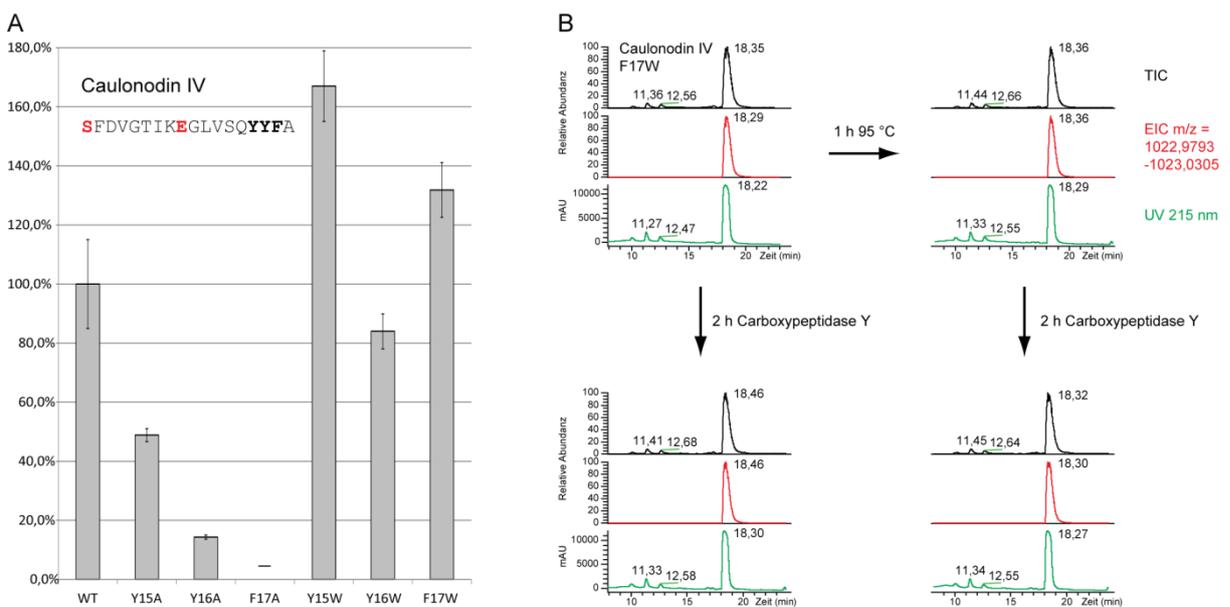


Abbildung 42 – Ergebnisse der Stöpselmutanten für Caulonodin IV. **A** Produktion der sechs Stöpselmutanten im Vergleich zum nativen Caulonodin IV, – = nicht per MS detektiert; **B** Thermo- und Proteasestabilität der F17W-Variante als TIC, EIC und UV dargestellt.

Bei Caulonodin V gestaltete sich die Analyse etwas schwieriger. Es wurden nur die Reste Tyr16 und Trp17 in Betracht gezogen, da Gln14 und Thr15 als zu klein für den Erhalt einer Lasso-faltung mit einem Neuring angesehen werden. Beide Alaninsubstitutionsvarianten Y16A und W17A wurden nur in Spuren detektiert, so dass keine Untersuchungen der Stabilität erfolgen konnten. Offensichtlich sind also beide Reste wichtig für die Erkennung oder die Stabilisierung. Dementsprechend mussten die beiden Reste gegen die kleinere Aminosäure Phenylalanin ausgetauscht werden um Einblicke in die Struktur zu erhalten. Auch die Y16F und W17F Varianten wurden überraschenderweise so schlecht produziert, dass sie nur per MS nachgewiesen werden konnten (Abbildung 43). Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass beide Reste wohl entscheidend an der Stabilisierung beteiligt sein müssen, da beide Austausche chemisch konserviert sind und sich die Größe der Aminosäure nur etwas verringert. Um ein genaueres Bild der Stöpselsituation zu erhalten, wären wohl noch weitere Mutanten notwendig wie Y16R, W17R und W17Y. Dennoch ist die wahrscheinlichste Situation auf Grundlage der erhaltenen Daten Tyr16 als oberer und Trp17 als unterer Stöpsel.

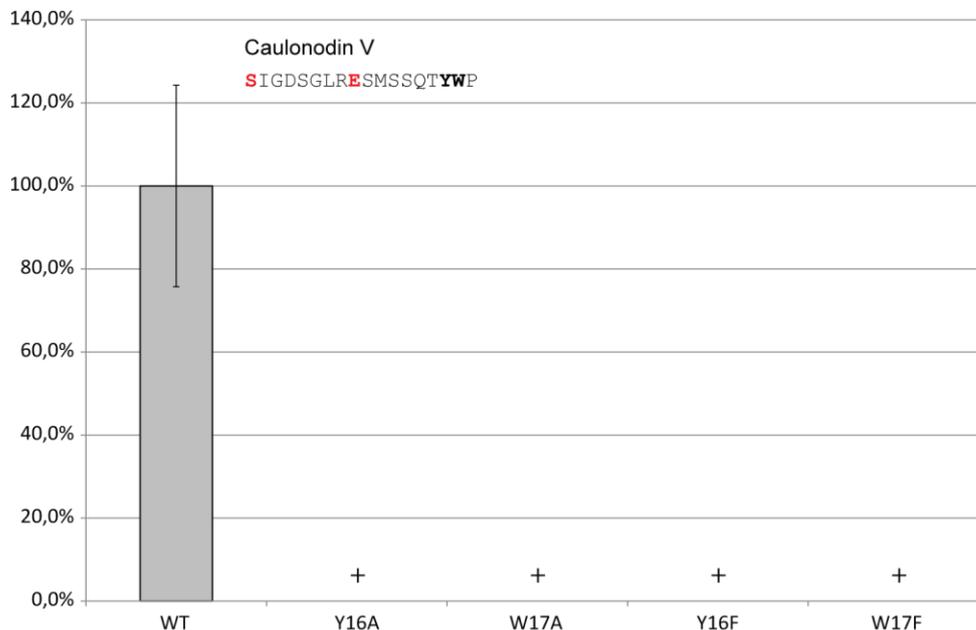


Abbildung 43 – Ergebnisse der Stöpselmutanten für Caulonodin V. Produktion der Stöpselmutanten im Vergleich zum nativen Caulonodin V, + = per MS detektiert

Die Mutanten des Alaninscans K14A, R15A und Y16A von Caulonodin VI zeigten zunächst den typischen Verlauf der abnehmenden Produktion von 40% (K14A) auf 6% (R15A) des

Wildtyplevels und schließlich nur Detektion von Spuren (Y16A) im MS (Abbildung 44A). Dies würde auf eine ähnliche Struktur wie bei Caulonodin IV hindeuten mit Arg15 als oberem und Tyr16 als unterem Stöpsel. Dazu bedarf es aber noch weiterer Mutanten- und Stabilitätsuntersuchungen. Die Produktion der Tryptophanvarianten zeigte entgegen den Erwartungen deutliche Unterschiede. K14W und R15W wurden mit nur 23% bzw. 2% des Wildtyplevels produziert. Y16W hingegen wurde genauso gut produziert wie natives Caulonodin VI. Dies kann jedoch dadurch erklärt werden, dass Tyr zu Trp eine chemisch gesehen konservierte Mutation ist, während bei Lys bzw. Arg zu Trp die Ladung verändert wird. Es scheint demnach, dass eine positive Ladung an dieser Position für eine effektive Erkennung und Prozessierung durch die Enzyme benötigt wird. Die anschließende Stabilitätsanalyse brachte ein recht unerwartetes Ergebnis. Die K14W-Mutation führte zu einer langsameren Entfaltung der Variante. Bei der R15W-Variante wurde sogar trotz der schlechten Produktion eine vollständige Stabilisierung erreicht, also ein hitzestabiles Lassozeptid generiert (Abbildung 44B). Im Gegensatz dazu verhielt sich die gut produzierte Y16W-Variante wie natives Caulonodin VI. Es zeigt sich also, dass die Analyse der Produktion verschiedener Varianten allein nicht ausreicht um die Bedeutung der Aminosäuren für die Lassostruktur zu ermitteln. Nur in Kombination mit der Stabilitätsuntersuchung wird klar, welche Reste für den Erhalt der Lassofaltung wichtig sind. Aufgrund der Beobachtungen kann für die Struktur von Caulonodin VI postuliert werden, dass Lys14 den oberen und Arg15 den unteren Stöpsel darstellt. Daraus folgt ebenfalls, dass eine Einbringung von Tryptophan nur dann zu einem hitzestabilen Lassozeptid führt, wenn es an der richtigen Position direkt unter dem Ring inseriert wird.

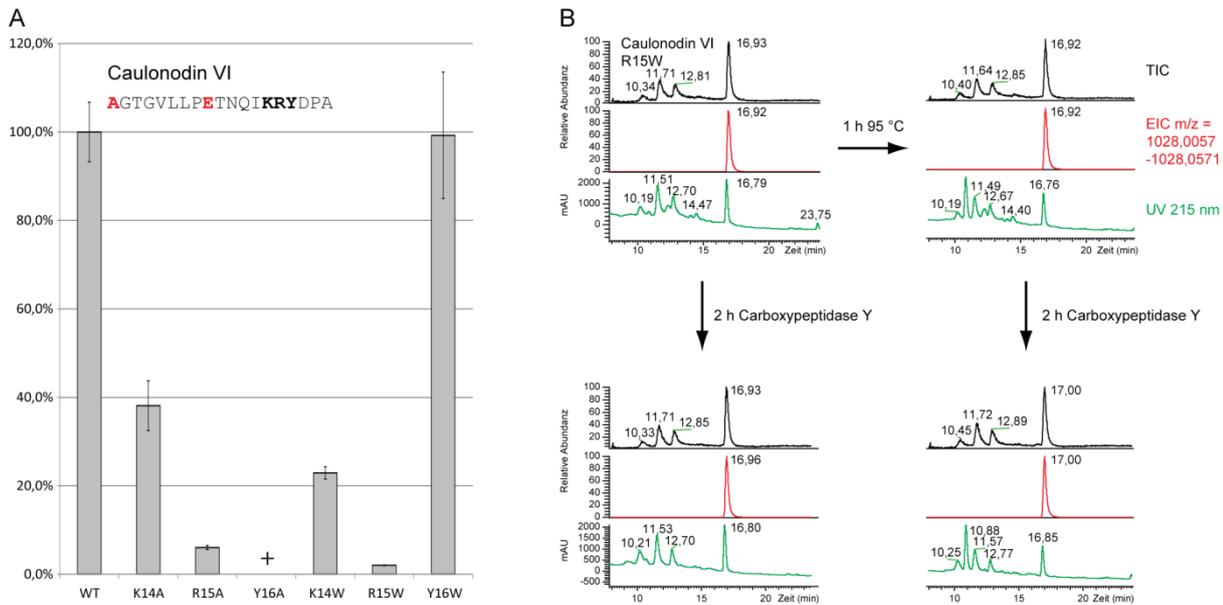


Abbildung 44 – Ergebnisse der Stöpselmutanten für Caulonodin VI. **A** Produktion der sechs Stöpselmutanten im Vergleich zum nativen Caulonodin VI, + = per MS detektiert; **B** Thermo- und Proteasestabilität der R15W-Variante als TIC, EIC und UV dargestellt.

Auch für Caulonodin VII sollte zunächst durch den Alaninscan die C-terminale Peptidsequenz nach Resten mit besonderer Bedeutung für die Produktion durchsucht werden. Allerdings wurde nur die Variante R14A in nennenswerten Mengen produziert (30% des Wildtyps). Für die Variante R15A konnte gerade noch ein UV Peak detektiert werden, was einer Produktion von weniger als 1% des Wildtyps entspricht. Die W16A-Mutation wird nicht toleriert, da nicht einmal Spuren der Variante in der Masse detektiert wurden. Daher wurden noch weitere Mutanten generiert, die die Reste verkleinern (R15K, W16Y) bzw. vergrößern (R15W) sollten. Wie zu erwarten war, wurden die konservativeren Mutationen R15K und W16Y in vergleichbarer Menge wie der Wildtyp produziert (Abbildung 45A). Bezüglich ihrer Thermostabilität waren sie dem nativen Caulonodin VII sehr ähnlich, so dass leider keine neuen Schlüsse über den Stöpsel gezogen werden konnten. Die Variante R15W, obwohl sehr schlecht produziert, zeigte sich jedoch als hitze- und proteasestabil (Abbildung 45B). Es scheint also, dass die Positionen der Stöpsel analog zu Caulonodin VI sind. Arg15 ist vermutlich unterhalb, während Arg14 oberhalb des Rings positioniert ist. Die Abwesenheit eines UV-Signals und die relativ niedrige Intensität des Massensignals machen allerdings weitere Untersuchungen notwendig um eine zufriedenstellende Sicherheit des Messergebnisses zu gewährleisten. Eine Variante R14W könnte zusätzlich noch zeigen, dass nur die Insertion eines Tryptophans an der richtigen Stelle zu einer hitzestabilen Variante führt.

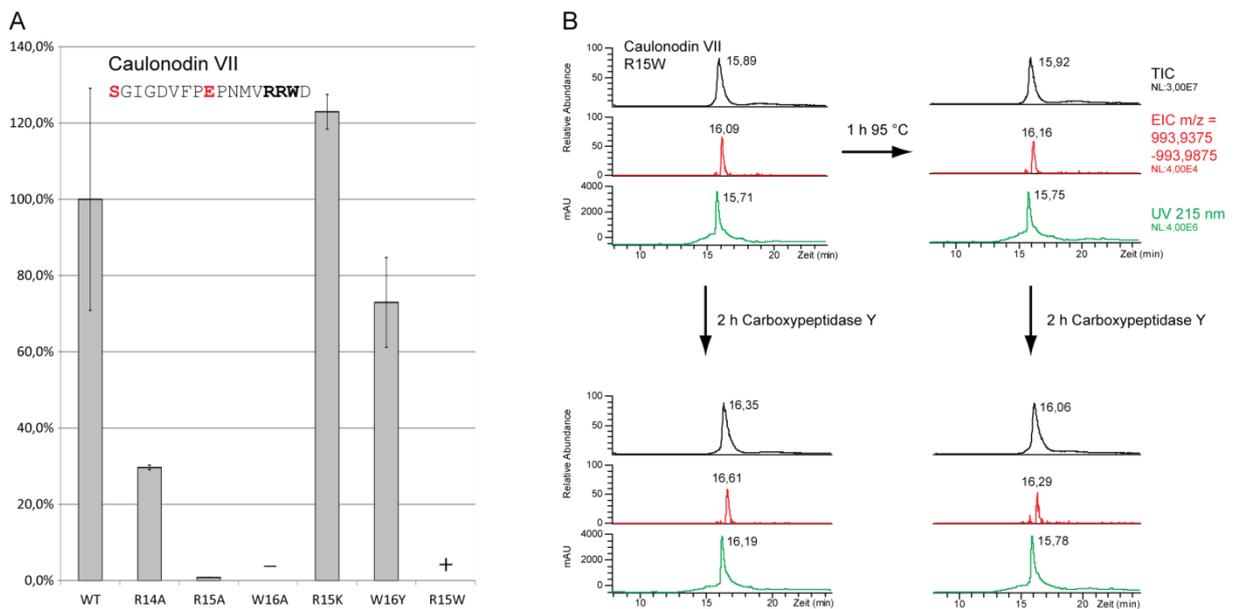


Abbildung 45 – Ergebnisse der Stöpselmutanten für Caulonodin VII. **A** Produktion der sechs Stöpselmutanten im Vergleich zum nativen Caulonodin VII, + = per MS detektiert, - = nicht per MS detektiert; **B** Thermo- und Proteasestabilität der R15W-Variante als TIC, EIC und UV dargestellt.

Der zweite wichtige Aspekt der Mutagenesestudie war die Substitutionstoleranz der ersten Position des Kernpeptids, da bisher nur Klasse 2 Lasso peptide bekannt sind, die ein Glycin an dieser Position tragen und bisherige Austausche immer zu drastischen Einbrüchen in der Produktion geführt haben. Dafür wurde aus jedem Cluster ein Lasso peptide, Caulonodin V und Caulonodin VI, ausgewählt, die Serin bzw. Alanin an dieser Position tragen. Es wurden Einzelmutanten zu Glycin, Cystein, Threonin, Valin, Phenylalanin und die jeweils andere Aminosäure (Serin für Caulonodin VI, Alanin für Caulonodin V) generiert. Dabei wurde die Ähnlichkeit der beiden Biosynthesemaschinerien deutlich, da die Substitutionen in ähnlichem Ausmaß toleriert wurden (Abbildung 46). Der Kreuz austausch von Serin zu Alanin und umgekehrt wurde in beiden Fällen nahezu ohne Produktionseinbuße toleriert, während der Glycinaustausch die Produktion etwa um den Faktor 20 reduzierte. Alle anderen Substitutionen führten zum fast völligen Fehlen eines detektierbaren Produkts. Davon war die Caulonodin VI A1T-Variante mit einer Produktion von 1,3% im Vergleich zum Wildtyp, die einzige die noch mit einem detektierbaren UV-Peak hergestellt wurde. Auf Basis dieser Ergebnisse können zwei neue Schlussfolgerungen erhalten werden. Zum einen hat sich die Spezifität der Biosynthesemaschinerie von Glycin auf Alanin und Serin an Position 1 verschoben, zum anderen liegt hier immer noch eine hohe Positionsspezifität vor, die aber im Kontrast zu allen bisherigen Lasso peptidesystemen zwei Aminosäuren (Serin und Alanin)

gleich gut toleriert und eine dritte (Glycin) zumindest gut genug für eine per UV detektierbare Produktion.

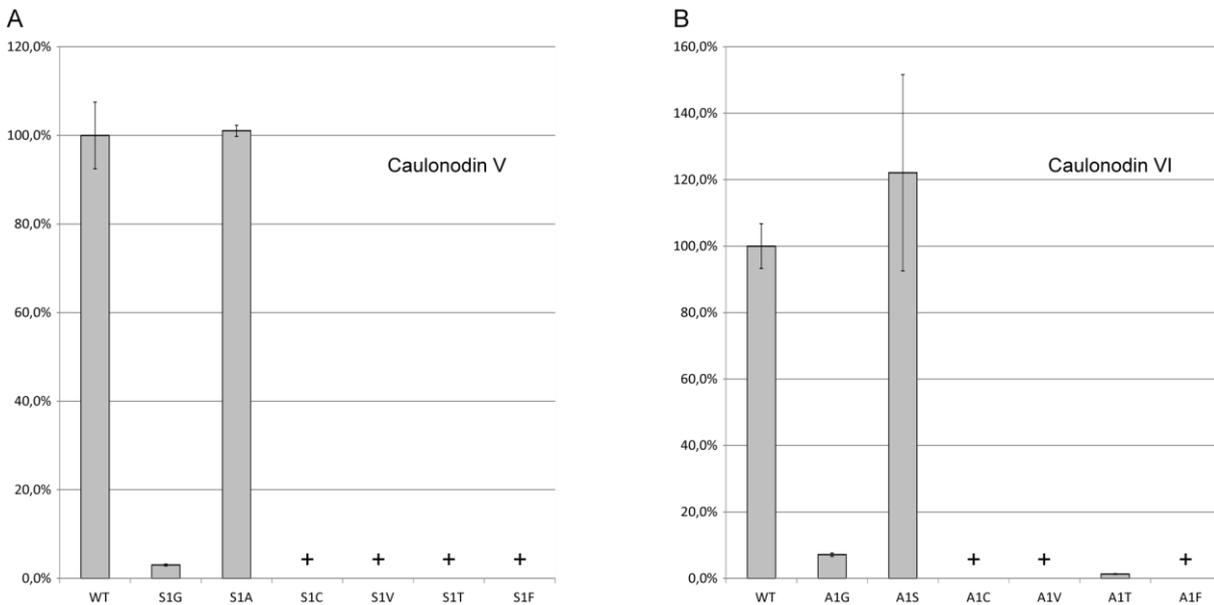


Abbildung 46 – Ergebnisse der Position 1 Mutanten für Caulonodin V und VI. Produktion der Mutanten an Position 1 von **A** Caulonodin V und **B** Caulonodin VI im Vergleich zum jeweiligen nativen Peptid, + = per MS detektiert.

Der dritte Teil der Mutationsstudie sollte sich auf die Vorläuferpeptide und speziell den Leaderbereich konzentrieren. Dazu wurden Deletionsmutanten erzeugt, bei denen kleine Bereiche des Leaderpeptids von 198x (Caulonodin V) gelöscht wurden. Des Weiteren war geplant durch den vollständigen Austausch der Vorläufer sowie die Generierung von Hybridvorläufern die Toleranz der Biosynthesemaschinerie 1985B/1986C weiter zu untersuchen. Die Mutations-PCRs stellten sich aber als anspruchsvoll heraus und konnten trotz Variation von DMSO-Gehalt, Annealing-Temperatur und dem Neudesign der Primer nicht zum Erfolg gebracht werden, so dass nur ein Hybridvorläufer generiert werden konnte. Für die Leaderpeptid-Deletionsmutanten wurden einzelne Bereiche von 6 oder 7 aa Länge definiert, die einzeln oder für stärkere Verkürzung zusammen gelöscht wurden (Abbildung 47). Davon unangetastet blieben das initiale, durch das Startcodon codierte Met, sowie die beiden Reste Thr-2 und Arg-1, da aus früheren Studien die Wichtigkeit des Threonins an Position -2 für andere Lasso peptide gezeigt wurde [182,184]. Die restlichen 19 Aminosäuren wurden in drei Deletionsblöcke Del1, Del2 und Del3 eingeteilt.

	Block 1	Block 2	Block 3
WT	MTQVSPSP	LRLIRVGRALDL	TRSIGDSGLRESMSSQTYWP
Del1		MLRLIRVGRALDL	TRSIGDSGLRESMSSQTYWP
Del2	MTQVSPSP	GRALDL	TRSIGDSGLRESMSSQTYWP
Del3	MTQVSPSP	LRLIRV	TRSIGDSGLRESMSSQTYWP
Del12		MGRALDL	TRSIGDSGLRESMSSQTYWP
Del123			MTRSIGDSGLRESMSSQTYWP

Abbildung 47 – Übersicht über die Sequenzen der generierten Deletionsmutanten im Leaderpeptidbereich. Für die Biomashinerie wichtige Reste farbig markiert: makrolactamringbildende Aminosäuren rot, wahrscheinliche Stöpselaminosäuren grün und Threonin -2 blau. Deletionsblöcke sind farbig hinterlegt.

Diese Deletionsmutanten zeigten sehr unterschiedliche Produktionen (Abbildung 48). Während die Löschung des N-terminalen Leaderpeptidteils (Del1) noch zu einer gut per UV detektierbaren, aber deutlich verringerten Produktion führte (ca. 7 % des WT), führten Deletionen in mittleren (Del2) und C-terminalen Teil (Del3) des Leaders zum völligen Fehlen einer per UV detektierbaren Produktion (MS-Signal-Intensität: 10^3 für Del3, 10^4 für Del2, vgl. WT 10^6 bis 10^7). Die mutierten Vorläuferpeptide wurden also ca. um den Faktor 100 bis 1000 schlechter prozessiert als der Wildtyp. Das zeigt, dass nicht die Länge des Leaderpeptids allein von Bedeutung ist, sondern, dass irgendeine Erkennungssequenz neben dem bereits bekannten Thr-2 vorhanden sein muss, die für die Maturierungsmaschinerie essentiell ist. Die weiteren Deletionen Del12 (Löschung des N-terminalen und mittleren Teils) und Del123 (Löschung aller drei Peptidteile) zeigten auch in der MS-Analyse keinerlei Produktion.

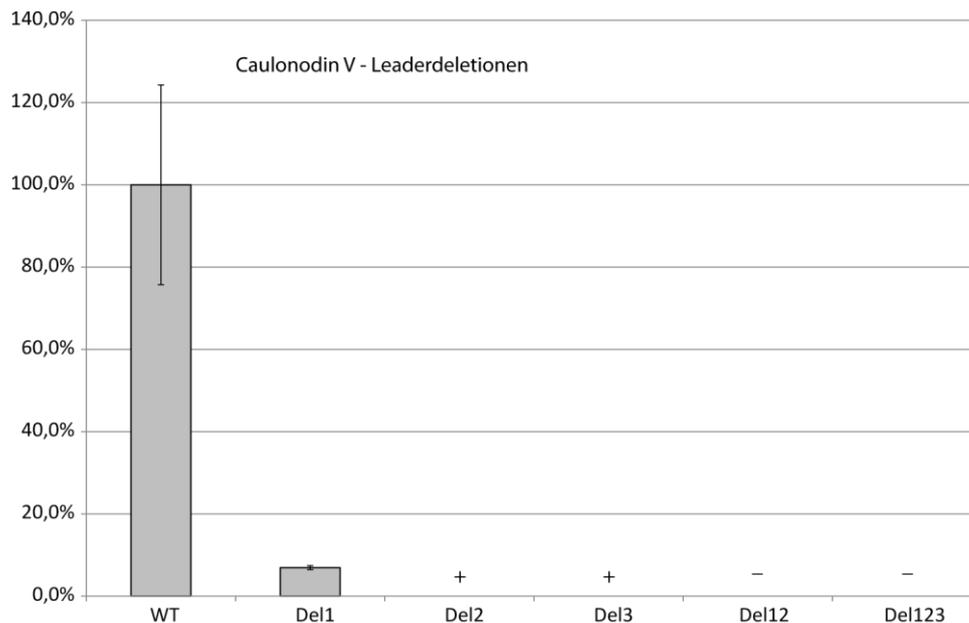


Abbildung 48 – Ergebnisse der Leaderdeletionsmutanten von Caulonodin V. Produktion der Mutanten an im Vergleich zum Wildtyp-Vorläuferpeptid, + = per MS detektiert, - = nicht per MS detektiert.

Dies bestätigt einerseits die Ergebnisse der Mutationsstudie von Microcin J25, bei der gezeigt werden konnte, dass eine Verkürzung des Leaderpeptids prinzipiell möglich ist, aber meistens zu Produktionsverringerungen führt [224]. Andererseits konnte dort gezeigt werden, dass das kürzeste, noch prozessierte Leaderpeptid nur 8 aa Länge haben muss.

Ein gewisser Teil des Leaderpeptids scheint also nicht notwendig für die Prozessierung zu sein. Egal ob die Rolle des Leaderpeptids eher nur allosterischer Natur ist [225] oder es für die Assemblierung der Biomaschinerie aus B und C wichtig ist, eine Erkennungssequenz bzw. eine Sequenz, die die Interaktion vermittelt, ist vermutlich vorhanden. Eine solche Sequenz liegt sehr wahrscheinlich in Bereich von 10 – 15 Aminosäuren vor der Schnittstelle zwischen Leader- und Kernpeptid. Für zukünftige Untersuchungen könnten diese Bereiche mit zufälligen Sequenzen oder klassischen Linker-Sequenzen wie GSSG ausgetauscht werden statt sie einfach zu löschen. Dadurch könnte der relevante Bereich stärker eingegrenzt werden und andere Effekte, die zur Produktionsreduzierung geführt haben könnten (z.B. mangelnde Stabilität des kürzeren Vorläuferpeptids), könnten besser ausgeschlossen werden.

5.3.4 3D-Strukturbestimmung mittels NMR-Spektroskopie

Die Mutationsstudie der strukturell wichtigen Aminosäuren hat für alle vier Peptide bereits starke Hinweise auf die Position der Stöpselaminosäuren geliefert und ermöglicht sogar die

Postulierung einer Lassoformung für die Caulonodine (Abbildung 49). Für eines der Caulonodine sollte die dreidimensionale Struktur mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt und somit das Postulat bestätigt werden.

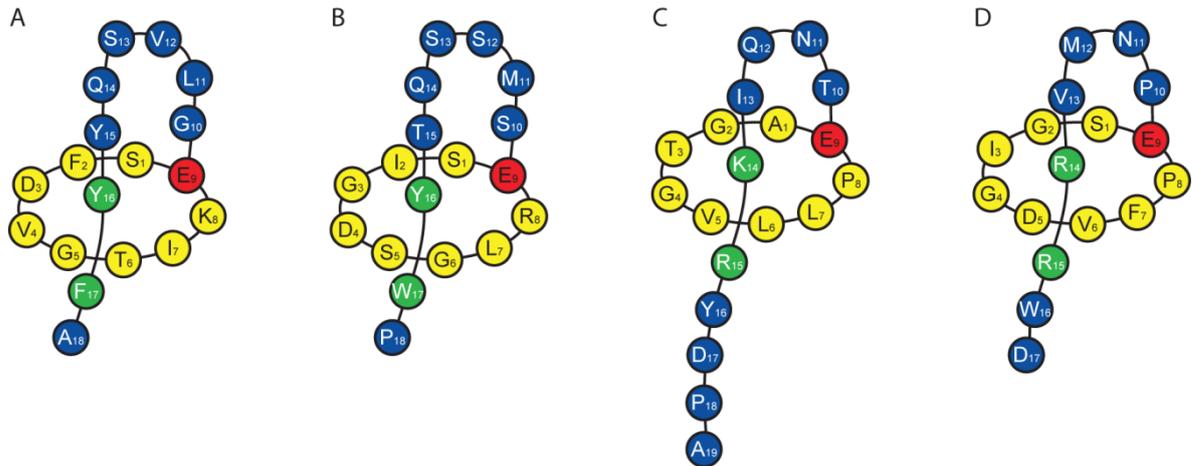


Abbildung 49 – Postulierte Lassoformungen der Caulonodine IV, V, VI und VII. Schematische Darstellung der aus den Mutagenesedaten postulierten Lassoformungen der Caulonodine; Isopeptidbindungsaminoacids in Rot, übrige Ringaminoacids in Gelb, Schwanzaminoacids in Blau und als Stöpsel identifizierte Reste in Grün dargestellt. **A** Caulonodin IV, **B** Caulonodin V, **C** Caulonodin VI, **D** Caulonodin VII

Für die 3D-Strukturbestimmung in wässriger Lösung mit Hilfe von ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren wurde das Lassozeptid Caulonodin V ausgewählt, da es ein Serin an Position 1 trägt und aus Produktions- und Stabilitätsaspekten am geeignetsten ist. Proben des gereinigten Lassozeptids wurden in 200 μL $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) in einer Endkonzentration von ca. 10,1 mM gelöst. Es wurden ^1H Spektren von Caulonodin V in 5 K Schritten zwischen 283 und 303 K aufgenommen (Abbildung 50). Das Spektrum ist im Bereich zwischen 10,6 – 6,6 ppm gezeigt und die Signale der Amidprotonen sind entsprechend ihrer Zuordnung beschriftet. Die Signale sind sehr gut aufgelöst und zeigen eine breite Verteilung sowie deutliche Unterschiede in der Temperaturabhängigkeit, was auf eine stabile Lassoformung des Peptids schließen lässt [223]. Die beste Signalverteilung konnte bei 298 K beobachtet werden, wodurch eine vollständige Zuordnung (Tabelle 4 Anhang) durch Standardmethoden erzielt werden konnte.

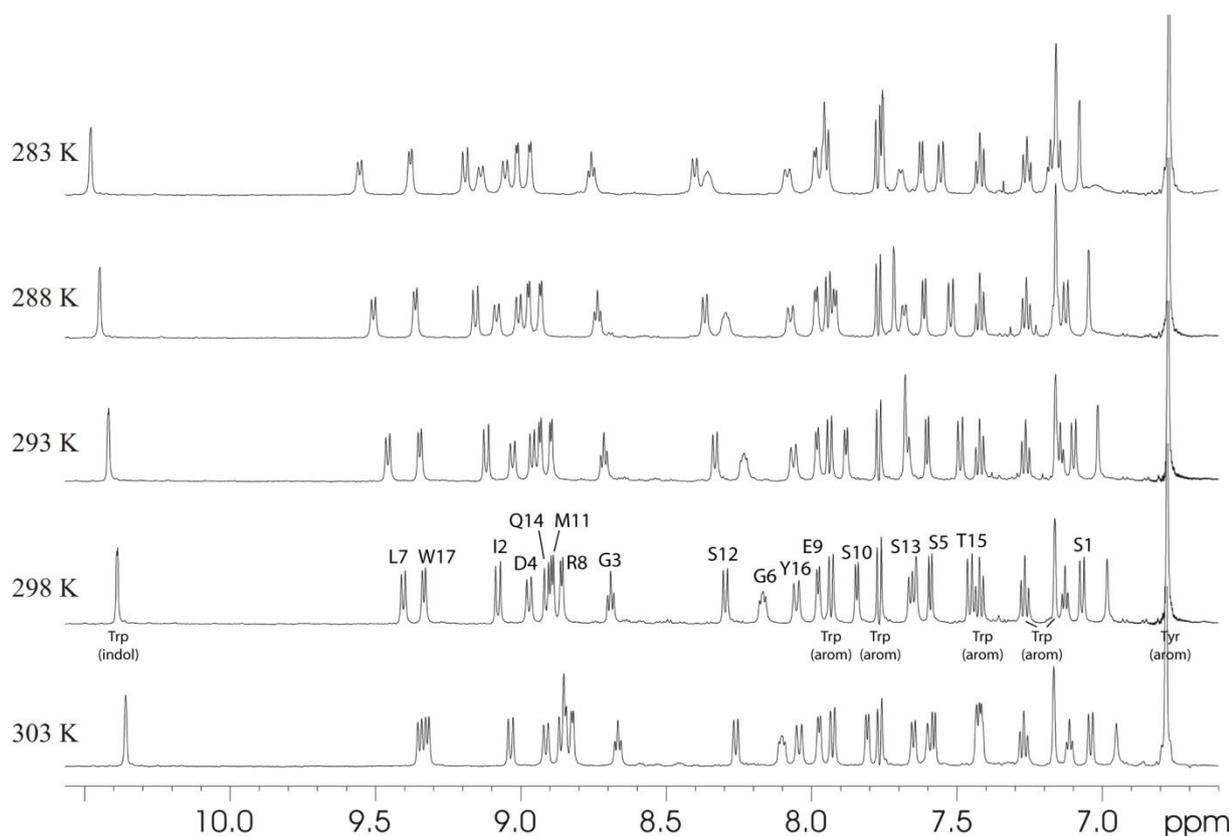


Abbildung 50 – Ausschnitt aus dem ^1H -NMR in der Region 10,6 – 6,6 ppm von Caulonodin V in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) bei verschiedenen Temperaturen mit vollständiger Zuordnung der Amidprotonen.

Eine sequentielle Zuordnung aller αH und NH konnte aus den DQF-COSY und NOESY-Spektren erhalten werden. Mit Hilfe der DQF-COSY und TOCSY-Spektren konnten alle Seitenketten identifiziert werden. Es zeigte sich eine reine Konformation mit starken NOE Kontakten zwischen dem Amidproton des Glycins an Position 1 und dem γH von Glutamat 9, die einen internen Ringschluss zwischen diesen Resten beweisen. Die Aminosäuren Glu9, Tyr16 und Trp17 zeigten eine sehr geringe Temperaturabhängigkeit der ^1H -Amidsignale im Bereich zwischen 283 und 303 K. Diese Beobachtung deutet eine sehr starke Abschirmung der Amidprotonen dieser Aminosäuren gegen das umgebende Solvens an, was bei einem verzweigt-zyklischen Peptid nicht der Fall wäre. Zudem wurden eine ganze Reihe an weitreichenden NOE-Kontakten zwischen Asp4 und Tyr16, Ser5 und Tyr16, Gly6 und Tyr16, Leu7 und Tyr16, Arg8 und Tyr16, Glu9 und Tyr16, Ser10 und Tyr16, Ser1 und Trp17, Glu9 und Trp17, Leu7 und Trp17, Ile2 und Pro18, Ser10 und Ser13 sowie Ser10 und Gln14 beobachtet. All diese Kurzdistanzen, die aus dem NOESY Spektrum (Anhang Abbildung 3) abgeleitet werden können, sprechen für eine Lassofaltung. Für die Strukturberechnungen wurden das Programm CYANA (v 2.1) verwendet. Die interne Isopeptidbindung wurde realisiert, in dem die Distanz zwischen dem Stickstoff von Ser1 und dem δ -Kohlenstoff von

Glu9 auf 1,33 Å festgelegt wurde. Die NOE-Kreuzsignale wurden manuell in Abstandsbeschränkungen konvertiert. Dadurch konnten 144 eindeutige Abstandsbeschränkungen erhalten werden, davon 48 für das Rückgrat, 22 weitreichende Interaktionen und 74 für die Seitenketten, was einer durchschnittlichen Anzahl von 8,0 Distanzparametern pro Aminosäurerest entspricht. Des Weiteren wurden Torsionswinkelbeschränkungen der Winkel φ und χ^1 durch Analyse der vicinalen Kopplungskonstanten $^3J_{\text{HN}\alpha}$ und $^3J_{\alpha\beta}$ festgelegt.

Diese Beschränkungen wurden in die Kalkulation in CYANA mit einbezogen. Dabei wurden 50 zufällige Konformere als Startpunkte gesetzt und die resultierenden Strukturen mit dem Programmpaket Sybyl (v. 7.3) analysiert. Die kovalente Verknüpfung von Ser1 und Glu9 wurde gesetzt und eine Energieminimierung auf Basis der NMR-Beschränkungen mittels eines TRIPOS Kraftfeldes innerhalb von Sybyl durchgeführt. Die daraus erhaltenen 15 Minimalenergiestrukturen zeigen minimale Verletzungen der experimentellen Daten. Diese 15 Minimalenergie-Konformere zeigen eine durchschnittliche *root-mean-square-deviation* von nur 0,03 Å und repräsentieren die gelöste Struktur von Caulonodin V in Wasser bei 25 °C (Ramachandranplot siehe Anhang Abbildung 4).

Die hier präsentierte Struktur hat eine 7 aa lange Schleife oberhalb und einen nur 2 aa langen Schwanz unterhalb des Rings, wobei Tyr16 und Trp17 auf unterschiedlichen Seiten des Rings liegen und als sterische Stöpsel wirken. Es konnten weder ein β -Faltblatt noch ein definierter *turn* als Sekundärstrukturelemente definiert werden. Die Hauptfaktoren der Stabilisierung der Lassofaltung sind also die beiden sterischen Stöpsel Tyr16 und Trp17 auf verschiedenen Seiten des Makrolactamrings. Dieser hat eine Länge von 9 Aminosäuren und durch die Bindungsknüpfung mit Glutamat ist er mit 29 Atomen der bisher größte Lasso-peptidmakrolactamring für den eine 3D-Struktur existiert.

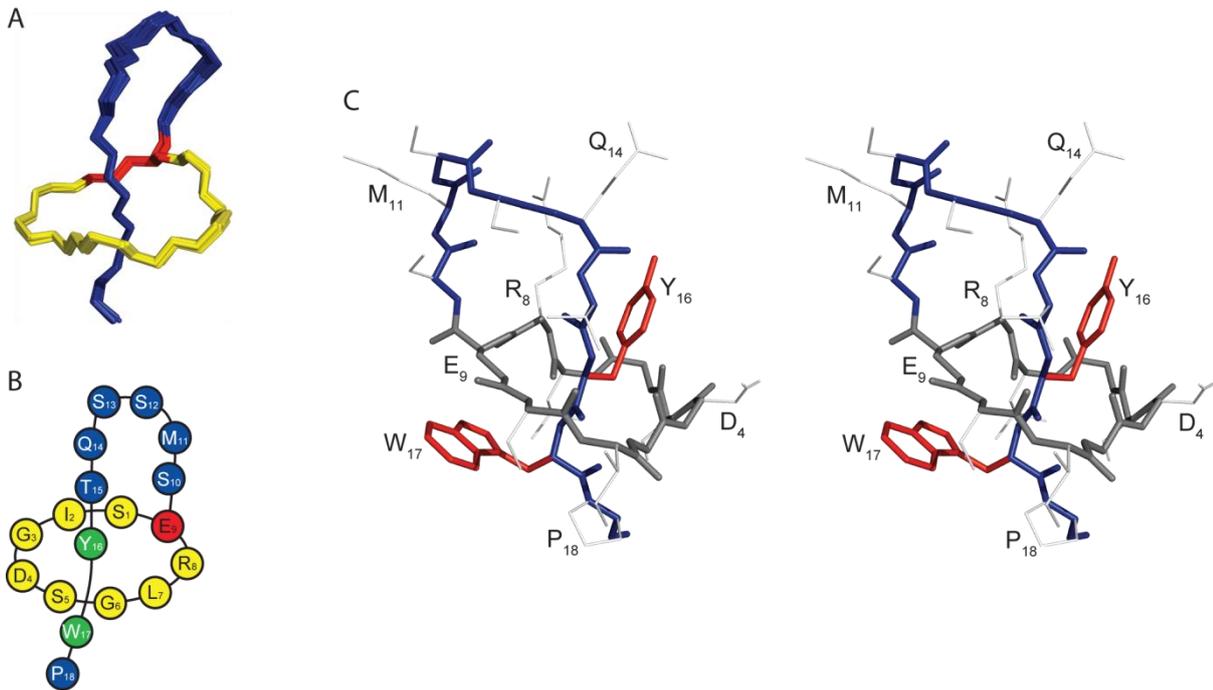


Abbildung 51 – 3D-Struktur von Caulonodin V. A Überlagerung der 15 Minimalenergiestrukturen von Caulonodin V; dargestellt sind alle Rückgratome: die Isopeptidbindung in Rot, die verbleibenden Ringaminosäuren in Gelb und der Schwanz in Blau. B Schematische Darstellung der Caulonodin V Struktur. C Repräsentative Durchschnitsstruktur von Caulonodin V als *relaxed eyes* Stereobild: Rückgrat des Schwanzes in Blau, des Rings in Dunkelgrau, Seitenketten des oberen (Tyr16) und unteren (Trp17) Stöpsels in Rot, alle anderen in Hellgrau dargestellt. Die Struktur ist gedreht und gekippt für eine bessere Sichtbarkeit der Seitenketten.

Diese dreidimensionale Lassoform entspricht der durch die Mutagenesestudien vorhergesagten Struktur und erklärt die sehr schlecht produzierten Y16A, W17A, Y16F und W17F Varianten. Gerade die entgegen den Erwartungen nur sehr schlecht produzierten Y16F und W17F Varianten werden verständlicher, wenn die Lösungsmittel-zugängliche Oberfläche des Makrolactamrings dargestellt wird (Abbildung 52). Hier offenbart sich ein sehr großes Loch in der Mitte des Makrolactamrings, durch das auch Tryptophan hindurchpassen könnte, was die beobachtete Hitzesensitivität erklärt.

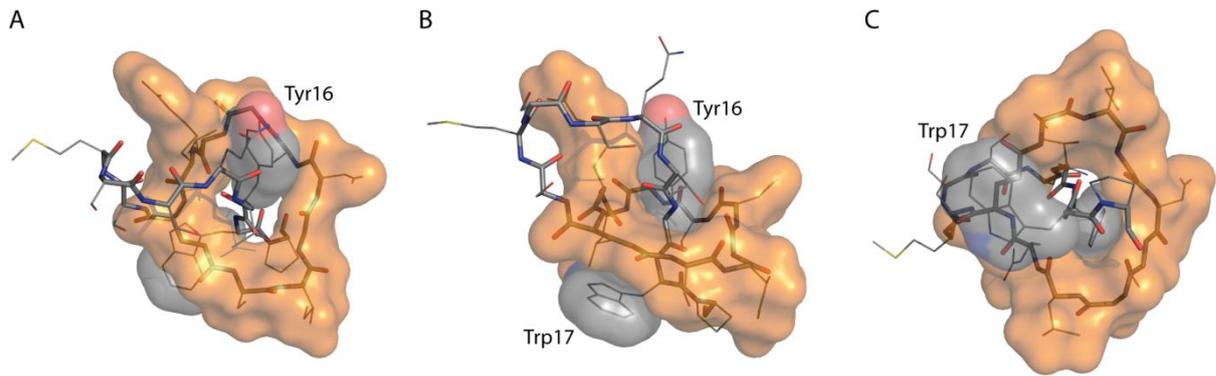


Abbildung 52 - Interaktionen des C-terminalen Peptidteils mit dem makrozyklischen Ring von Caulonodin V. 3D-Ansicht von Caulonodin V, bei der das gesamte Rückgrat und die Seitenketten der Stöpselaminosäuren Y14 und F15 als Stäbchen und der komplette Makrolactamring sowie die Seitenketten der Stöpsel als lösungsmittelzugängliche Oberfläche dargestellt sind. Ansicht **A** von oberhalb, **B** von der Seite und **C** von unterhalb des Rings. Die Isopeptidbindung befindet sich in allen Ansichten auf der linken Bildseite.

Abschließend muss durch die Isolation und Charakterisierung der vier Caulonodine, die Definition der Klasse II Lassoptide auf die Aminosäuren Alanin und Serin an Position 1 erweitert werden. Des Weiteren stellen die beiden Biomaschinerien der Caulonodine IV – VII die ersten Beispiele von Lassoamid-Prozessierungsenzymen, die zwei Aminosäuren an Position 1 gleich gut tolerieren.

6. Diskussion und Ausblick

Das in dieser Arbeit als Ausgangspunkt erstellte *Genome Mining* in Proteobakterien förderte eine große Anzahl potentieller Lasso-peptidbiosynthesegencluster zu Tage. Die Treffer konnten nach ihrer Clusterorganisation und Verwandtschaft der Proteinsequenzen in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Dabei zeigten sich einige Überraschungen, wie die große Anzahl der Cluster ohne ABC-Transporter oder mit gespaltenem B-Protein. Aus den Ergebnissen entwickelten sich zunächst zwei Projekte, die das *Genome Mining* in Proteobakterien grundsätzlich bestätigen sollten. In der Arbeit von Julian Hegemann wurden die Caulosegnine I bis III aus *C. segnis* isoliert und charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass ein Cluster in der Lage ist drei Peptide mit unterschiedlichen Ringgrößen zu produzieren. Außerdem unterscheiden sich die Caulosegnine in ihrer thermischen Stabilität deutlich. In dieser Arbeit wurde aus *A. excentricus* das Lasso-peptid Astexin-1 in verschiedenen Verkürzungen isoliert, charakterisiert und das hitzelabile Peptid durch rationale Mutagenese gegen thermische Entfaltung stabilisiert. Die weiteren Projekte aus dem *Genome Mining* sollten ungewöhnliche Vorläuferpeptide unter die Lupe nehmen und somit das Spektrum der Lasso-peptide erweitern. Dazu wurden in der Arbeit von Julian Hegemann aus *X. gardneri* und *X. citri* mit Xanthomonin I – III die ersten Siebenringlassopeptide isoliert und charakterisiert. In dieser Arbeit lag der Fokus auf alternativen Aminosäuren an Position 1 der Kernpeptidsequenz. Aus *Caulobacter* sp. K31 wurden vier neue Lasso-peptide, die Caulonodine IV bis VII isoliert und charakterisiert. Caulonodin IV, V und VII tragen ein Serin, Caulonodin VI ein Alanin an erster Stelle der Lasso-sequenz. Außerdem wurden per Mutagenese die potentiellen Stöpsel untersucht und daraus für alle Caulonodine 3D-Strukturen postuliert. Gleichzeitig wurde durch Mutagenese die Spezifität der Biomachinery für Position 1 untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Caulonodin-Biomachinery die Aminosäuren Alanin und Serin an Position 1 gleich gut akzeptieren und Glycin deutlich schlechter.

Parallel zu dieser Arbeit wurde von der Lasso-Subgruppe des AK Marahiel eine breit angelegte Bestätigung des *Genome Mining* in Proteobakterien durchgeführt [217]. Dies förderte viele weitere funktionelle Lasso-peptidbiosynthesegencluster zu Tage. Dabei wurden insgesamt 12 neue Lasso-peptide (Burhizin, Caulonodin I bis III, Rhodanodin, Rubrivinodin, Sphingonodin I und II, Syanodin I, Sphingopyxin I und II und Zucinodin) aus 10 Genclustern isoliert. Zusammen mit den vorher bekannten Clustern von Microcin J25 und Capistruin, dem während dieser Arbeit publizierten Cluster von Lariatrin [188], den drei Clustern aus den

Arbeiten von Julian Hegemann [220] und den vier Clustern aus dieser Arbeit steigt die Anzahl bekannter funktioneller Lasso-peptidcluster auf nunmehr 20. Aus unveröffentlichten Genomsequenzierdaten und laufenden *Genome Mining* Projekten kommen weitere 2 hinzu. Aus diesen 22 funktionellen Clustern können viele bioinformatische Daten gewonnen werden, die für zukünftige *Genome Mining* Ansätze oder das Verständnis der Biosynthesemaschinerien genutzt werden können.

Für weitere *Genome Mining* Suchen könnten die Kriterien für Position 1 noch stärker erweitert werden. Möglicherweise existieren auch Lasso-peptide mit Valin, Threonin oder noch größeren Resten an dieser Position. Auch die Existenz von Siebenringen, die mit Aspartat geknüpft werden, ist denkbar und falls ein Vorläufer mit solch einer Sequenz identifiziert wird, sollte er untersucht werden. Einige der durch das B-Protein zentrierte *Genome Mining* mittels PSI-BLAST gefundenen Cluster enthielten noch weitere Gene, die möglicherweise für Tailoringenzyme codieren. Darunter waren Kinasehomologe, die Phosphorylierungen katalysieren könnten, und Sulfotransferasen, die Sulfonylgruppen übertragen könnten. Bisher konnten zwar noch keine weiteren PTMs der Lasso-peptide als Makrozyklisierung und Disulfidbrücken gefunden werden, aber zukünftige Projekte könnten neue Modifikationen zu Tage fördern.

Ein weiterer Aspekt der zukünftig stärker in den Fokus rücken sollte, ist die Rolle des Leaderpeptids und seine Interaktion mit der Biosynthesemaschinerie. Ein möglicher Ansatzpunkt, wenn die Maturierungsenzyme eines Lasso-peptids nicht in löslicher Form erhalten werden können, ist die bioinformatische Sequenzanalyse. Mit dem MEME-Algorithmus lassen sich bekannte Sequenzen analysieren und konservierte Motive daraus extrahieren [203]. Da von anderen RiPPs bekannt ist, dass in den Vorläuferpeptiden meist mehr oder weniger spezifische Erkennungssequenzen für die Biomachinerie vorhanden sind, könnte dies auch für Lasso-peptide gelten. Tatsächlich konnte durch separate Anwendung des MEME Algorithmus auf alle funktionalen (30) und alle putativen Leaderpeptide (nur nicht-identische Vorläufer) aus Proteobakterien (74) ein konserviertes Motiv gefunden werden, das sich im Leaderbereich der Vorläuferpeptide befindet (Abbildung 53). Die Consensus Sequenz (LV)(IV)(DER)LGxASx(EL)T(KQR) ist zwar insgesamt nicht sehr hoch konserviert, aber eine Länge von zwölf Aminosäuren und sechs relativ hoch konservierte Reste sprechen deutlich für ein echtes Erkennungsmotiv. Das Motiv ist vor allem durch vier unpolare Reste ein hoch konserviertes Glycin, sowie ein sehr hoch konserviertes Threonin geprägt. Dieses Threonin wurde bereits in bisherigen Studien als essentiell eingestuft, was durch Mutagenesestudien bei Microcin, Capistrin, Caulosegnin und Astexin teilweise bestätigt

werden konnte [182,184,219,220]. Die Bedeutung der hydrophoben Reste sowie des Glycins könnte durch zukünftige Mutagenesestudien *in vivo* oder durch Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Vorläufern und, sofern löslich, ihren Maturierungsenzymen ergründet werden.

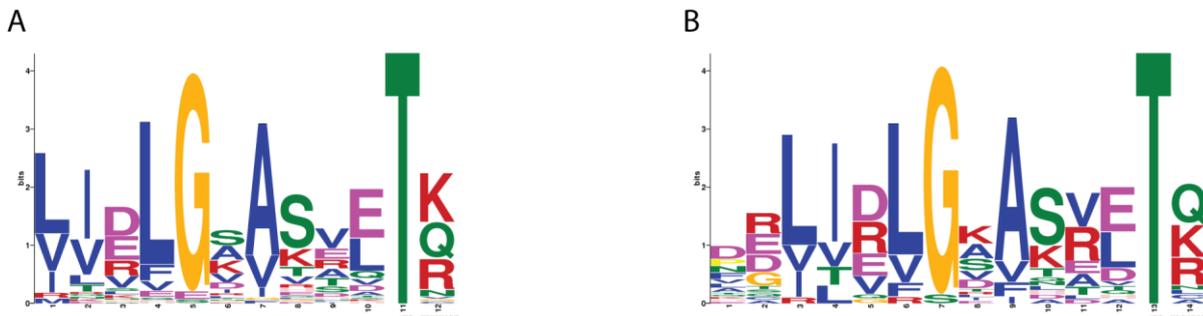


Abbildung 53 – Motive im Leaderpeptid der Lasso peptide mittels MEME-Algorithmus identifiziert. A Identifiziertes Motiv, wenn alle beim *Genome Mining* identifizierten, putativen, nicht identischen Vorläufer benutzt werden. B Identifiziertes Motiv, wenn alle Leadersequenzen der funktionalen Lasso peptide benutzt werden. Aminosäuren sind hauptsächlich nach chemischen Eigenschaften gruppiert und farbig markiert: A, C, F, I, L, V, W und M (blau); N, Q, S und T (grün); D und E (magenta); K und R (rot); H (pink); G (orange); P (gelb); Y (türkis)

Aus der Homologie der geteilten B-Proteine zu PqqD, sowie der ATP-Abhängigkeit von McjB leitet sich eine mögliche Vorläuferpeptidbindung bzw. -erkennung durch die B1-Proteine der geteilten und den N-terminalen Teil der vollständigen B-Proteine ab. Demzufolge könnte ein Bindungsmotiv in den B-Proteinen vorliegen, das mit dem Erkennungsmotiv des Leaderpeptids wechselwirkt. Auch hier könnten bioinformatische Studien neue Anhaltspunkte geben, die dann experimentell z.B. durch Mutagenese überprüft werden können.

Eher anwendungsorientierte Folgeprojekte könnten sich mit der Frage der Bioaktivitäten der Lasso peptide beschäftigen. Die Charakterisierung einer spezifischen Isopeptidase, die die Lassofaltung erkennt und nur dann die Isopeptidbindung spaltet, wirft ein neues Licht auf die biologische Funktion von Lasso peptiden [226]. Diese vermutlich zur Inaktivierung konzipierte Reaktion und das zusätzliche Vorhandensein eines TonB-abhängigen Rezeptors in unmittelbarer Nähe zu vielen Lasso peptidbiosynthesegenclustern ist eher typisch für Siderophore oder ähnliche *Scavenger*-Moleküle [227]. Auch eine Rolle beim *quorum sensing* wäre für Lasso peptide denkbar. Dabei wird das Signalmolekül möglicherweise abgebaut um dem Signal eine Art Halbwertszeit zu geben. Eine Wechselwirkung zwischen dem *quorum sensing* System Fsrc von *Enterococcus faecalis* konnte für Siamycin I beobachtet werden

[228,229]. Dies könnte eine zufällig beobachtete Bioaktivität sein, oder aber eine Strategie der Lassoproduzenten, die *quorum sensing* Systeme von Konkurrenten zu stören.

Für Lasso-peptidcluster ohne ABC-Transporter sind antimikrobielle Aktivitäten aber eher unwahrscheinlich. Andere Cluster, die weder eine Peptidase noch einen TonB-abhängigen Rezeptor in der Nähe tragen, haben meist ein solches Transportsystem, so dass hier eher mit antimikrobieller Aktivität gerechnet werden kann. Ein *Genome Mining*, das sich auf Cluster mit ABC-Transportern fokussiert, ist daher vielversprechender für die Isolierung neuer antimikrobieller Lasso-peptide. Des Weiteren könnten bei Vorhandensein geeigneter Expressionssysteme das breite *Genome Mining* auch auf Actinobacteria erweitert werden, da die bisherigen bioaktiven Lasso-peptide fast ausschließlich aus diesem Phylum isoliert wurden.

7. Literatur

1. Sneader W (2000) The discovery of aspirin: a reappraisal. *BMJ* 321: 1591-1594.
2. Fleming A (1946) The story of penicillin. *J Am Inst Homeopath* 39: 154-157.
3. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM (2003) Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 66: 1022-1037.
4. Karras G, Giannakaki V, Kotsis V, Miyakis S (2012) Novel antimicrobial agents against multi-drug-resistant gram-negative bacteria: an overview. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 7: 175-181.
5. Singh SB, Barrett JF (2006) Empirical antibacterial drug discovery--foundation in natural products. *Biochem Pharmacol* 71: 1006-1015.
6. Bundesamt S (2011) Todesursache 2011: Krebs immer häufiger. Statistisches Bundesamt.
7. Belousoff MJ, Davidovich C, Zimmerman E, Caspi Y, Wekselman I, et al. (2010) Ancient machinery embedded in the contemporary ribosome. *Biochem Soc Trans* 38: 422-427.
8. Giessen TW, Marahiel MA (2012) Ribosome-independent biosynthesis of biologically active peptides: Application of synthetic biology to generate structural diversity. *FEBS Lett* 586: 2065-2075.
9. Fawaz MV, Topper ME, Firestine SM (2011) The ATP-grasp enzymes. *Bioorg Chem* 39: 185-191.
10. Hollenhorst MA, Clardy J, Walsh CT (2009) The ATP-dependent amide ligases DdaG and DdaF assemble the fumaramoyl-dipeptide scaffold of the dapdiamide antibiotics. *Biochemistry* 48: 10467-10472.
11. Dawlaty J, Zhang X, Fischbach MA, Clardy J (2010) Dapdiamides, tripeptide antibiotics formed by unconventional amide ligases. *J Nat Prod* 73: 441-446.
12. Zhang W, Ntai I, Kelleher NL, Walsh CT (2011) tRNA-dependent peptide bond formation by the transferase PacB in biosynthesis of the pacidamycin group of pentapeptidyl nucleoside antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 12249-12253.
13. Lautru S, Gondry M, Genet R, Pernodet JL (2002) The albonoursin gene Cluster of *S. noursei* biosynthesis of diketopiperazine metabolites independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* 9: 1355-1364.
14. Gondry M, Sauguet L, Belin P, Thai R, Amouroux R, et al. (2009) Cyclodipeptide synthases are a family of tRNA-dependent peptide bond-forming enzymes. *Nat Chem Biol* 5: 414-420.
15. Sauguet L, Moutiez M, Li Y, Belin P, Seguin J, et al. (2011) Cyclodipeptide synthases, a family of class-I aminoacyl-tRNA synthetase-like enzymes involved in non-ribosomal peptide synthesis. *Nucleic Acids Res* 39: 4475-4489.
16. Stachelhaus T, Marahiel MA (1995) Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS Microbiol Lett* 125: 3-14.
17. Carter CW, Jr. (1993) Cognition, mechanism, and evolutionary relationships in aminoacyl-tRNA synthetases. *Annu Rev Biochem* 62: 715-748.
18. Weber T, Marahiel MA (2001) Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases. *Structure* 9: R3-9.
19. Walsh CT, Chen H, Keating TA, Hubbard BK, Losey HC, et al. (2001) Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Curr Opin Chem Biol* 5: 525-534.
20. Kraas FI, Helmetag V, Wittmann M, Strieker M, Marahiel MA (2010) Functional dissection of surfactin synthetase initiation module reveals insights into the mechanism of lipoinitiation. *Chem Biol* 17: 872-880.
21. Caboche S, Pupin M, Leclere V, Fontaine A, Jacques P, et al. (2008) NORINE: a database of nonribosomal peptides. *Nucleic Acids Res* 36: D326-331.
22. Arnison PG, Bibb MJ, Bierbaum G, Bowers AA, Bugni TS, et al. (2013) Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat Prod Rep* 30: 108-160.

23. Oman TJ, van der Donk WA (2010) Follow the leader: the use of leader peptides to guide natural product biosynthesis. *Nat Chem Biol* 6: 9-18.
24. Schmidt EW, Nelson JT, Rasko DA, Sudek S, Eisen JA, et al. (2005) Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in *Prochloron didemni*, the cyanobacterial symbiont of *Lissoclinum patella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 7315-7320.
25. Hallen HE, Luo H, Scott-Craig JS, Walton JD (2007) Gene family encoding the major toxins of lethal *Amanita* mushrooms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 19097-19101.
26. Trabi M, Mylne JS, Sando L, Craik DJ (2009) Circular proteins from *Melicactus* (Violaceae) refine the conserved protein and gene architecture of cyclotides. *Org Biomol Chem* 7: 2378-2388.
27. Huo L, Rachid S, Stadler M, Wenzel SC, Muller R (2012) Synthetic biotechnology to study and engineer ribosomal bottromycin biosynthesis. *Chem Biol* 19: 1278-1287.
28. Crone WJK, Leeper FJ, Truman AW (2012) Identification and characterisation of the gene cluster for the anti-MRSA antibiotic bottromycin: expanding the biosynthetic diversity of ribosomal peptides. *Chemical Science* 3: 3516-3521.
29. Gomez-Escribano JP, Song LJ, Bibb MJ, Challis GL (2012) Posttranslational beta-methylation and macrolactamidation in the biosynthesis of the bottromycin complex of ribosomal peptide antibiotics. *Chemical Science* 3: 3522-3525.
30. Hou Y, Tianero MD, Kwan JC, Wyche TP, Michel CR, et al. (2012) Structure and biosynthesis of the antibiotic bottromycin D. *Org Lett* 14: 5050-5053.
31. van der Meer JR, Polman J, Beerthuyzen MM, Siezen RJ, Kuipers OP, et al. (1993) Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes *nisP*, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and *nisR*, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis. *J Bacteriol* 175: 2578-2588.
32. Rogers LA (1928) The Inhibiting Effect of *Streptococcus Lactis* on *Lactobacillus Bulgaricus*. *J Bacteriol* 16: 321-325.
33. Gross E, Morell JL (1971) The structure of nisin. *J Am Chem Soc* 93: 4634-4635.
34. Chatterjee C, Miller LM, Leung YL, Xie L, Yi M, et al. (2005) Lactacin 481 synthetase phosphorylates its substrate during lantibiotic production. *J Am Chem Soc* 127: 15332-15333.
35. Muller WM, Schmiederer T, Enslie P, Sussmuth RD (2010) In vitro biosynthesis of the prepeptide of type-III lantibiotic labyrinthopeptin A2 including formation of a C-C bond as a post-translational modification. *Angew Chem Int Ed Engl* 49: 2436-2440.
36. Goto Y, Li B, Claesen J, Shi Y, Bibb MJ, et al. (2010) Discovery of unique lanthionine synthetases reveals new mechanistic and evolutionary insights. *PLoS Biol* 8: e1000339.
37. Weil HP, Beck-Sickinger AG, Metzger J, Stevanovic S, Jung G, et al. (1990) Biosynthesis of the lantibiotic Pep5. Isolation and characterization of a prepeptide containing dehydroamino acids. *Eur J Biochem* 194: 217-223.
38. Karakas Sen A, Narbad A, Horn N, Dodd HM, Parr AJ, et al. (1999) Post-translational modification of nisin. The involvement of NisB in the dehydration process. *Eur J Biochem* 261: 524-532.
39. Koponen O, Tolonen M, Qiao M, Wahlstrom G, Helin J, et al. (2002) NisB is required for the dehydration and NisC for the lanthionine formation in the post-translational modification of nisin. *Microbiology* 148: 3561-3568.
40. Meyer C, Bierbaum G, Heidrich C, Reis M, Suling J, et al. (1995) Nucleotide sequence of the lantibiotic Pep5 biosynthetic gene cluster and functional analysis of PepP and PepC. Evidence for a role of PepC in thioether formation. *Eur J Biochem* 232: 478-489.
41. Li B, Yu JP, Brunzelle JS, Moll GN, van der Donk WA, et al. (2006) Structure and mechanism of the lantibiotic cyclase involved in nisin biosynthesis. *Science* 311: 1464-1467.
42. Helfrich M, Entian KD, Stein T (2007) Structure-function relationships of the lanthionine cyclase SpaC involved in biosynthesis of the *Bacillus subtilis* peptide antibiotic subtilin. *Biochemistry* 46: 3224-3233.
43. Xie L, Miller LM, Chatterjee C, Averin O, Kelleher NL, et al. (2004) Lactacin 481: in vitro reconstitution of lantibiotic synthetase activity. *Science* 303: 679-681.

44. Patton GC, Paul M, Cooper LE, Chatterjee C, van der Donk WA (2008) The importance of the leader sequence for directing lanthionine formation in lactacin 481. *Biochemistry* 47: 7342-7351.
45. Muller WM, Enslie P, Krawczyk B, Sussmuth RD (2011) Leader peptide-directed processing of labyrinthopeptin A2 precursor peptide by the modifying enzyme LabKC. *Biochemistry* 50: 8362-8373.
46. Oman TJ, Knerr PJ, Bindman NA, Velasquez JE, van der Donk WA (2012) An engineered lantibiotic synthetase that does not require a leader peptide on its substrate. *J Am Chem Soc* 134: 6952-6955.
47. Kupke T, Kempter C, Jung G, Gotz F (1995) Oxidative decarboxylation of peptides catalyzed by flavoprotein EpiD. Determination of substrate specificity using peptide libraries and neutral loss mass spectrometry. *J Biol Chem* 270: 11282-11289.
48. Okesli A, Cooper LE, Fogle EJ, van der Donk WA (2011) Nine post-translational modifications during the biosynthesis of cinnamycin. *J Am Chem Soc* 133: 13753-13760.
49. Shi Y, Bueno A, van der Donk WA (2012) Heterologous production of the lantibiotic Ala(0)actagardine in *Escherichia coli*. *Chem Commun (Camb)* 48: 10966-10968.
50. Levensgood MR, Patton GC, van der Donk WA (2007) The leader peptide is not required for post-translational modification by lactacin 481 synthetase. *J Am Chem Soc* 129: 10314-10315.
51. Khusainov R, Kuipers OP (2012) When the leader gets loose: in vivo biosynthesis of a leaderless prenisin is stimulated by a trans-acting leader peptide. *Chembiochem* 13: 2433-2438.
52. Lubelski J, Rink R, Khusainov R, Moll GN, Kuipers OP (2008) Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cell Mol Life Sci* 65: 455-476.
53. Meindl K, Schmiederer T, Schneider K, Reicke A, Butz D, et al. (2010) Labyrinthopeptins: a new class of carbacyclic lantibiotics. *Angew Chem Int Ed Engl* 49: 1151-1154.
54. Claesen J, Bibb M (2010) Genome mining and genetic analysis of cypemycin biosynthesis reveal an unusual class of posttranslationally modified peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 16297-16302.
55. Minami Y, Yoshida K, Azuma R, Urakawa A, Kawauchi T, et al. (1994) Structure of Cypemycin, a New Peptide Antibiotic. *Tetrahedron Letters* 35: 8001-8004.
56. Kempter C, Kupke T, Kaiser D, Metzger JW, Jung G (1996) Thioenols from peptidyl cysteines: Oxidative decarboxylation of a C-13-labeled substrate. *Angewandte Chemie-International Edition in English* 35: 2104-2107.
57. Fluhe L, Knappe TA, Gattner MJ, Schafer A, Burghaus O, et al. (2012) The radical SAM enzyme AlbA catalyzes thioether bond formation in subtilosin A. *Nat Chem Biol* 8: 350-357.
58. Rea MC, Sit CS, Clayton E, O'Connor PM, Whittall RM, et al. (2010) Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 9352-9357.
59. Sit CS, van Belkum MJ, McKay RT, Worobo RW, Vederas JC (2011) The 3D solution structure of thurincin H, a bacteriocin with four sulfur to alpha-carbon crosslinks. *Angew Chem Int Ed Engl* 50: 8718-8721.
60. Liu WT, Yang YL, Xu Y, Lamsa A, Haste NM, et al. (2010) Imaging mass spectrometry of intraspecies metabolic exchange revealed the cannibalistic factors of *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 16286-16290.
61. Fluhe L, Burghaus O, Wieckowski BM, Giessen TW, Linne U, et al. (2013) Two [4Fe-4S] clusters containing radical SAM enzyme SkfB catalyze thioether bond formation during the maturation of the sporulation killing factor. *J Am Chem Soc* 135: 959-962.
62. Fluhe L, Marahiel MA (2013) Radical S-adenosylmethionine enzyme catalyzed thioether bond formation in sactipeptide biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* 17: 605-612.
63. Thennarasu S, Lee DK, Poon A, Kawulka KE, Vederas JC, et al. (2005) Membrane permeabilization, orientation, and antimicrobial mechanism of subtilosin A. *Chem Phys Lipids* 137: 38-51.
64. Yamamoto K, Xu J, Kawulka KE, Vederas JC, Ramamoorthy A (2010) Use of a copper-chelated lipid speeds up NMR measurements from membrane proteins. *J Am Chem Soc* 132: 6929-6931.

65. Zheng G, Yan LZ, Vederas JC, Zuber P (1999) Genes of the *sbo*-*alb* locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilisin. *J Bacteriol* 181: 7346-7355.
66. Todd EW (1938) The differentiation of two distinct serological varieties of streptolysin, streptolysin O and streptolysin S. *Journal of Pathology and Bacteriology* 47: 423-445.
67. Weld JT (1934) The toxic properties of serum extracts of hemolytic streptococci. *Journal of Experimental Medicine* 59: 83-95.
68. Nizet V, Beall B, Bast DJ, Datta V, Kilburn L, et al. (2000) Genetic locus for streptolysin S production by group A streptococcus. *Infect Immun* 68: 4245-4254.
69. Li YM, Milne JC, Madison LL, Kolter R, Walsh CT (1996) From peptide precursors to oxazole and thiazole-containing peptide antibiotics: microcin B17 synthase. *Science* 274: 1188-1193.
70. Walsh CT, Malcolmson SJ, Young TS (2012) Three ring posttranslational circuses: insertion of oxazoles, thiazoles, and pyridines into protein-derived frameworks. *ACS Chem Biol* 7: 429-442.
71. Melby JO, Nard NJ, Mitchell DA (2011) Thiazole/oxazole-modified microcins: complex natural products from ribosomal templates. *Curr Opin Chem Biol* 15: 369-378.
72. Dunbar KL, Melby JO, Mitchell DA (2012) YcaO domains use ATP to activate amide backbones during peptide cyclodehydrations. *Nat Chem Biol* 8: 569-575.
73. Milne JC, Roy RS, Eliot AC, Kelleher NL, Wokhlu A, et al. (1999) Cofactor requirements and reconstitution of microcin B17 synthetase: a multienzyme complex that catalyzes the formation of oxazoles and thiazoles in the antibiotic microcin B17. *Biochemistry* 38: 4768-4781.
74. Lee SW, Mitchell DA, Markley AL, Hensler ME, Gonzalez D, et al. (2008) Discovery of a widely distributed toxin biosynthetic gene cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 5879-5884.
75. Onaka H, Nakaho M, Hayashi K, Igarashi Y, Furumai T (2005) Cloning and characterization of the goadsporin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0584. *Microbiology* 151: 3923-3933.
76. Igarashi Y, Kan Y, Fujii K, Fujita T, Harada K, et al. (2001) Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and Morphogenesis in streptomycetes. II. Structure determination. *J Antibiot (Tokyo)* 54: 1045-1053.
77. Onaka H, Tabata H, Igarashi Y, Sato Y, Furumai T (2001) Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in streptomycetes. I. Purification and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 54: 1036-1044.
78. Su TL (1948) Micrococcin, an antibacterial substance formed by a strain of *Micrococcus*. *Br J Exp Pathol* 29: 473-481.
79. Bagley MC, Dale JW, Merritt EA, Xiong X (2005) Thiopeptide antibiotics. *Chem Rev* 105: 685-714.
80. Carnio MC, Holtzel A, Rudolf M, Henle T, Jung G, et al. (2000) The macrocyclic peptide antibiotic micrococcin P(1) is secreted by the food-borne bacterium *Staphylococcus equorum* WS 2733 and inhibits *Listeria monocytogenes* on soft cheese. *Appl Environ Microbiol* 66: 2378-2384.
81. Bycroft BW, Gowland MS (1978) The structures of the highly modified peptide antibiotics micrococcin P1 and P2. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*: 256-258.
82. Bowers AA, Walsh CT, Acker MG (2010) Genetic interception and structural characterization of thiopeptide cyclization precursors from *Bacillus cereus*. *J Am Chem Soc* 132: 12182-12184.
83. Rodnina MV, Savelsbergh A, Matassova NB, Katunin VI, Semenov YP, et al. (1999) Thiostrepton inhibits the turnover but not the GTPase of elongation factor G on the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 9586-9590.
84. Mikolajka A, Liu H, Chen Y, Starosta AL, Marquez V, et al. (2011) Differential effects of thiopeptide and orthosomycin antibiotics on translational GTPases. *Chem Biol* 18: 589-600.
85. Starosta AL, Qin H, Mikolajka A, Leung GY, Schwinghammer K, et al. (2009) Identification of distinct thiopeptide-antibiotic precursor lead compounds using translation machinery assays. *Chem Biol* 16: 1087-1096.
86. Lentzen G, Klinck R, Matassova N, Aboul-ela F, Murchie AI (2003) Structural basis for contrasting activities of ribosome binding thiazole antibiotics. *Chem Biol* 10: 769-778.

87. Porse BT, Cundliffe E, Garrett RA (1999) The antibiotic micrococcin acts on protein L11 at the ribosomal GTPase centre. *J Mol Biol* 287: 33-45.
88. Porse BT, Leviev I, Mankin AS, Garrett RA (1998) The antibiotic thiostrepton inhibits a functional transition within protein L11 at the ribosomal GTPase centre. *J Mol Biol* 276: 391-404.
89. McConkey GA, Rogers MJ, McCutchan TF (1997) Inhibition of *Plasmodium falciparum* protein synthesis. Targeting the plastid-like organelle with thiostrepton. *J Biol Chem* 272: 2046-2049.
90. Rogers MJ, Cundliffe E, McCutchan TF (1998) The antibiotic micrococcin is a potent inhibitor of growth and protein synthesis in the malaria parasite. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 715-716.
91. Aminake MN, Schoof S, Sologub L, Leubner M, Kirschner M, et al. (2011) Thiostrepton and derivatives exhibit antimalarial and gametocytocidal activity by dually targeting parasite proteasome and apicoplast. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 1338-1348.
92. Bhat UG, Halasi M, Gartel AL (2009) FoxM1 is a general target for proteasome inhibitors. *PLoS One* 4: e6593.
93. Pandit B, Gartel AL (2011) Thiazole antibiotic thiostrepton synergize with bortezomib to induce apoptosis in cancer cells. *PLoS One* 6: e17110.
94. Hegde NS, Sanders DA, Rodriguez R, Balasubramanian S (2011) The transcription factor FOXM1 is a cellular target of the natural product thiostrepton. *Nat Chem* 3: 725-731.
95. Ireland C, Scheuer PJ (1980) Ulicyclamide and Ulithiacyclamide, 2 New Small Peptides from a Marine Tunicate. *J Am Chem Soc* 102: 5688-5691.
96. Hambley TW, Hawkins CJ, Lavin MF, Vandenbrenk A, Watters DJ (1992) Cyclohexazoline - a Cytotoxic Cyclic Hexapeptide from the Ascidian *Lissoclinum-Bistratum*. *Tetrahedron* 48: 341-348.
97. Prinsep MR, Moore RE, Levine IA, Patterson GM (1992) Westiellamide, a bistratamide-related cyclic peptide from the blue-green alga *Westiellopsis prolifica*. *J Nat Prod* 55: 140-142.
98. Long PF, Dunlap WC, Battershill CN, Jaspars M (2005) Shotgun cloning and heterologous expression of the patellamide gene cluster as a strategy to achieving sustained metabolite production. *Chembiochem* 6: 1760-1765.
99. Donia MS, Schmidt EW (2010) 2.16 - Cyanobactins – Ubiquitous Cyanobacterial Ribosomal Peptide Metabolites. In: Editors-in-Chief: Lew M, Hung-Wen L, editors. *Comprehensive Natural Products II*. Oxford: Elsevier. pp. 539-558.
100. Donia MS, Ravel J, Schmidt EW (2008) A global assembly line for cyanobactins. *Nat Chem Biol* 4: 341-343.
101. Sivonen K, Leikoski N, Fewer DP, Jokela J (2010) Cyanobactins-ribosomal cyclic peptides produced by cyanobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 86: 1213-1225.
102. Donia MS, Schmidt EW (2011) Linking chemistry and genetics in the growing cyanobactin natural products family. *Chem Biol* 18: 508-519.
103. McIntosh JA, Schmidt EW (2010) Marine molecular machines: heterocyclization in cyanobactin biosynthesis. *Chembiochem* 11: 1413-1421.
104. McIntosh JA, Donia MS, Schmidt EW (2010) Insights into heterocyclization from two highly similar enzymes. *J Am Chem Soc* 132: 4089-4091.
105. Lee J, McIntosh J, Hathaway BJ, Schmidt EW (2009) Using marine natural products to discover a protease that catalyzes peptide macrocyclization of diverse substrates. *J Am Chem Soc* 131: 2122-2124.
106. McIntosh JA, Robertson CR, Agarwal V, Nair SK, Bulaj GW, et al. (2010) Circular logic: nonribosomal peptide-like macrocyclization with a ribosomal peptide catalyst. *J Am Chem Soc* 132: 15499-15501.
107. Koehnke J, Bent A, Housen WE, Zollman D, Morawitz F, et al. (2012) The mechanism of patellamide macrocyclization revealed by the characterization of the PatG macrocyclase domain. *Nat Struct Mol Biol* 19: 767-772.
108. McIntosh JA, Donia MS, Nair SK, Schmidt EW (2011) Enzymatic basis of ribosomal peptide prenylation in cyanobacteria. *J Am Chem Soc* 133: 13698-13705.

109. Leikoski N, Fewer DP, Jokela J, Wahlsten M, Rouhiainen L, et al. (2010) Highly diverse cyanobactins in strains of the genus *Anabaena*. *Appl Environ Microbiol* 76: 701-709.
110. Houssem WE, Jaspars M (2010) Azole-based cyclic peptides from the sea squirt *Lissoclinum patella*: old scaffolds, new avenues. *Chembiochem* 11: 1803-1815.
111. Carroll AR, Coll JC, Bourne DJ, MacLeod JK, Zabriskie TM, et al. (1996) Patellins 1-6 and trunkamide A: Novel cyclic hexa-, hepta- and octa-peptides from colonial ascidians, *Lissoclinum* sp. *Australian Journal of Chemistry* 49: 659-667.
112. Shimamura H, Gouda H, Nagai K, Hirose T, Ichioka M, et al. (2009) Structure Determination and Total Synthesis of Bottromycin A(2): A Potent Antibiotic against MRSA and VRE. *Angewandte Chemie-International Edition* 48: 914-917.
113. Zhang Q, van der Donk WA, Liu W (2012) Radical-mediated enzymatic methylation: a tale of two SAMS. *Acc Chem Res* 45: 555-564.
114. Kobayashi Y, Ichioka M, Hirose T, Nagai K, Matsumoto A, et al. (2010) Bottromycin derivatives: efficient chemical modifications of the ester moiety and evaluation of anti-MRSA and anti-VRE activities. *Bioorg Med Chem Lett* 20: 6116-6120.
115. Otaka T, Kaji A (1981) Mode of action of bottromycin A2: effect on peptide bond formation. *FEBS Lett* 123: 173-176.
116. Otaka T, Kaji A (1983) Mode of action of bottromycin A2: effect of bottromycin A2 on polysomes. *FEBS Lett* 153: 53-59.
117. Hamada T, Sugawara T, Matsunaga S, Fusetani N (1994) Polytheonamides, Unprecedented Highly Cytotoxic Polypeptides, from the Marine Sponge *Theonella-Swinhoei* .1. Isolation and Component Amino-Acids. *Tetrahedron Letters* 35: 719-720.
118. Hentschel U, Hopke J, Horn M, Friedrich AB, Wagner M, et al. (2002) Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl Environ Microbiol* 68: 4431-4440.
119. Hamada T, Matsunaga S, Yano G, Fusetani N (2005) Polytheonamides A and B, highly cytotoxic, linear polypeptides with unprecedented structural features, from the marine sponge, *Theonella swinhoei*. *J Am Chem Soc* 127: 110-118.
120. Freeman MF, Gurgui C, Helf MJ, Morinaka BI, Uria AR, et al. (2012) Metagenome mining reveals polytheonamides as posttranslationally modified ribosomal peptides. *Science* 338: 387-390.
121. Haft DH, Basu MK, Mitchell DA (2010) Expansion of ribosomally produced natural products: a nitrile hydratase- and Nif11-related precursor family. *BMC Biol* 8: 70.
122. Li B, Sher D, Kelly L, Shi Y, Huang K, et al. (2010) Catalytic promiscuity in the biosynthesis of cyclic peptide secondary metabolites in planktonic marine cyanobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 10430-10435.
123. Ishitsuka MO, Kusumi T, Kakisawa H, Kaya K, Watanabe MM (1990) Microviridin - a Novel Tricyclic Depsipeptide from the Toxic Cyanobacterium *Microcystis-Viridis*. *J Am Chem Soc* 112: 8180-8182.
124. Galperin MY, Koonin EV (1997) A diverse superfamily of enzymes with ATP-dependent carboxylate-amine/thiol ligase activity. *Protein Sci* 6: 2639-2643.
125. Philmus B, Christiansen G, Yoshida WY, Hemscheidt TK (2008) Post-translational modification in microviridin biosynthesis. *Chembiochem* 9: 3066-3073.
126. Ziemert N, Ishida K, Liaimer A, Hertweck C, Dittmann E (2008) Ribosomal synthesis of tricyclic depsipeptides in bloom-forming cyanobacteria. *Angew Chem Int Ed Engl* 47: 7756-7759.
127. Philmus B, Guerrette JP, Hemscheidt TK (2009) Substrate specificity and scope of MvdD, a GRASP-like ligase from the microviridin biosynthetic gene cluster. *ACS Chem Biol* 4: 429-434.
128. Weiz AR, Ishida K, Makower K, Ziemert N, Hertweck C, et al. (2011) Leader peptide and a membrane protein scaffold guide the biosynthesis of the tricyclic peptide microviridin. *Chem Biol* 18: 1413-1421.
129. Okino T, Matsuda H, Murakami M, Yamaguchi K (1995) New Microviridins, Elastase Inhibitors from the Blue-Green-Alga *Microcystis-Aeruginosa*. *Tetrahedron* 51: 10679-10686.

130. Rohrlack T, Christoffersen K, Kaebernick M, Neilan BA (2004) Cyanobacterial protease inhibitor microviridin J causes a lethal molting disruption in *Daphnia pulex*. *Appl Environ Microbiol* 70: 5047-5050.
131. Sanchez-Barrena MJ, Martinez-Ripoll M, Galvez A, Valdivia E, Maqueda M, et al. (2003) Structure of bacteriocin AS-48: from soluble state to membrane bound state. *J Mol Biol* 334: 541-549.
132. Martin-Visscher LA, Gong X, Duszyk M, Vederas JC (2009) The three-dimensional structure of carnocyclin A reveals that many circular bacteriocins share a common structural motif. *J Biol Chem* 284: 28674-28681.
133. van Belkum MJ, Martin-Visscher LA, Vederas JC (2011) Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends Microbiol* 19: 411-418.
134. Walton JD, Hallen-Adams HE, Luo H (2010) Ribosomal biosynthesis of the cyclic peptide toxins of *Amanita* mushrooms. *Biopolymers* 94: 659-664.
135. Wang CK, Kaas Q, Chiche L, Craik DJ (2008) CyBase: a database of cyclic protein sequences and structures, with applications in protein discovery and engineering. *Nucleic Acids Res* 36: D206-210.
136. Tan NH, Zhou J (2006) Plant cyclopeptides. *Chem Rev* 106: 840-895.
137. Wieland T, Faulstich H (1978) Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: the biologically active components of poisonous *Amanita* mushrooms. *CRC Crit Rev Biochem* 5: 185-260.
138. Craik DJ, Daly NL, Bond T, Waine C (1999) Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. *J Mol Biol* 294: 1327-1336.
139. Saether O, Craik DJ, Campbell ID, Sletten K, Juul J, et al. (1995) Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the uterotonic polypeptide kalata B1. *Biochemistry* 34: 4147-4158.
140. Chiche L, Heitz A, Gelly JC, Gracy J, Chau PT, et al. (2004) Squash inhibitors: from structural motifs to macrocyclic knottins. *Curr Protein Pept Sci* 5: 341-349.
141. Saska I, Gillon AD, Hatsugai N, Dietzgen RG, Hara-Nishimura I, et al. (2007) An asparaginyl endopeptidase mediates in vivo protein backbone cyclization. *J Biol Chem* 282: 29721-29728.
142. Gillon AD, Saska I, Jennings CV, Guarino RF, Craik DJ, et al. (2008) Biosynthesis of circular proteins in plants. *Plant J* 53: 505-515.
143. Gruber CW, Cemazar M, Clark RJ, Horibe T, Renda RF, et al. (2007) A novel plant protein-disulfide isomerase involved in the oxidative folding of cystine knot defense proteins. *J Biol Chem* 282: 20435-20446.
144. Dutton JL, Renda RF, Waine C, Clark RJ, Daly NL, et al. (2004) Conserved structural and sequence elements implicated in the processing of gene-encoded circular proteins. *J Biol Chem* 279: 46858-46867.
145. Morita H, Takeya K (2010) Bioactive Cyclic Peptides from Higher Plants. *Heterocycles* 80: 739-764.
146. Morita H, Shishido A, Kayashita T, Shimomura M, Takeya K, et al. (1994) Cyclic Peptide from Higher-Plants .14. 2 Novel Cyclic-Peptides, Yunnanin-a and Yunnanin-B from *Stellaria Yunnanensis*. *Chemistry Letters*: 2415-2418.
147. Morita H, Kayashita T, Uchida A, Takeya K, Itokawa H (1997) Cyclic peptides from higher plants .33. Delavayins A-C, three new cyclic peptides from *Stellaria delavayi*. *J Nat Prod* 60: 212-215.
148. Picur B, Lisowski M, Siemion IZ (1998) A new cyclolinopeptide containing nonproteinaceous amino acid N-methyl-4-aminoproline. *Letters in Peptide Science* 5: 183-187.
149. Condie JA, Nowak G, Reed DW, Balsevich JJ, Reaney MJ, et al. (2011) The biosynthesis of Caryophyllaceae-like cyclic peptides in *Saponaria vaccaria* L. from DNA-encoded precursors. *Plant J* 67: 682-690.
150. Maksimov MO, Pan SJ, James Link A (2012) Lasso peptides: structure, function, biosynthesis, and engineering. *Nat Prod Rep* 29: 996-1006.

151. Rebuffat S, Blond A, Destoumieux-Garzon D, Goulard C, Peduzzi J (2004) Microcin J25, from the macrocyclic to the lasso structure: implications for biosynthetic, evolutionary and biotechnological perspectives. *Curr Protein Pept Sci* 5: 383-391.
152. Potterat O, Wagner K, Gemmecker G, Mack J, Puder C, et al. (2004) BI-32169, a bicyclic 19-peptide with strong glucagon receptor antagonist activity from *Streptomyces* sp. *J Nat Prod* 67: 1528-1531.
153. Lin PF, Samanta H, Bechtold CM, Deminie CA, Patick AK, et al. (1996) Characterization of siamycin I, a human immunodeficiency virus fusion inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 133-138.
154. Frechet D, Guitton JD, Herman F, Faucher D, Helyncck G, et al. (1994) Solution structure of RP 71955, a new 21 amino acid tricyclic peptide active against HIV-1 virus. *Biochemistry* 33: 42-50.
155. Yano K, Yamasaki M, Yoshida M, Matsuda Y, Yamaguchi K (1995) RES-701-2, a novel and selective endothelin type B receptor antagonist produced by *Streptomyces* sp. II. Determination of the primary structure. *J Antibiot (Tokyo)* 48: 1368-1370.
156. Katahira R, Shibata K, Yamasaki M, Matsuda Y, Yoshida M (1995) Solution structure of endothelin B receptor selective antagonist RES-701-1 determined by ¹H NMR spectroscopy. *Bioorg Med Chem* 3: 1273-1280.
157. Wyss DF, Lahm HW, Manneberg M, Labhardt AM (1991) Anantin--a peptide antagonist of the atrial natriuretic factor (ANF). II. Determination of the primary sequence by NMR on the basis of proton assignments. *J Antibiot (Tokyo)* 44: 172-180.
158. Weber W, Fischli W, Hochuli E, Kupfer E, Weibel EK (1991) Anantin--a peptide antagonist of the atrial natriuretic factor (ANF). I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)* 44: 164-171.
159. Iwatsuki M, Uchida R, Takakusagi Y, Matsumoto A, Jiang CL, et al. (2007) Lariatins, novel antimycobacterial peptides with a lasso structure, produced by *Rhodococcus jostii* K01-B0171. *J Antibiot (Tokyo)* 60: 357-363.
160. Kimura K, Kanou F, Takahashi H, Esumi Y, Uramoto M, et al. (1997) Propeptin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase produced by *Microbispora*. I. Fermentation, isolation and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* 50: 373-378.
161. Yano K, Toki S, Nakanishi S, Ochiai K, Ando K, et al. (1996) MS-271, a novel inhibitor of calmodulin-activated myosin light chain kinase from *Streptomyces* sp.--I. Isolation, structural determination and biological properties of MS-271. *Bioorg Med Chem* 4: 115-120.
162. Kuznedelov K, Semenova E, Knappe TA, Mukhamedyarov D, Srivastava A, et al. (2011) The antibacterial threaded-lasso peptide capistruin inhibits bacterial RNA polymerase. *J Mol Biol* 412: 842-848.
163. Adelman K, Yuzenkova J, La Porta A, Zenkin N, Lee J, et al. (2004) Molecular mechanism of transcription inhibition by peptide antibiotic Microcin J25. *Mol Cell* 14: 753-762.
164. Katahira R, Yamasaki M, Matsuda Y, Yoshida M (1996) MS-271, a novel inhibitor of calmodulin-activated myosin light chain kinase from *Streptomyces* sp.--II. Solution structure of MS-271: characteristic features of the "lasso" structure. *Bioorg Med Chem* 4: 121-129.
165. Tsunakawa M, Hu SL, Hoshino Y, Detlefsen DJ, Hill SE, et al. (1995) Siamycins I and II, new anti-HIV peptides: I. Fermentation, isolation, biological activity and initial characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 48: 433-434.
166. Detlefsen DJ, Hill SE, Volk KJ, Klohr SE, Tsunakawa M, et al. (1995) Siamycins I and II, new anti-HIV-1 peptides: II. Sequence analysis and structure determination of siamycin I. *J Antibiot (Tokyo)* 48: 1515-1517.
167. Helyncck G, Dubertret C, Mayaux JF, Leboul J (1993) Isolation of RP 71955, a new anti-HIV-1 peptide secondary metabolite. *J Antibiot (Tokyo)* 46: 1756-1757.
168. Potterat O, Stephan H, Metzger JW, Gnau V, Zähler H, et al. (1994) Aborycin - a tricyclic 21-peptide antibiotic isolated from *Streptomyces griseoflavus*. *Liebigs Ann Chem*: 741-743.

169. Constantine KL, Friedrichs MS, Detlefsen D, Nishio M, Tsunakawa M, et al. (1995) High-resolution solution structure of siamycin II: novel amphipathic character of a 21-residue peptide that inhibits HIV fusion. *J Biomol NMR* 5: 271-286.
170. Knappe TA, Linne U, Xie X, Marahiel MA (2010) The glucagon receptor antagonist BI-32169 constitutes a new class of lasso peptides. *FEBS Lett* 584: 785-789.
171. Nar H, Schmid A, Puder C, Potterat O (2010) High-resolution crystal structure of a lasso Peptide. *ChemMedChem* 5: 1689-1692.
172. Wilson KA, Kalkum M, Ottesen J, Yuzenkova J, Chait BT, et al. (2003) Structure of microcin J25, a peptide inhibitor of bacterial RNA polymerase, is a lassoed tail. *J Am Chem Soc* 125: 12475-12483.
173. Rosengren KJ, Clark RJ, Daly NL, Goransson U, Jones A, et al. (2003) Microcin J25 has a threaded sidechain-to-backbone ring structure and not a head-to-tail cyclized backbone. *J Am Chem Soc* 125: 12464-12474.
174. Bayro MJ, Mukhopadhyay J, Swapna GV, Huang JY, Ma LC, et al. (2003) Structure of antibacterial peptide microcin J25: a 21-residue lariat protoknot. *J Am Chem Soc* 125: 12382-12383.
175. Knappe TA, Linne U, Zirah S, Rebuffat S, Xie X, et al. (2008) Isolation and structural characterization of capistruin, a lasso peptide predicted from the genome sequence of *Burkholderia thailandensis* E264. *J Am Chem Soc* 130: 11446-11454.
176. Yamasaki M, Yano K, Yoshida M, Matsuda Y, Yamaguchi K (1994) RES-701-1, a novel and selective endothelin type B receptor antagonist produced by *Streptomyces* sp. RE-701. II. Determination of the primary sequence. *J Antibiot (Tokyo)* 47: 276-280.
177. Morishita Y, Chiba S, Tsukuda E, Tanaka T, Ogawa T, et al. (1994) RES-701-1, a novel and selective endothelin type B receptor antagonist produced by *Streptomyces* sp. RE-701. I. Characterization of producing strain, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* 47: 269-275.
178. Iwatsuki M, Tomoda H, Uchida R, Gouda H, Hirono S, et al. (2006) Lariatins, antimycobacterial peptides produced by *Rhodococcus* sp. K01-B0171, have a lasso structure. *J Am Chem Soc* 128: 7486-7491.
179. Esumi Y, Suzuki Y, Itoh Y, Uramoto M, Kimura K, et al. (2002) Propeptin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase produced by *Microbispora* II. Determination of chemical structure. *J Antibiot (Tokyo)* 55: 296-300.
180. Blond A, Cheminant M, Destoumieux-Garzon D, Segalas-Milazzo I, Peduzzi J, et al. (2002) Thermolysin-linearized microcin J25 retains the structured core of the native macrocyclic peptide and displays antimicrobial activity. *Eur J Biochem* 269: 6212-6222.
181. Salomon RA, Farias RN (1992) Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174: 7428-7435.
182. Knappe TA, Linne U, Robbel L, Marahiel MA (2009) Insights into the biosynthesis and stability of the lasso peptide capistruin. *Chem Biol* 16: 1290-1298.
183. Solbiati JO, Ciaccio M, Farias RN, Salomon RA (1996) Genetic analysis of plasmid determinants for microcin J25 production and immunity. *J Bacteriol* 178: 3661-3663.
184. Pan SJ, Rajniak J, Maksimov MO, Link AJ (2012) The role of a conserved threonine residue in the leader peptide of lasso peptide precursors. *Chem Commun (Camb)* 48: 1880-1882.
185. Pavlova O, Mukhopadhyay J, Sineva E, Ebright RH, Severinov K (2008) Systematic structure-activity analysis of microcin J25. *J Biol Chem* 283: 25589-25595.
186. Duquesne S, Destoumieux-Garzon D, Zirah S, Goulard C, Peduzzi J, et al. (2007) Two enzymes catalyze the maturation of a lasso peptide in *Escherichia coli*. *Chem Biol* 14: 793-803.
187. Yan KP, Li Y, Zirah S, Goulard C, Knappe TA, et al. (2012) Dissecting the maturation steps of the lasso peptide microcin J25 in vitro. *Chembiochem* 13: 1046-1052.
188. Inokoshi J, Matsuhama M, Miyake M, Ikeda H, Tomoda H (2012) Molecular cloning of the gene cluster for lariatins biosynthesis of *Rhodococcus jostii* K01-B0171. *Appl Microbiol Biotechnol* 95: 451-460.

189. Wecksler SR, Stoll S, Iavarone AT, Imsand EM, Tran H, et al. (2010) Interaction of PqqE and PqqD in the pyrroloquinoline quinone (PQQ) biosynthetic pathway links PqqD to the radical SAM superfamily. *Chem Commun (Camb)* 46: 7031-7033.
190. Shen YQ, Bonnot F, Imsand EM, RoseFigura JM, Sjolander K, et al. (2012) Distribution and properties of the genes encoding the biosynthesis of the bacterial cofactor, pyrroloquinoline quinone. *Biochemistry* 51: 2265-2275.
191. Wilkinson B, Micklefield J (2007) Mining and engineering natural-product biosynthetic pathways. *Nat Chem Biol* 3: 379-386.
192. Challis GL (2008) Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiology* 154: 1555-1569.
193. Corre C, Challis GL (2009) New natural product biosynthetic chemistry discovered by genome mining. *Nat Prod Rep* 26: 977-986.
194. Velasquez JE, van der Donk WA (2011) Genome mining for ribosomally synthesized natural products. *Curr Opin Chem Biol* 15: 11-21.
195. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, et al. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269: 496-512.
196. Medema MH, Blin K, Cimermancic P, de Jager V, Zakrzewski P, et al. (2011) antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res* 39: W339-346.
197. Blin K, Medema MH, Kazempour D, Fischbach MA, Breitling R, et al. (2013) antiSMASH 2.0--a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucleic Acids Res* 41: W204-212.
198. Giessen TW, Franke KB, Knappe TA, Kraas FI, Bosello M, et al. (2012) Isolation, structure elucidation, and biosynthesis of an unusual hydroxamic acid ester-containing siderophore from *Actinosynnema mirum*. *J Nat Prod* 75: 905-914.
199. Knerr PJ, van der Donk WA (2012) Discovery, biosynthesis, and engineering of lantipeptides. *Annu Rev Biochem* 81: 479-505.
200. Poindexter JS (1964) Biological Properties and Classification of the Caulobacter Group. *Bacteriol Rev* 28: 231-295.
201. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
202. Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, et al. (2010) A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* 38: W695-699.
203. Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, et al. (2009) MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* 37: W202-208.
204. Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523.
205. Hemsley A, Arnheim N, Toney MD, Cortopassi G, Galas DJ (1989) A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 17: 6545-6551.
206. Chiu J, March PE, Lee R, Tillett D (2004) Site-directed, Ligase-Independent Mutagenesis (SLIM): a single-tube methodology approaching 100% efficiency in 4 h. *Nucleic Acids Res* 32: e174.
207. Chiu J, Tillett D, Dawes IW, March PE (2008) Site-directed, Ligase-Independent Mutagenesis (SLIM) for highly efficient mutagenesis of plasmids greater than 8kb. *J Microbiol Methods* 73: 195-198.
208. Rance M, Sorensen OW, Bodenhausen G, Wagner G, Ernst RR, et al. (1983) Improved spectral resolution in cosy 1H NMR spectra of proteins via double quantum filtering. *Biochem Biophys Res Commun* 117: 479-485.
209. Bax A, Davis DG (1985) Mlev-17-Based Two-Dimensional Homonuclear Magnetization Transfer Spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance* 65: 355-360.
210. Jeener J, Meier BH, Bachmann P, Ernst RR (1979) Investigation of Exchange Processes by 2-Dimensional Nmr-Spectroscopy. *Journal of Chemical Physics* 71: 4546-4553.

211. Hwang TL, Shaka AJ (1995) Water Suppression That Works - Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. *Journal of Magnetic Resonance Series A* 112: 275-279.
212. Goddard TD, Kneller DJ (2007) Sparky 3. University of California, San Francisco.
213. Wagner G (1990) Nmr Investigations of Protein-Structure. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 22: 101-139.
214. Herrmann T, Guntert P, Wuthrich K (2002) Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA. *J Mol Biol* 319: 209-227.
215. Maksimov MO, Pelczer I, Link AJ (2012) Precursor-centric genome-mining approach for lasso peptide discovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 15223-15228.
216. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
217. Hegemann JD, Zimmermann M, Zhu S, Klug D, Marahiel MA (2013) Lasso peptides from proteobacteria: Genome mining employing heterologous expression and mass spectrometry. *Biopolymers* 100: 527-542.
218. Dasgupta S, Huang K-W, Wu J (2012) Trifluoromethyl acting as stopper in [2]rotaxane. *Chemical Communications* 48: 4821-4823.
219. Zimmermann M, Hegemann JD, Xie X, Marahiel MA (2013) The astexin-1 lasso peptides: biosynthesis, stability, and structural studies. *Chem Biol* 20: 558-569.
220. Hegemann JD, Zimmermann M, Xie X, Marahiel MA (2013) Caulosegnins I-III: A Highly Diverse Group of Lasso Peptides Derived from a Single Biosynthetic Gene Cluster. *J Am Chem Soc* 135: 210-222.
221. Gonnet GH, Cohen MA, Benner SA (1992) Exhaustive matching of the entire protein sequence database. *Science* 256: 1443-1445.
222. Knappe TA, Manzenrieder F, Mas-Moruno C, Linne U, Sasse F, et al. (2011) Introducing lasso peptides as molecular scaffolds for drug design: engineering of an integrin antagonist. *Angew Chem Int Ed Engl* 50: 8714-8717.
223. Xie X, Marahiel MA (2012) NMR as an effective tool for the structure determination of lasso peptides. *Chembiochem* 13: 621-625.
224. Cheung WL, Pan SJ, Link AJ (2010) Much of the microcin J25 leader peptide is dispensable. *J Am Chem Soc* 132: 2514-2515.
225. Yang X, van der Donk WA (2013) Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: new insights into the role of leader and core peptides during biosynthesis. *Chemistry* 19: 7662-7677.
226. Maksimov MO, Link AJ (2013) Discovery and characterization of an isopeptidase that linearizes lasso peptides. *J Am Chem Soc* 135: 12038-12047.
227. Noinaj N, Guillier M, Barnard TJ, Buchanan SK (2010) TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu Rev Microbiol* 64: 43-60.
228. Ma P, Nishiguchi K, Yuille HM, Davis LM, Nakayama J, et al. (2011) Anti-HIV siamycin I directly inhibits autophosphorylation activity of the bacterial FsrC quorum sensor and other ATP-dependent enzyme activities. *FEBS Lett* 585: 2660-2664.
229. Nakayama J, Tanaka E, Kariyama R, Nagata K, Nishiguchi K, et al. (2007) Siamycin attenuates fsr quorum sensing mediated by a gelatinase biosynthesis-activating pheromone in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 189: 1358-1365.

8. Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel für die Vergabe dieser Doktorarbeit in diesem interessanten Themengebiet sowie die freundliche und kompetente Betreuung während meiner Diplom- und Doktorarbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Armin Geyer gilt mein Dank für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens sowie die Teilnahme an meiner Prüfungskommission bei meiner Disputation.

Herrn Prof. Dr. Norbert Hampp danke ich ebenso für die Teilnahme an meiner Prüfungskommission bei meiner Disputation.

Besonderer Dank gilt allen meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen auf dem Themengebiet der Lassoptide: Michael J. Gattner, Julian D. Hegemann, Dr. Thomas A. Knappe, Anastasja Krikovtseva, Nora Reinhardt und Shaozhou Zhu. Die „Lassogang“ stand sich immer gegenseitig unterstützend zur Seite und hat an einem Strang gezogen. Ohne dieses Teamwork wäre vieles nicht möglich gewesen.

Bei Julian D. Hegemann und Tobias Gießen möchte ich mich außerdem für das Korrekturlesen meiner Veröffentlichung sowie der Doktorarbeit bedanken.

Für die Strukturaufklärung meiner Lassoptide mittels NMR-Spektroskopie und die fruchtbaren Diskussionen möchte ich mich herzlichst bei Frau Dr. Xiulan Xie und der NMR-Abteilung bedanken.

Bei Dr. Uwe Linne und der Massenabteilung (Dr. Steinbach, Jan Bamberger, Natalia Fritzer) bedanke ich mich für die Unterstützung in allen Fragen der massenspektrometrischen Analytik und bei Problemen mit HPLC und MS.

Unseren Laborantinnen, Technischen Assistentinnen und Auszubildenden Antje Schaefer, Gabi Schimpff-Weiland, Christiane Bomm und Kristin Ried danke ich für die Übernahme aller grundlegenden Arbeiten und die Unterstützung bei der Konstruktion der vielen Mutanten.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitgliedern des AK Marahiel für die angeregten Diskussionen, die großartige Arbeitsatmosphäre und für alle Aktivitäten abseits des Labors bedanken. Ich habe die Zeit mit euch allen sehr genossen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, Andrea Zimmer und Andreas Zimmermann, sowie bei Michael Seifert und Peter Zimmer bedanken. Ohne deren familiäre und finanzielle Unterstützung während meines gesamten Studiums hätte ich dieses Ziel nie erreichen können.

Der größte Dank gilt meiner Freundin Yi, die mich immer unterstützt und ermutigt und nie an mir gezweifelt hat.

9. Anhang

Anhang Tabelle 1 – Vorläuferpeptidsequenzen der potentiellen Lasso-peptidbiosynthesegencluster aus dem PSI-BLAST *Genome Mining*. Konserviertes Thr-2 blau, konserviertes Gly1 und makrolactambildende Seitenketten (Asp/Glu) rot hervorgehoben.

Produzentenstamm	Vorläuferpeptid			
<i>Asticcacaulis excentricus</i> CB48 (2228)	MHTPIISETVQPKTAGLIVLGKASAE TR	GLSQGV EP DIGQTYFEESRINQD	51	23 9
<i>Asticcacaulis excentricus</i> CB48 (2448)	MRTYNRSLPARAGLTDLGKVT HTK	GPTPMVGLD SV SGQYWDQHAPLAD	49	24 9
<i>Asticcacaulis excentricus</i> CB48 (2447)	MTKR TT IAARRVGLIDLGKAT RQTK	GLTQIQALD SV SGQFRDQLGLSAD	49	24 9
<i>Breviundimonas diminuta</i> ATCC 11568	MMNTFKLRLV SF SGAKAL TRD	GMGEEFI- E GLVRDSL Y PPAG	41	20 8
<i>Burkholderia gladioli</i> BSR3	MSAI IK KLFRNRAS QA HRFDV VS V TH	GQPGYQ TID FRVV TR L G GR	46	19 9
<i>Burkholderia mallei</i> ATCC 23344	MVRFLAKLLRSTIHGSNGVSLDAV SSTH	GTPGFQ TPD ARVISR F GFN	47	19 9
<i>Burkholderia oklahomensis</i> C6786	MVRFLAKLLRSTIHGSNGVSLDAV SSTH	GTPGFQ TPD ARVISR F GFN	47	19 9
<i>Burkholderia oklahomensis</i> EO147	MVRFLAKLLRSTIHGSNGVSLDAV SSTH	GTPGFQ TPD ARVISR F GFN	47	19 9
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106A	MVRFLAKLLRSTIHGSNGVSLDAV SSTH	GTPGFQ TPD ARVISR F GFN	47	19 9
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1710b	MVRFLAKLLRSTIHGSNGVSLDAV SSTH	GTPGFQ TPD ARVISR F GFN	47	19 9
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 668	MVRFLAKLLRSTIHGSNGVSLDAV SSTH	GTPGFQ TPD ARVISR F GFN	47	19 9
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 7894	MVRFLAKLLRSTIHGSNGVSLDAV SSTH	GTPGFQ TPD ARVISR F GFN	47	19 9
<i>Burkholderia pseudomallei</i> DM98	MVRFLAKLLRSTIHGSNGVSLDAV SSTH	GTPGFQ TPD ARVISR F GFN	47	19 9
<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243	MVRFLAKLLRSTIHGSNGVSLDAV SSTH	GTPGFQ TPD ARVISR F GFN	47	19 9
<i>Burkholderia rhizoxinica</i> HK1454	MNKQQ Q ESGLLAEESLMELCAS SETL	GGAGQY K-E VEAGR W SDR IDS DEE	50	23 8
<i>Burkholderia thailandensis</i> E264	MVRLAKLLRSTIHGSNGVSLDAV SSTH	GTPGFQ TPD ARVISR F GFN	47	19 9
<i>Candidatus odysseella thessalonicensis</i> L13(8821)	MKYLKKSIMVKSFFNKLDKNEHAGLINISQAS TI A	GGCGAK F-E QGGV T SLQKFDA	57	20 8
<i>Candidatus odysseella thessalonicensis</i> L13(8986)	MENIEITTKTSTVLDTNLVVLEESAS SLTQ	GCCGG W L- E Q W GGYSRP	47	16 8
<i>Candidatus odysseella thessalonicensis</i> L13(8991)	MENIEITTEISAILDNLGVVLEESAS SLTR	GLVGT GK-E GFVCV F FRY	47	16 8
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	MTPTTPRPTLLRLGA AKT L TR	SLEDGT IK EAGSSQ Y YFV	39	18 9
<i>Caulobacter segnis</i> ATCC 21756 (2568)	MTKKNATQAPRLVRVGD AHRLTQ	GAFV GQ P- E AVN PL GREIQG	42	19 8
<i>Caulobacter segnis</i> ATCC 21756 (2567)	MTK THR LIRLGDA QRLTQ	G TL TP GL PE DF LP GH YMPG	37	19 8
<i>Caulobacter segnis</i> ATCC 21756 (2566)	MTSR FQ LLRLGKAD RLTR	GALV GL LE ED ITVARY D PM	37	19 8
<i>Caulobacter</i> sp. AP07 (619)	MERTEHRIDDLIELGAAS VE T K	GADL P T S-E VGIGR Q PAGIT E D	43	21 8
<i>Caulobacter</i> sp. AP07 (620)	MSKETAMRQVENQTEELVELGRAS DE T Q	G P DM P T S-E VGIGR A PF G IT E D	49	21 8
<i>Caulobacter</i> sp. K31 (2238)	MNTLK TR LIRFG SAK L TR	AGT G V LL PE TN QIKRY D PA	38	19 9
<i>Caulobacter</i> sp. K31 (2239)	MTTP K FRLIRLGS AK L TR	SGIG D V F PE PN MV R RWD	36	17 9
<i>Caulobacter</i> sp. K31 (1984)	MTPIQSKFCLLRVGS AK L TR	SFDV G T IK EGLV S Q Y YFA	39	18 9
<i>Caulobacter</i> sp. K31 (198x)	MTQVSPSLR L IRVGRALD LTR	SIGD S GL R E S MS S Q T Y W P	40	18 9
<i>Caulobacter</i> sp. K31 (5194)	MERIEDHIDDELIDLGAAS VE T Q	G D VL N A P-E PGIGR E PT G LSR D	44	21 8
<i>Caulobacter</i> sp. K31 (5193)	MQR I ID E TTDGLIELGAAS VE T Q	G D VL F A P-E PGVGR P PM G L S E D	44	21 8
<i>Caulobacter</i> sp. K31 (519x)	MEFEGIPSPDARIDLGLAS E T C	G Q I Y D H P- E VGIG A Y C E G L Q R	44	21 8
<i>Chitinophaga pinensis</i> DSM 2588 (4903)	MKNETTQ Q KT T W E TPDM T VL P IND VTL	G A G A AG T-D F A SE I SV	42	15 8
<i>Chitinophaga pinensis</i> DSM 2588 (4902)	MKN N TS Q Q PL T W ET P DM I VL P ID KVTL	G K AG S GS- D FA A E W EV S T	44	17 8
<i>Citromicrobium bathyomarineum</i>	MKEFDHNQNEVIDLGKAS VE T K	G A V G F Y I- D AS G Q L AN S P G LL D E	45	23 8
<i>Citromicrobium</i> sp. JLT1363	MNQ P H E T L P T NAGK R AW S T P Q V VD L DRRA I A	G G AV N A P-E Y F A P T F Y S V S	50	18 8
<i>Desulfobacca acetoxidans</i> DSM 11109	MMIC F PA V TR Y LA I V L SLRR K AS E L TW K	Q T PC R W T-D S R PS G T V P	44	16 8
<i>Escherichia coli</i> AY25 (Microcin J25)	MIKH F FN L SS G KK N VP S PA K GV I Q I KK S AS QLT K	G G AG H V P-E Y F V G I G T P I S F Y G	58	21 8
<i>Erythrobacter</i> sp. NAP1	MTKVTEK V K Y EAP K L T V F GS V R N L TG	G S GS T S F R- D GA V T N T R F	43	16 8
<i>Geobacter uraniireducens</i> Rf4	MDRDKQ S CP D SS V IS G ES V AAS T RS A WS A PT I T R I E IK R T MA	G A S V A L--D SS L F T TH	56	14 7
<i>Haliangium ochraceum</i> DSM 14365	MAKK K T D T K K T F L Q D L G K A T E E T K	SD G PP E RY D N L V F R T K G P Y L G	45	21 9
<i>Legionella pneumophila</i> 2300/99 Alcoy	MDKLD W EL P EV C A I P I D S V T AD QD	G N L K S D GP D SS G L S SS S SS S SS G	46	22 9
<i>Legionella pneumophila</i> str. Corby	MDKLD W EL P EV C A I P I D S V T AD QY	G N K K ND G P D SS G L S SS S SS S PS G	45	21 9
<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1	MSDQ S PP A T E D A P A R K P W H K PE I T L A V E E T	A T NG S T G ND G SG A T T F S	48	17 9

Produzentenstamm	Vorläuferpeptid			
Marine gamma proteobacterium	MSGEQSVSRREENPQISISAGSGRKYKTPRLERFGEISHV TQ	GSFGKKK-DAEGDEVAIIPK	61	19 8
<i>Marinomonas mediterranea</i> MBP1	MSDIDVNTLLSEDKNSKSLGDKLIWVAPVLEELETDK TRS	GGGTAT--ETPFNPVGS	57	16 7
<i>Mesorhizobium amorphae</i> CCNWS0123	MEQNVEKHEYETPSLTVHGS IETITQ	GGGGSTALDASFFAHTPIGELTFS	50	24 9
<i>Mesorhizobium australicum</i> WSM2073	MEQNVEKHEYETPNLTVHGS IETITQ	GGGGSTALDASFFAHTPIGDLTFS	50	24 9
<i>Mesorhizobium ciceri</i> biovar <i>biserrulae</i>	MEQNVEKHEYETPSLTVHGS IETITQ	GGGGSTALDASFFAHTPIGDLTFS	50	24 9
<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	MEQNVEKHEYETPSLTVHGS IETITQ	GGGGSTALDASFFAHTPIGDLTFS	50	24 9
<i>Mesorhizobium opportunistum</i> WSM2075	MEQNVEKHEYETPSLTVHGS IETITQ	GGGGSTALDASFFAHTPIGDLTFS	50	24 9
<i>Novosphingobium</i> sp. AP12	MKEREHNESDVIELGIAH IETR	GNALFGRDDTQTMKYGVAGISSED	47	25 8/9
<i>Novosphingobium</i> sp. PPIY (Lpi3xx)	MESRSRMEKIMEKTIDTLEDKVVDLG SVTEET R	GIVGAL-EDQGGQRAALGLTDD	55	22 7/8
<i>Novosphingobium</i> sp. PPIY (AT163xx)	MKEVIMTVIDEHRDELIDLGA VSAATK	GAVQGEA-DLEGQPRQIFGAISDD	51	21 8
<i>Novosphingobium</i> sp. Rr 2-17	MDRLHDIIDLGAAS VET K	GPIGEGS-DLVLGQNPAGLSDD	39	19 8
<i>Oligotropha carboxidovorans</i> OM5	MQRVAGREGIHAVTRTRDAMKATARD PTI	GPLLIEH-EFENVRDGGRRGGDNQEMFGGRL	59	30 8
<i>Phenylobacterium zucineum</i> HLK1 (217x)	MNTRLHPPVSRILC LGGAKASTN	QGVGIRQ-ELNPDEGFDD	40	17 8
<i>Phenylobacterium zucineum</i> HLK1 (239x)	MTRLLNLMVSRLLG FGSAKAATN	GGIGGFEDLNKPFDD	39	16 8/9
<i>Pseudomonas geniculata</i> N1	MFMNELIELGVVAGEQN HEDQSELIELGSVSETK	AHNHGTLWDGVFPTTSP	52	17 9
<i>Rhodanobacter</i> sp. 115	MTQTQEIIVMNTNENIR NSASEDVIVLGVASVETK	GGPGSN--EAVFGGPPVIGISEE	56	22 7
<i>Rhodanobacter</i> sp. 116-2	MTRPQETEMNTNENIR NDTPEDVIVLGVASVETK	GPMGSTEPGGLRPPVIGISEE	57	23 7/9
<i>Rhodanobacter</i> sp. 2APBS1	MNTNENIRTNAPED VIELGIASVETK	GEFGVT--EGGGQKPMPIGISEE	48	22 7
<i>Rhodanobacter thiooxydans</i> LCS2	MTQSQETEMNTNENIR SNAQDDVIELSVASVETK	GVLPIGN-EFMGHAATPGITE	54	20 8
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	MANNIQTLAYEAPVLRV HGTLEAMTH	GATDGWALDASFPVDTPKGDLTFS	50	24 9
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17025	MLRIFDVANNIQT LAYQAPVLRAHGTLEAMTH	GASTGHVTDAAFPSTAIADMTFS	56	24 9
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17029	MANNIQTLAYEAPVLRV HGTLEAMTH	GATDGWALDASFPVDTPKGDLTFS	50	24 9
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> KD131	MLRVHGTLEAM T H	GATDGWALDASFPVDTPKGDLTFS	37	24 9
<i>Roseobacter denitrificans</i> Och 114	MTKAVYEAAPVLR SHGKVEAVTK	GGSTGSSLDAAFPAGTFFDLTLS	46	24 9
<i>Roseobacter litoralis</i> Och 149	MTKAVYEAAPVLR SHGKVEAVTK	GGSTGSSLDAAFPAGTFFDLTLS	46	24 9
<i>Rubrivivax benzoalyticus</i>	MDEETELDIVDLG DAKDTTK	GILLPGSEDNVMPGRQIA	39	19 8/9
<i>Rubrivivax gelatinosus</i> IL144	MKEFAMDEELELEIVDLG DAKELTK	GAPSLINSEDNPAFPQRV	43	18 9
<i>Shewanella</i> sp. HN-41	MQQDNMNKSG LAVEQTVKAAWSKPEIEEINIAGYTE	GKATGTN-ESFLSAPS	51	15 8
<i>Sphingobium chlorophenolicum</i> L-1	MHIPYVKS GREPGRPLVKLKARHQTR	ASMNEIAPELVGDKTQRFGG	47	20 9
<i>Sphingobium japonicum</i> UT26 (C1-3001x)	MERDNDVIELGAV SVETK	GPGGITG-DVGLGENNFGLSDD	39	21 8
<i>Sphingobium japonicum</i> UT26 (P1-00960)	MDRHDNSEVDEIIDLGTASAV TK	GMSGST-DQNGQPKNLIGGISDD	46	23 8
<i>Sphingobium</i> sp. AP49	MERDAHSQDIVDLG DAVELTR	GVLIGQDDGNGTLYKASGISDED	44	24 8/9
<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6	MNHEHETDDLIELGN ASTDTK	GGAFIVE-DNEGSLSLQTLTDD	43	22 8
<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230 (4094)	MEREEEIMRIDLGA ATEQTK	GPGGIDGDEFLOQDRVGLADD	41	21 8/9
<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230 (4584)	MEKESYESP <small>ELV</small> ELG SFESLTK	GTSYGESLDATFPDGTFRGELTFS	46	24 9
<i>Sphingobium yanoikuyae</i> XLDN2-5 (284x)	MERNSEDRDDV VELGAVSVETK	GISGGTV-DAPAGQGLAGILDD	44	21 8
<i>Sphingobium yanoikuyae</i> XLDN2-5 (616x)	MEREYEATDDG VVELGVGSELTN	GVGRGGI-DSPDRQPLTGLLDD	44	21 8
<i>Sphingobium yanoikuyae</i> XLDN2-5 (3348)	MEKESYESP <small>ELV</small> ELG SFESLTK	GTSYGESLDATFPDGTFRGELTFS	46	24 9
<i>Sphingomonas</i> sp. LH128	MSQQRNVMEHVEEDTM VELGAVSETK	GGQVGIN-DFERGLQLTGSGLTDD	51	23 8
<i>Sphingomonas</i> sp. SKA58	MEMKMNNINEHED SVDLGVASVETK	GAALDDS-DNIGGQVRQLGIADD	48	22 8
<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256 (253x)	MKDFNELIDLGAIS VETR	GIEPLGPVDEDDQGEHYLFAGGITADD	44	26 9
<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256 (260x)	MERTEVIEEVIDL GKASVETK	GEALIDQ-DVGGGRQQLTGIAQD	44	23 8
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	MNELIELGVVAGQ QNPEDQVGGELIELGSVSETK	AHNHGTLWDGVFPTTSP	53	17 9
<i>Sulfurovum</i> sp. AR	MRVRMKNF S IKKYN K PEIKNLGKIG T K T QY N K S TAGAD GTS	STHYNKGQDTGFGGAGTVTP	62	20 9
<i>Sulfurovum</i> sp. NBC37-1	MIEKNH S DFSG E TERQ K KPY S PK I E I ANVR MATK	GSTIGGT-DSGGQSANVSPDPGGW	59	23 8
Uncultured marine bacterium	MSGEQSVSRREENPQISISAGSGRKYKTPRLERFGEISHV TQ	GSFGKKK-DAEGDEVAIIPK	61	19 8
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str. 306	MHENQPAVLS D TSIEGGRKAW SAPVVSFLSIDETA	SNATVG-DDGNGTFTGS	51	16 7/8
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvercearum</i> str. GSPB1386	MHENQPAVLS D TSIEGGRKAW SAPVVSFLSIDETA	NNATVG-DDGNGTFTGS	51	16 7/8
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvercearum</i> str. GSPB2388	MHENQPAVLS D TSIEGGRKAW SAPVVSFLSIDETA	NNATVG-DDGNGTFTGS	51	16 7/8

Produzentenstamm	Vorläuferpeptid			
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>punicae</i> str. LMG 859	MHENQPAVLSDTSIEGGRKAWSAPVVSFLSIDE TA	SNATVG- DD GNGTFTGS	51	16 7/8
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> (260x)	MKTFVDSAPSQEDHGKDIIVLGIASVE TQ	GGAGAG--E VNGMSPiAGISEE	49	20 7
<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> (18x)	MHENQPAVLSDTSIEGGRKAWSAPVVSFLSIDE TA	SNATVG- DD GNGTFTGS	51	16 7/8
<i>Xanthomonas gardneri</i> ATCC 19865 (4058)	MNSNDTTHSDASNEITVLGVASTD TK	GGPLAG-EE IGGFNVPGISEE	46	20 7/8
<i>Xanthomonas gardneri</i> ATCC 19865 (4059)	MDTSNNDARTTALDQDLIVLGVASLD TQ	GGPLAG-EE MGGITTLGISQD	48	20 7/8

Anhang Tabelle 2 – Zuordnung der ^1H Signale (ppm) von Astexin-1(23) in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) bei 288 K

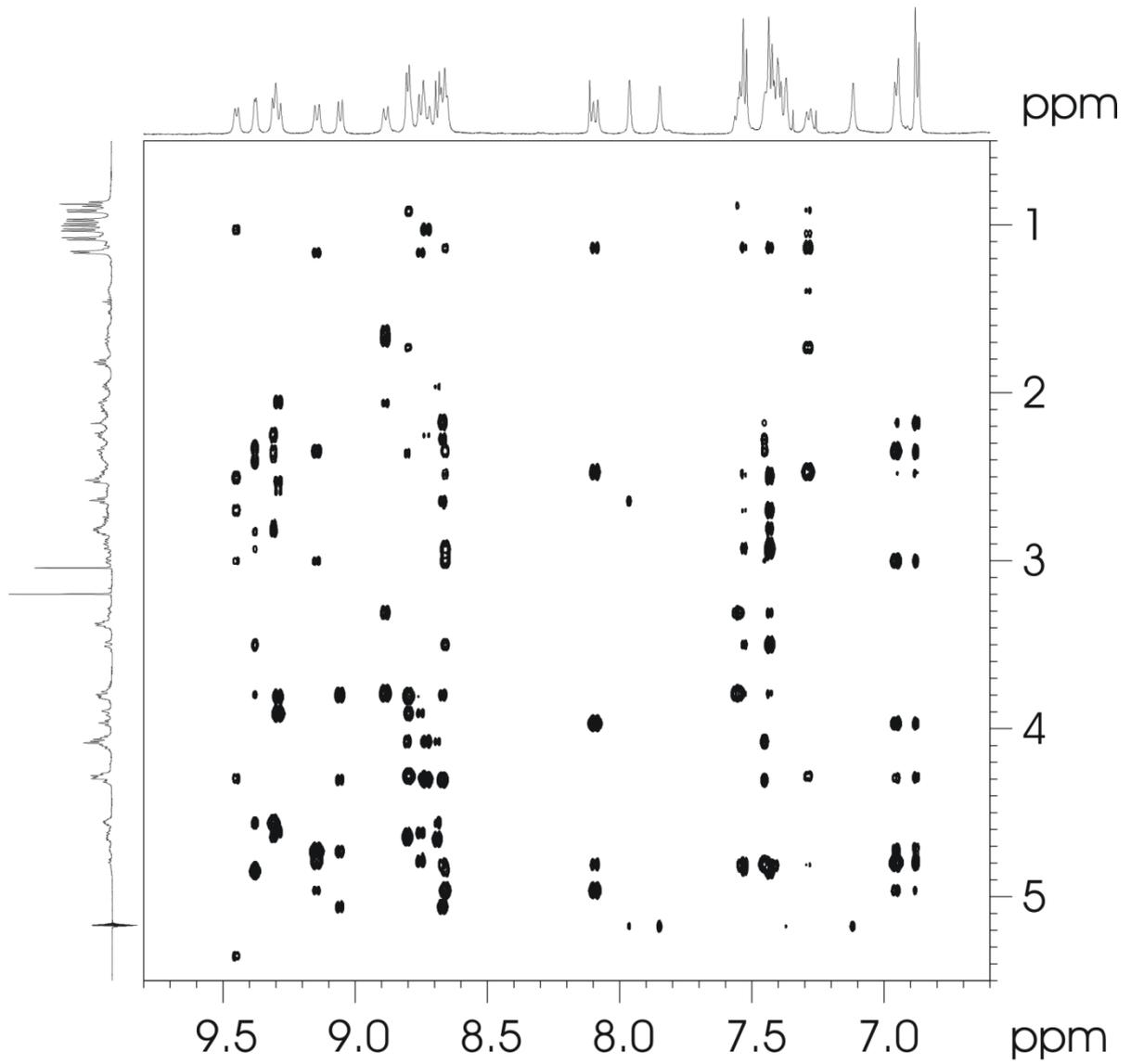
aa	NH	αH	βH	andere
Gly1	7,531	3,789; 3,307	/	/
Leu2	8,835	5,174	2,082; 1,684	γCH : 1,637 δCH_3 : 1,090; 0,980
Ser3	9,033	5,074	4,292; 3,811	
Gln4	8,670	4,809	2,283; 2,184	γCH_2 : 2,642 ϵNH_2 : 7,920; 7,323
Gly5	7,434	4,327; 4,077	/	/
Val6	8,704	4,297	2,262	γCH_3 : 1,036; 1,009
Glu7	9,386	5,355	2,694; 2,493	γCH_2 : 2,889; 2,816
Pro8	/	3,974	2,478; 2,083	γCH_2 : 2,396; 2,183 δCH_2 : 4,115; 4,697
Asp9	8,082	4,808	2,489; 1,146	/
Ile10	7,268	4,285	1,736	γCH_2 : 1,408; 1,044 γCH_3 : 0,924; δCH_3 : 0,886
Gly11	8,762	3,930; 3,813	/	/
Gln12	9,233	4,626	2,060	γCH_2 : 2,589; 2,527 ϵNH_2 : 7,809; 7,085
Thr13	8,728	4,794	4,730	γCH_3 : 1,174
Tyr14	9,109	4,965	3,000; 2,352	δCH : 6,957; ϵCH : 6,884
Phe15	8,661	4,848	3,494; 2,930	δCH : 7,433; ϵCH : 7,536
Glu16	9,345	4,567	2,399; 2,339	γCH_2 : 2,824
Glu17	9,246	4,627	2,352; 2,250	γCH_2 : 2,779; 2,744
Ser18	8,762	4,641	4,062	/
Arg19	8,692	4,582	1,947	γCH_2 : 2,069; 1,809; δCH_2 : 3,383; ϵNH : 7,386
Ile20	8,409	4,328	2,029	γCH_2 : 1,626; 1,364 γCH_3 : 1,077; δCH_3 : 1,046
Asn21	8,776	4,873	3,040; 2,930	δNH_2 : 7,854; 7,134
Gln22	8,605	4,538	2,331; 2,156	γCH_2 : 2,544 ϵNH_2 : 7,766; 7,105
Asp23	8,620	4,867	3,135; 3,084	/

Anhang Tabelle 3 – Zuordnung der ^1H Signale (ppm) von Astexin-1 (19) in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) bei 283 K

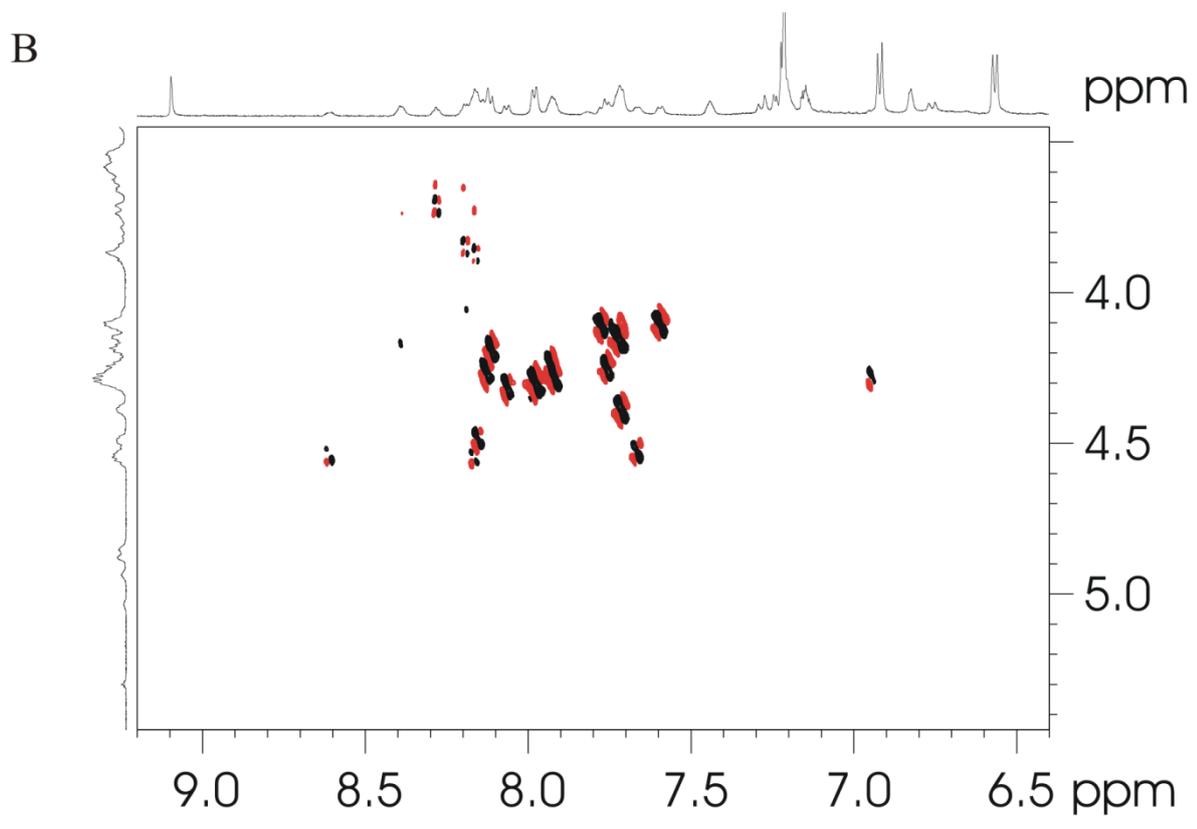
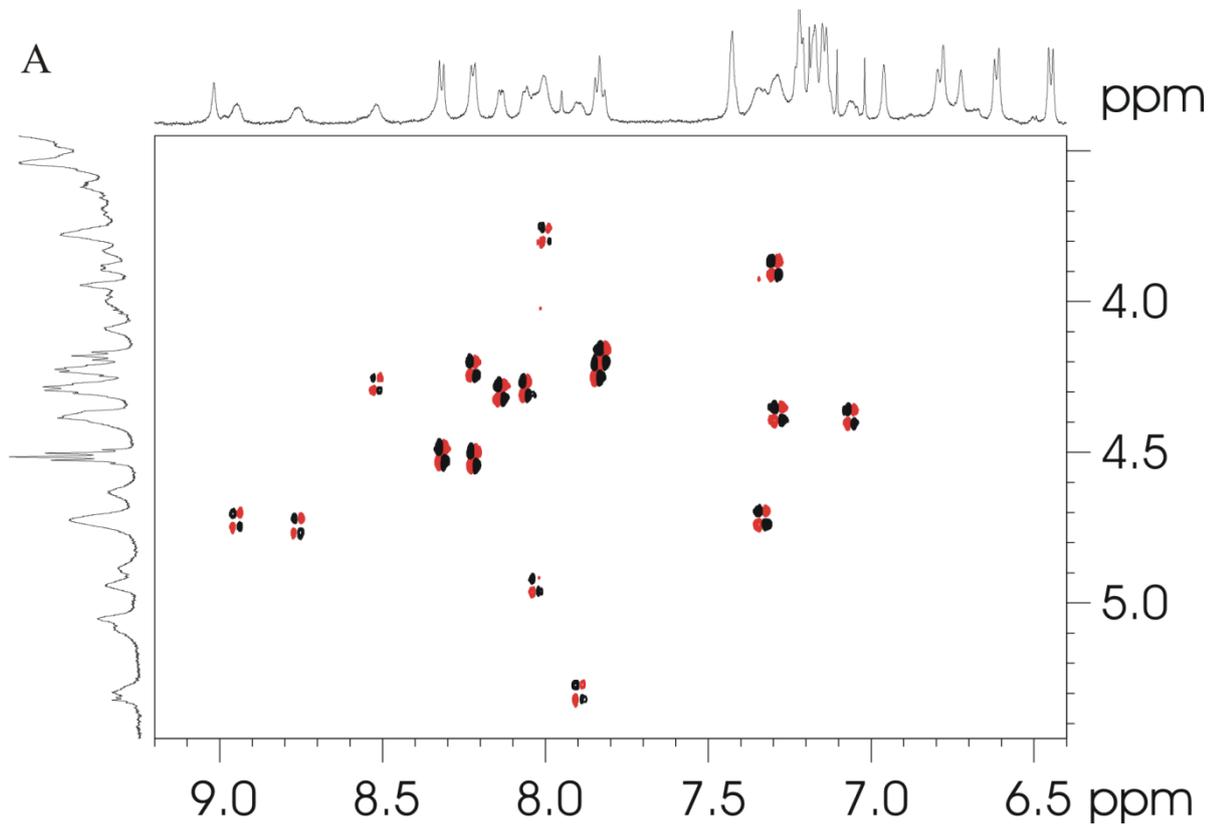
aa	NH	αH	βH	andere
Gly1	7,555	3,786; 3,308	/	/
Leu2	8,885	5,177	2,059; 1,683	γCH : 1,637 δCH_3 : 1,083; 0,970
Ser3	9,059	5,060	4,307; 3,801	/
Gln4	8,670	4,804	2,270; 2,174	γCH_2 : 2,641 ϵNH_2 : 7,963; 7,370
Gly5	7,452	4,307; 4,074	/	/
Val6	8,731	4,284	2,254	γCH_3 : 1,031; 0,999
Glu7	9,449	5,352	2,698; 2,501	γCH_2 : 2,892; 2,807
Pro8	/	3,967	2,476; 2,081	γCH_2 : 2,389; 2,179 δCH_2 : 4,109; 4,705
Asp9	8,094	4,803	2,470; 1,132	/
Ile10	7,286	4,281	1,729	γCH_2 : 1,388; 1,045 γCH_3 : 0,924; δCH_3 : 0,877
Gly11	8,799	3,907; 3,804	/	/
Gln12	9,290	4,618	2,053	γCH_2 : 2,593; 2,523 ϵNH_2 : 7,849; 7,117
Thr13	8,753	4,800	4,752	γCH_3 : 1,161
Tyr14	9,147	4,959	3,000; 2,345	δCH : 6,953; ϵCH : 6,874
Phe15	8,660	4,843	3,500; 2,930	δCH : 7,430; ϵCH : 7,527
Glu16	9,379	4,561	2,407; 2,330	γCH_2 : 2,828
Glu17	9,308	4,64	2,360; 2,248	γCH_2 : 2,797; 2,751
Ser18	8,803	4,659	4,077	/
Arg19	8,689	4,556	1,961	γCH_2 : 2,113; 1,822; δCH_2 : 3,380; ϵNH : 7,400

Anhang Tabelle 4 – Zuordnung der ^1H Signale (ppm) von Caulonodin V in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) bei 298 K

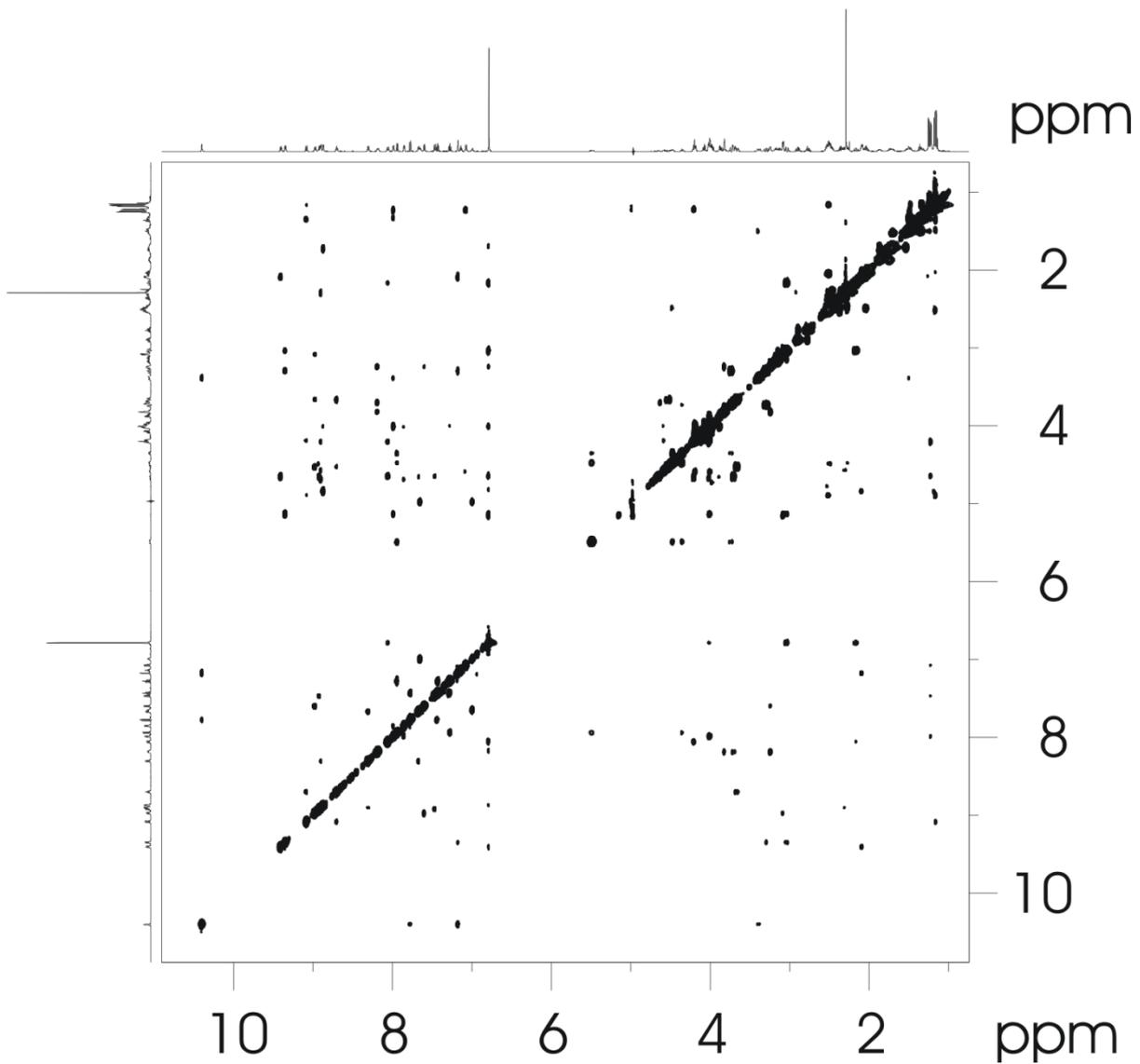
aa	NH	αH	βH	others
Ser1	7,075	4,560	4,190; 3,995	/
Ile2	9,084	4,891	2,509	γCH_3 : 1,159 γCH_2 : 1,478; 1,342 δCH_3 : 1,151
Gly3	8,702	4,528; 3,664	/	/
Asp4	8,973	5,155	3,082	/
Ser5	7,600	3,240	3,821	/
Gly6	8,185	4,651; 3,701	/	/
Leu7	9,406	4,841	2,089	γCH : 2,044 δCH_3 : 1,244; 1,172
Arg8	8,872	4,007	1,863; 1,737	γCH_2 : 1,700; 1,513 δCH_2 : 3,170; 3,132 ϵNH : 7,140
Glu9	7,989	3,386	1,485; 1,327	γCH_2 : 1,225
Ser10	7,854	4,691	4,200; 4,008	/
Met11	8,900	4,574	2,304	γCH_2 : 2,894; 2,763 ϵCH_3 : 2,290
Ser12	8,305	4,730	4,078; 3,969	/
Ser13	7,671	4,653	4,013; 3,871	/
Gln14	8,921	4,488	2,039	γCH_2 : 2,494 ϵNH_2 : 7,649; 6,992
Thr15	7,468	4,643	4,204	γCH_3 : 1,221
Tyr16	8,058	5,136	3,033; 2,165	2, 6H: 6,787 3, 5H: 6,787
Trp17	9,350	5,488	3,731; 3,293	2H: 7,176; 4H: 7,941 5H: 7,278; 6H: 7,434 7H: 7,779; NH: 10,401
Pro18	/	4,774	2,516; 2,355	γCH_2 : 2,267; 2,468 δCH_2 : 4,483; 4,351



Anhang Abbildung 1 – Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum (Mischzeit 300 ms) von Astexin-1(19) in H₂O/D₂O bei 283 K.

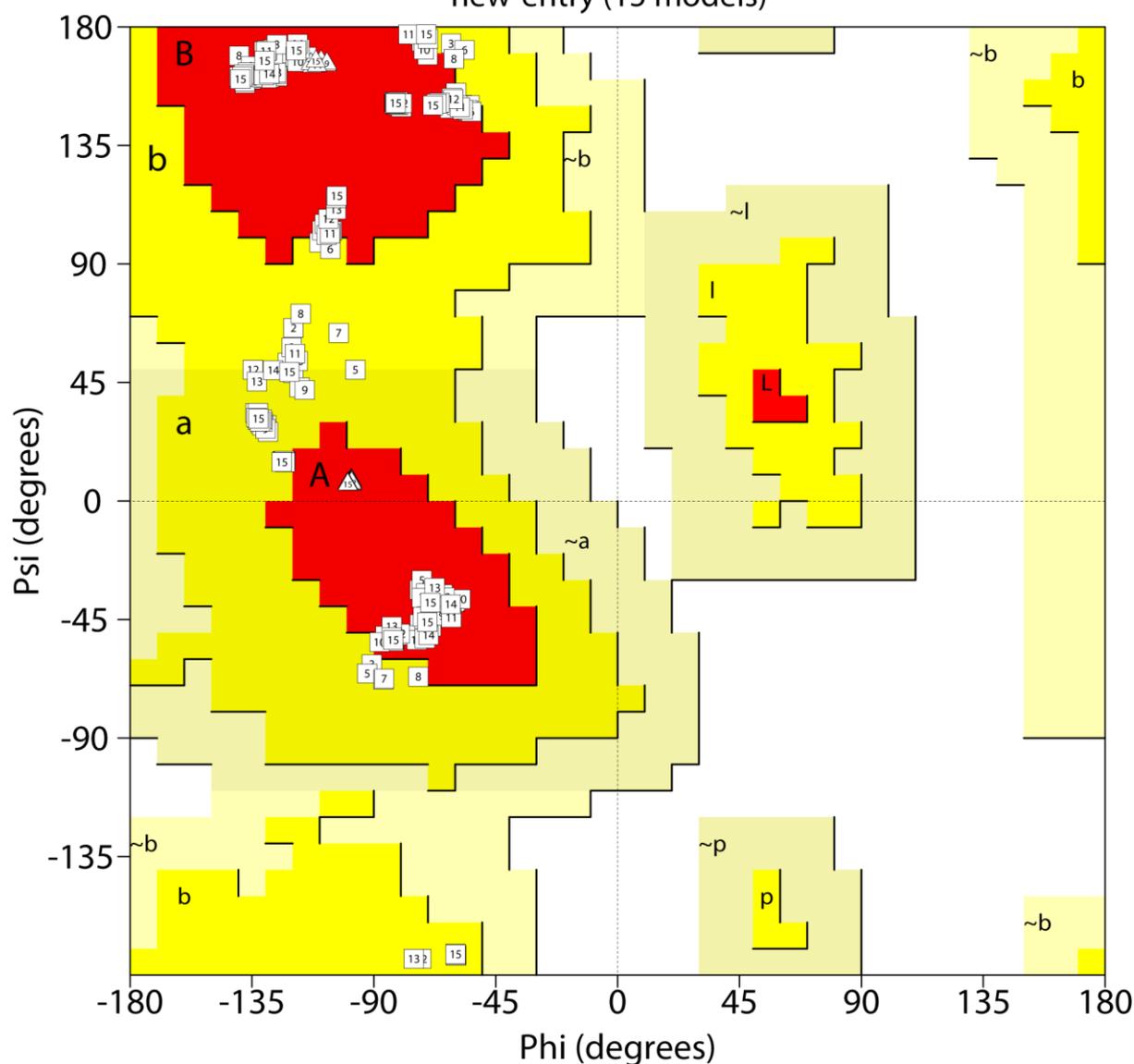


Anhang Abbildung 2 – Ausschnitt aus dem DQF-COSY Spektrum von **A** Astexin-1(23) Lassopeptid und **B** entfädeltem Astexin-1(19) in DMSO-d₆ bei 295 K.



Anhang Abbildung 3 – Ausschnitt aus dem NOESY-Spektrum (Mischzeit 300 ms) von Caulonodin V in H₂O/D₂O bei 298 K.

Ramachandran Plot new-entry (15 models)



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	132	62.9%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	78	37.1%
Residues in generously allowed regions [~a,~b,~l,~p]	0	0.0%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	210	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	15	
Number of glycine residues (shown as triangles)	30	
Number of proline residues	15	

Total number of residues	270	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.
Model numbers shown inside each data point.

Anhang Abbildung 4 – Ramachandranplot der 15 Niedrigenergiestrukturen von Caulonodin V mit PROCHECK NMR erzeugt.