

**Strukturelle und biochemische Charakterisierung
der Biosynthese des Klasse IV-Lanthipeptids
Curvocidin**

vorgelegt von

M. Sc.

Simon Alexander Düttmann

an der Fakultät II – Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Berlin

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Reinhard Schomäcker

Gutachter: Prof. Dr. Roderich D. Süssmuth

Gutachterin: Prof. Dr. Elke Dittmann

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 14. Oktober 2022

Berlin 2023

Zusammenfassung

Lanthipeptide sind ribosomal exprimierte und posttranslational modifizierte Peptide (RIPPs), deren verbindendes Strukturmotiv spezielle intramolekulare Thioetherbrücken darstellen, die (Methyl-)Lanthionin und (Methyl-)Labionin genannt werden. Abhängig von Aufbau und Struktur der Synthetasen werden Lanthipeptide in vier Klassen eingeteilt. Während die mono- und bifunktionalen Synthetasen der Klassen I und II weitestgehend charakterisiert sind, ist über Struktur und Mechanismus der trifunktionalen Synthetasen der Klassen III und IV bisher kaum etwas bekannt.

Curvocidin ist ein neuartiges Klasse IV-Lanthipeptid, das von dem extremophilen Bakterium *Thermomonospora curvata* gebildet wird. Es ist mit einer Länge von 21 Aminosäuren und drei Methyl-Lanthioninbrücken ein relativ kleines Lanthipeptid mit einer verhältnismäßig geringen Zahl an posttranslationalen Modifikationen. Auch das Gencluster ist mit nur fünf Genen relativ klein. Aus diesen Gründen eignet sich das System Curvocidin hervorragend als Modell für die intensive Untersuchung der trifunktionalen Synthetasen der Klasse III und IV.

Durch Klonierung und Aufreinigung der rekombinanten Curvocidin-Synthetase und deren Substrat, dem rekombinanten Curvocidin Vorläufer-Peptid, konnte die Funktion des Enzyms *in vitro* analysiert werden. Ausgehend von den Ergebnissen wurde ein Modell erstellt, das den iterativen Syntheseprozess der drei Methyl-Lanthioninbrücken abbildet. Darüber hinaus konnten spezifische Aminosäuren in der Synthetase-Primärstruktur identifiziert werden, die eine essentielle Rolle bei der Katalyse einnehmen.

Für ein eingehendes Verständnis der Enzymfunktion ist ein detailliertes Strukturmodell erforderlich. Bisher ist keine Struktur einer trifunktionalen Lanthionin-Synthetase bekannt. Durch umfangreiche Optimierungen konnten große Mengen an hochreiner Curvocidin-Synthetase aufgereinigt werden. Damit wurden durch Hochdurchsatz-Testierungs-Methoden (*screening*) die besten Bedingungen für eine Kristallisation des Enzyms ermittelt. Mithilfe der Röntgen-Proteinkristallographie konnte das erste Strukturmodell einer trifunktionalen Lanthionin-Synthetase erstellt werden. Trotz Cokristallisation sind Substrat, Cofaktoren und Mg^{2+} - wie auch Zn^{2+} -Ionen nicht in der Elektronendichtekarte sichtbar.

Abstract

Lanthipeptides are ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) that contain specific intramolecular thioether bridges called (methyl-)lanthionine or (methyl)labionin. These modifications are formed by specific lanthionine-synthetases which are categorized into four distinct classes depending on their organization and structure. The mono- and bifunctional synthetases of classes I and II are largely characterized. However, there is little known about the structure and mechanism of the lanthionine-synthetases of classes III and IV.

Curvocide is a novel class IV lanthipeptide produced by the extremophile bacterium *Thermomonospora curvata*. It comprises 21 amino acids and three methylanthionine bridges, therefore representing a relatively small lanthipeptide with a low degree of post-translational modification. Also the gene cluster consisting of only five genes is relatively small. Thus, the Curvocide system is well suited to serve as a model for an intensive study of class III and IV lanthionine-synthetases.

By means of cloning and isolating recombinant Curvocide synthetase and the respective substrate, recombinant Curvocide precursor peptide, we were able to analyse the enzyme function *in vitro*. Based on these results a model is proposed illustrating an iterative synthesis process. Moreover, specific amino acids in the synthetase sequence were identified that are crucial to the catalytic function.

A more sophisticated insight into the enzyme's catalytic mechanism requires a detailed structure model. As of yet there is no such structure of a trifunctional lanthionine-synthetase available. By means of extensive optimization a large quantity of highly pure protein was isolated and used for screening for optimal crystallization conditions. Using X-ray protein crystallography we were able to achieve the first structure model of a trifunctional lanthionin-synthetase. Despite efforts of co-crystallization, the substrate, co-factors as well as Mg²⁺- and Zn²⁺-ions are not visible in the electron density map.

Teile dieser Arbeit werden zur Veröffentlichung vorbereitet.

Publikation

Discovery of the lanthipeptide Curvocidin and structural insights into its trifunctional synthetase CuvL

Arnar Sigurdsson, Berta M. Martins, Simon A. Düttmann, Martin Jasyk, Benjamin Dimos-Röhl, Felix Schöpf, Manuel Gemander, Caroline H. Knittel, Romina Schnegotzki, Bianca Schmid, Simone Kosol, Lea Pommerening, Maria Gonzáles-Viegas, Maria Seidel, Manuela Hügelland, Silke Leimkühler, Holger Dobbek, Andi Mainz, Roderich D. Süssmuth

In Vorbereitung

Für Bertel

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Naturstoffe	1
1.2	Peptide	3
1.3	Nicht-ribosomale Peptide	3
1.4	Ribosomal synthetisierte und post-translational modifizierte Peptide	5
1.5	Lanthipeptide	11
1.5.1	Biosynthese der Lanthipeptide	14
1.5.2	Klasse I-Lanthipeptide	16
1.5.3	Klasse II-Lanthipeptide	19
1.5.4	Klasse III-Lanthipeptide	22
1.5.5	Klasse IV-Lanthipeptide	26
1.6	Das Curvocidin-System	28
2	Zielsetzung	31
3	Material und Methoden	33
3.1	Material	33
3.1.1	Geräte, Säulen und Software	33
3.1.2	Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien	36
3.1.3	Kits, Kristallisations-Screening-Lösungen	38
3.1.4	Oligonukleotide, Plasmide	39
3.1.5	Mikroorganismen, Kulturmedien	43
3.2	Methoden	51
3.2.1	Mikrobiologische Methoden	51
3.2.1.1	Kultivierung	51
3.2.1.2	Cryo-Konservierung	52
3.2.1.3	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	52
3.2.1.4	Transformation	52
3.2.2	Molekularbiologische Methoden	53
3.2.2.1	Heterologe Expression und Aufreinigung von Proteinen	53
3.2.2.2	Kristallisation	54

3.2.2.3	Expression und Aufreinigung heterologer Peptide	54
3.2.2.4	Konzentrationsmessung von Proteinlösungen.....	55
3.2.2.5	SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	55
3.2.2.6	Western Blot.....	56
3.2.2.7	Tryptischer Verdau (<i>in gel</i>).....	57
3.2.2.8	<i>In vitro</i> Assays.....	57
3.2.2.9	Isolation genomischer DNA.....	58
3.2.2.10	Isolation von Plasmid DNA	58
3.2.2.11	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	59
3.2.2.12	Zielgerichtete Mutagenese.....	59
3.2.2.13	Klonierung	59
3.2.2.14	Agarose-Gelelektrophorese.....	60
3.2.2.15	Konzentrationsmessung von DNA-Lösungen	60
3.2.2.16	DNA-Sequenzierung und -synthese.....	60
3.2.3	Analytische Methoden	61
3.2.3.1	Präparative HPLC.....	61
3.2.3.2	HPLC-ESI-MS Exactive Massenspektrometer	61
3.2.3.3	CD-Spektroskopie	62
4	Ergebnisse und Diskussion	63
4.1	Kristallisation der Curvocidin-Synthetase CuvL.....	63
4.1.1	Isolierung von CuvL.....	63
4.1.2	Kristallisations-Screens.....	69
4.1.3	Kristallstruktur	75
4.1.3.1	Lyasedomäne.....	76
4.1.3.2	Kinasedomäne	79
4.1.3.3	Cyclasedomäne.....	81
4.2	Charakterisierung der CuvL-Funktion <i>in vitro</i>	83
4.2.1	Isolierung von CuvA.....	83
4.2.2	Optimierung der <i>in vitro</i> Assay-Bedingungen	86
4.2.3	Modell des Biosynthesewegs	89
5	Ausblick	95
6	Appendix	97

6.1	Abkürzungsverzeichnis	97
6.2	Abbildungsverzeichnis	99
6.3	Tabellenverzeichnis	101
6.4	Weitere Informationen zur Charakterisierung der CuvL <i>in vitro</i> Funktion	102
6.5	Danksagung	119
7	Literatur.....	120

1 Einführung

Der Metabolismus aller Organismen lässt sich basal in zwei Kategorien unterteilen. Der Primärmetabolismus umfasst solche Stoffwechselfvorgänge, die essentiell zur Lebenserhaltung und zum Wachstum sind. Dabei sind die zu Grunde liegenden Mechanismen, Reaktionen und Produkte bei allen Organismen sehr ähnlich. Prominente Beispiele sind die Aminosäuresynthesen, die Fettsäuresynthese, die Glycolyse und Gluconeogenese oder der Citrat- und Harnstoffzyklus.

Die Produkte des Sekundärmetabolismus sind nicht im engeren Sinne essentiell. Sie erfüllen in der Zelle zusätzliche Funktionen, etwa den Schutz vor anderen Organismen, Signaltransduktion, Pigmentierung oder die Aufnahme von Spurenelementen. Bei Mikroorganismen wird unterschieden zwischen der Trophophase (altgr. τροφή trophe: Ernährung), in welcher der Primärstoffwechsel dominiert und der Idiophase (altgr. ἴδιος idios: eigen), in der Primär- und Sekundärstoffwechsel parallel verlaufen. Eine scharfe Trennung der beiden Systeme ist kaum möglich, da der Sekundärmetabolismus in der Regel von Primärmetaboliten abhängig ist.

Die Funktion der meisten Sekundärmetaboliten, die auch Naturstoffe genannt werden (engl. *natural products*), ist unbekannt. Einige Naturstoffe jedoch sind für den Menschen, aufgrund eines breit gefächerten Wirkspektrums, von größtem Interesse und Forschende aus allen naturwissenschaftlichen Disziplinen arbeiten gemeinsam daran, neue potentielle Wirkstoffe zu finden und so dem Menschen nutzbar zu machen.

1.1 Naturstoffe

Naturstoffe und Naturstoffderivate decken ein breites Spektrum an Aktivitäten ab. Am prominentesten sind antibiotische Wirkungen¹, entweder mit unterschiedlicher Spezifität für

gram-positive (g^+) oder gram-negative (g^-) Bakterien oder als Breitband-Antibiotika. Weiterhin sind Naturstoffe mit insektizider², antifungaler³ oder herbizider^{4,5} Wirkung Bestandteil der modernen Agrarwirtschaft. Spezifischer sind Wirkstoffe gegen den Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum*⁶ oder Nematoden, wie den Geflügelparasiten *Ascaridia galli*⁷. Darüber hinaus umfasst das Spektrum antivirale^{8,9}, cytostatische^{10,11}, analgetische^{11,12} und immunsuppressive¹³ Aktivitäten. Andere Verbindungen dienen als Blutdruck-¹⁴ oder Cholesterinsenker¹⁵. Naturstoffe werden in vier große Stoffgruppen unterteilt: Isoprenoide, Polyketide (Aromaten), Alkaloide und Peptide (Abb. 1.1).

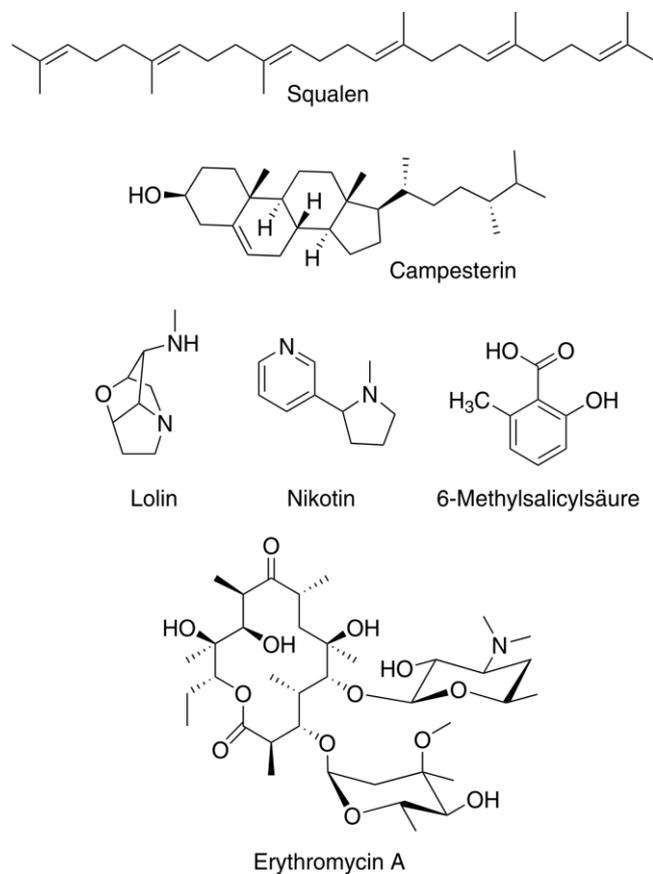


Abbildung 1.1 Auswahl einiger exemplarischer Sekundärmetabolite.

Das Triterpen Squalen und das Steroid Campesterin sind charakteristische Vertreter der Isoprenoide. Für die Bildung von Steroiden dient Squalen als essentielle Zwischenstufe. Das Antibiotikum Erythromycin (Handelsname Ilosone®) und die Verbindung 6-Methylsalicylsäure sind typische Polyketide. Das Insektizid Lolin und das Nervengift Nikotin sind klassische Alkaloide.

Terpene und Steroide werden aus Isopren-Molekülen aufgebaut, weshalb man sie unter dem Begriff Isoprenoide zusammenfasst. Die Biosynthese der aromatischen Verbindungen verläuft hauptsächlich über die Polyketidsynthese¹⁶, die von Coenzym A aktivierten Acyl-Gruppen

ausgeht. Alkaloide sind Naturstoffe, die meist stickstoffhaltig und alkalisch sind, der Begriff ist jedoch bis heute weder zufriedenstellend noch umfassend definiert. Vielfach leiten sich Alkaloide von Aminosäuren ab.

1.2 Peptide

Peptide spielen in allen Organismen eine physiologische Schlüsselrolle. Sie erfüllen sowohl intra- als auch extrazellulär eine Vielzahl von Aufgaben und Funktionen. Peptidhormone wie Insulin¹⁷ oder Ghrelin¹⁸ regulieren basale Körperfunktionen wie Glukosehaushalt und Appetit. Neuropeptide wie die Endorphine¹⁹ oder Substanz P²⁰ regeln Empfindungen wie Euphorie und Schmerz. Defensine^{21,22} sind Peptide, die von Tieren und höheren Pflanzen zum Schutz vor Infektionen durch Bakterien, Hefen oder Protozoen gebildet werden. Die hohe Effektivität der Defensine in der Initialabwehr liegt dabei im synergetischen Zusammenwirken einer riesigen Diversität dieser Peptide begründet²³. Das Synergieprinzip gilt auch für die komplexen Peptidtoxin-Gemische von Schlangen²⁴ und anderen Gifttieren.

Peptid-Naturstoffe werden in nicht-ribosomale Peptide und ribosomale Peptide unterteilt, abhängig von ihrem Biosynthesemechanismus.

1.3 Nicht-ribosomale Peptide

Experimente mit Ribosomen-Inhibitoren in den frühen Sechzigerjahren hatten gezeigt, dass die Synthese einiger bestimmter Peptide nicht gehemmt wurde²⁵. Dies führte zur Entdeckung der Nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS)^{26,27}, welche einen signifikanten Teil heute relevanter Peptid-Naturstoffe synthetisieren²⁸. Diese Form der Peptidsynthese ist in Bakterien, Archeen und einigen Pilzen zur Produktion von Sekundärmetaboliten verbreitet. Bei Pflanzen und Tieren scheint dieser Mechanismus kaum umgesetzt zu sein, allerdings wurden vereinzelte Beispiele etwa bei *Drosophila melanogaster*²⁹ und *Caenorhabditis elegans*³⁰ beschrieben.

Nicht-ribosomal synthetisierte Peptide (NRPs) werden von spezifischen NRPS-Enzymkomplexen gebildet. Jeder Komplex besteht aus einer iterativen Abfolge verschiedener Module (*assembly line*), die für die Aktivierung und den Einbau je eines Aminosäure-Bausteins verantwortlich sind (Abb. 1.2). Der erste Baustein wird vom Initiationsmodul aktiviert, danach

folgt eine variable Anzahl von Elongationsmodulen, die weitere Bausteine anfügen. Das Terminationsmodul schließlich spaltet das Peptid ab und kann dabei auch eine Makrocyclisierung durchführen²⁸.

Ein jedes Modul ist aus verschiedenen Domänen aufgebaut. Die ATP-abhängige Adenylierungsdomäne (A-Domäne) selektiert und aktiviert die für sie spezifische Aminosäure und transloziert diese zur folgenden Thiolierungsdomäne (PCP-Domäne). Diese trägt einen charakteristischen Ppant-Arm (4'-Phosphopantethein), an dem die Thiolierung der aktivierten Aminosäure stattfindet. Der so entstandene Aminoacylthioester wird im Anschluss zur Kondensationsdomäne (C-Domäne) transloziert. Hier geschieht die Bildung der Peptidbindung durch einen Angriff der α -Aminogruppe der aktivierten Aminosäure auf den Thioester der naszierenden Peptidkette. Viele NRPs sind stark modifiziert, jedoch finden viele Modifikationen, im Gegensatz zu ribosomalen Peptiden, parallel zur Peptidsynthese, aber auch danach statt (*tailoring*)³¹. Für den ersteren Prozess verantwortlich sind bestimmte Domänen, die in der Regel zwischen PCP- und C-Domäne lokalisiert sind. Es kommen unter anderem Epimerisierungs-, Reduktions-, oder Oxidationsdomänen, aber auch Formylierungs- und Methylierungsdomänen vor^{32–36}.

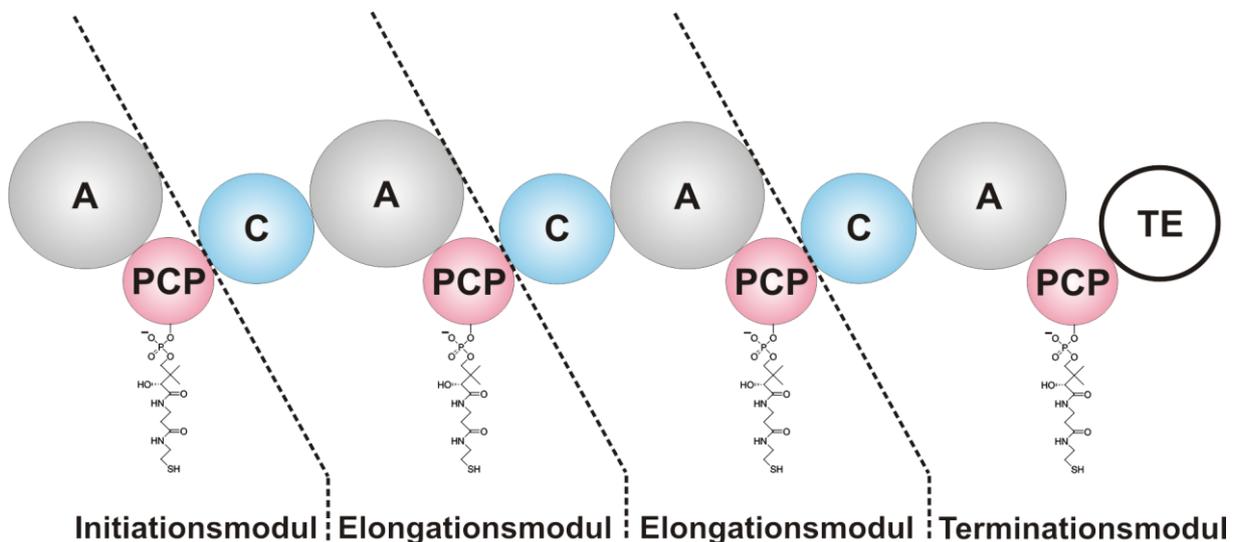


Abbildung 1.2 Schematischer Aufbau einer NRPS-Synthetase.

Jede Kugel symbolisiert eine Proteindomäne. **(A)** Adenylierungsdomäne, **(PCP)** Thiolierungs- oder *peptidyl carrier* Domäne mit Ppant-Arm, **(C)** Kondensationsdomäne, **(TE)** Thioesterasedomäne. Bei NRPS-Systemen, die modifizierte Peptide herstellen, kommen außerdem spezialisierte Modifizierungsdomänen vor, die in der Regel zwischen PCP-Domäne und C-Domäne lokalisiert sind: Epimerase- (E), Reduktase- (R), Methyltransferase- (M), Heterocyclisierungs- (Cy), Formylierungs- (F), und Oxidationsdomänen (Ox) kommen am häufigsten vor.

Das Terminationsmodul trägt eine C-terminale Thioesterasedomäne (TE-Domäne), die die Abspaltung des Peptids katalysiert. Nach der Abspaltung können weitere Enzyme post-NRPS Modifikationen vornehmen, um das Produkt zu vervollständigen³⁷. Eine signifikante Anzahl von NRPS-Systemen ist mit Polyketidsynthasen (PKS) vergesellschaftet und bilden NRPS/PKS-Hybride³⁸. Dies wird ermöglicht durch den ihnen gemeinsamen Thiotemplat-Mechanismus und erhöht die Variabilität der gebildeten Peptide weiter.

Die Komplexität möglicher NRPS-Peptide ist sehr hoch, da die Einschränkungen ribosomaler Produktion nicht gelten. Die Länge der Peptide scheint allerdings beschränkt zu sein. Größere Peptide bestehen aus bis zu 20 Aminosäuren, während das größte zur Zeit bekannte NRPS-Peptid Syringopeptin 25A (SP_{25A}) aus 25 Aminosäuren besteht³⁹.

1.4 Ribosomal synthetisierte und post-translational modifizierte Peptide

Peptide, die über den ribosomalen Weg hergestellt werden und im Anschluss einen Reifungsprozess durch die Interaktion mit modifizierenden Enzymen durchlaufen, werden zur Klasse der ribosomal synthetisierten und post-translational modifizierten Peptide (RiPPs) gezählt. Die Biosynthese solcher Peptide erfordert die Kooperation mehrerer komplexer Synthesekreisläufe. Die erforderlichen Schritte können in einen prä-ribosomalen und einen post-ribosomalen Abschnitt unterteilt werden (Abb. 1.3).

Die prä-ribosomalen Schritte zählen zum Primär-Metabolismus und umfassen an erster Stelle die Biosynthesen der proteinogenen L-Aminosäuren. Beispielsweise wird aus dem Citratzyklus-Intermediat α -Ketoglutarat durch Ammoniakfixierung Glutamat hergestellt⁴⁰ oder aus dem Glycolyse-Intermediat 3-Phosphoglycerat werden durch mehrere enzymatische Reaktionen Glycin und Serin hergestellt⁴¹. Je nach Organismus unterscheiden sich diese und die übrigen Aminosäure-Biosynthesewege in mehr oder minder großem Umfang. Der nächste Schritt umfasst die Synthese und Beladung der tRNAs, die für jede Aminosäure spezifisch sind. Die Beladung wird durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen sichergestellt, die sowohl die freie Aminosäure als auch die entsprechende tRNA erkennen können⁴². Die Untereinheiten der Ribosomen werden von 3-4 ribosomalen RNAs (rRNAs) und 50-80 ribosomalen Proteinen (rPs) gebildet. Für den Prozess der Translation schließlich kommt es zur Assemblierung der Ribosomen an der mRNA des zu synthetisierenden RiPPs. Die Synthese des Peptids wird unter Anwendung der beladenen tRNAs im Polysom vorgenommen⁴³ (Abb. 1.3).

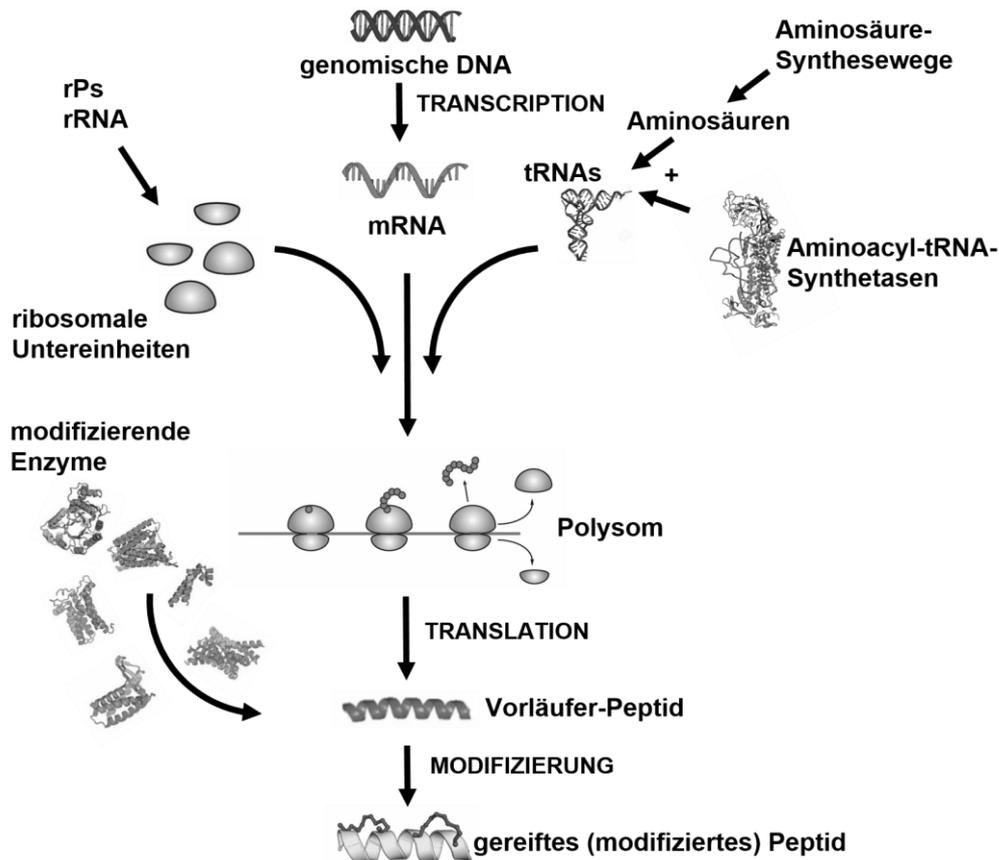


Abbildung 1.3 Schema aller beteiligten Komponenten der RiPP Biosynthese.

Die wesentlichen Komponenten der Translation beinhalten das Ribosom, deren Untereinheiten aus ribosomaler RNA (rRNA) und ribosomalen Proteinen (rPs) bestehen, die *messenger*-RNA (mRNA), die durch den Vorgang der Transkription aus der genomischen DNA kopiert wird, sowie die transfer-RNAs (tRNAs), die durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen mit den entsprechenden Aminosäuren beladen werden. Durch die Translation wird das Vorläufer-Peptid gebildet, das durch eine unterschiedlich große Anzahl modifizierender Enzyme zur Reife gebracht wird.

Die Schritte der post-translationalen Synthese werden dem Sekundärmetabolismus zugerechnet. Sobald das Peptid das Ribosom verlässt, wird es Vorläufer-Peptid (engl. *precursor peptide*) genannt. Es enthält in der Regel ein N-terminales *leader*-Peptid, das für Erkennung und Bindung der modifizierenden Enzyme wichtig ist. Bei eukaryotischen RiPPs enthält es bisweilen eine Zielsteuerungssequenz, um das Vorläufer-Peptid zu den Kompartimenten der Modifikation oder Sekretion zu leiten⁴⁴. Im späteren Verlauf des Reifungsprozesses wird das *leader*-Peptid enzymatisch entfernt.

In der Sequenz folgt auf das *leader*-Peptid das *core*-Peptid, das nach der Modifikation das aktive Peptid darstellt. Bei einigen RiPPs folgt C-terminal ein *follower*-Peptid, das entweder die Funktion eines *leader*-Peptids erfüllt oder eine Erkennungssequenz für Cyclisierungsreaktionen enthält (Abb. 1.4).

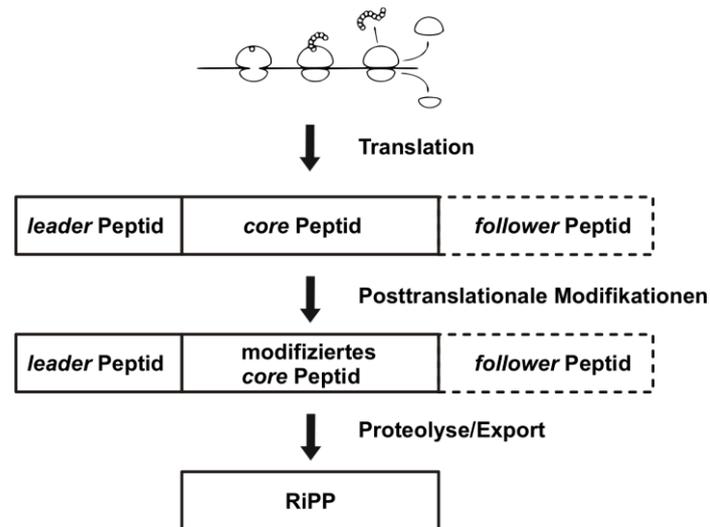


Abbildung 1.4 Schema zum Aufbau der RiPP Vorläufer-Peptide.

Das N-terminale *leader*-Peptid kann in eukaryotischen Peptiden ein Signalpeptid enthalten, das für die intrazelluläre Zielführung essentiell ist. An Stelle des *leader*-Peptids kommen bisweilen, etwa bei den Botromycinen, C-terminale *follower*-Peptide vor, die dieselbe Funktion erfüllen. In anderen eukaryotischen Peptiden, wie den Cyclotiden, Amatoxinen, Orbitiden oder Cyanobactinen, tritt an die Stelle des *follower*-Peptids eine spezifische Erkennungssequenz, die für die Cyclisierung essentiell ist.

Das Vorläufer-Peptid wird im Zuge der Reifung zum aktiven Peptid von einem oder mehreren Enzymen modifiziert und an seinen Zielort transportiert. Die Art und Anzahl dieser modifizierenden Enzyme definiert schließlich, um welche Peptidfamilie innerhalb der RiPPs es sich handelt. Über 20 solcher Familien werden zur Zeit unterschieden^{44,45}.

Eine der einfacheren Modifikationen ist die kovalente Verbindung des N-Terminus mit dem C-Terminus. Allein dadurch definieren sich die Familien der bakteriellen „*head-to-tail*“-cyclisierten Peptide⁴⁶ und der pflanzlichen Orbitide^{44,47}. Die ebenso pflanzlichen Cyclotide weisen neben dem „*head-to-tail*“-Motiv einen speziellen Cystin-Knoten aus drei konservierten Disulfidbrücken auf⁴⁸. Bei den Sactipeptiden wird die Cyclisierung der Peptide erreicht durch eine kovalente Bindung zwischen der Thiolgruppe eines Cysteins und dem α -Kohlenstoff einer beliebigen weiteren Aminosäure⁴⁹. Auch zählen viele Toxine aus Pilzen, wie die Amatoxine (Abb. 1.5A) und Phallotoxine, sowie aus marinen Kegelschnecken, wie die Conopeptide, zu den RiPPs^{50,51}.

Proteusine (auch Polytheonamide genannt) sind eine Familie von komplexen cytotoxischen Peptiden, deren hauptsächlicher Wirkmechanismus die Bildung von Membrantunneln beinhaltet. Sie bestehen in der Regel aus 48 Aminosäuren, die stark modifiziert sind. Diese Modifikationen reichen von Hydroxylierungen, über *tert*-Leucin, über C-methylierte

Aminosäuren bis hin zu D-Aminosäuren. In vielen Fällen ist jede zweite Aminosäure im nativen Peptid eine L-Aminosäure, die iterativ auf eine D-Aminosäure folgt⁵²⁻⁵⁴.

Bottromycine sind kleine Peptide von unter zehn Aminosäuren, die unter anderem antimikrobielle Wirkung gegen MRSA und VRE zeigen. Sie weisen einige einzigartige Modifikationen auf. Makrocyclische Amidine und decarboxylierte C-terminale Thiazole, aber auch C-methylierte Aminosäuren und weitere Modifikationen kommen vor. Die ungewöhnlich große Anzahl von verschiedenen modifizierenden Enzymen ist typisch für die Bottromycine und reicht von SAM-Methyltransferasen über O-Methyltransferasen, Hydrolasen und Aminopetidase bis hin zu Cytochrom P450 Oxidoreduktasen⁵⁵⁻⁵⁷.

Microcine sind recht große Peptide von bis zu 10 kDa. Ihren Namen haben sie dem Kontrast zu antibakteriellen Proteinen von *Escherichia coli* zu verdanken, die Colicine genannt werden. Diese haben eine Größe von 25-80 kDa. Colicine von unter 10 kDa werden Mikro-Colicine oder kurz Microcine genannt⁵⁸. Microcine zeigen hochpotente antimikrobielle Wirkung gegen gramnegative (g^-) Bakterien. Sie wirken entweder durch eine Interaktion mit spezifischen Rezeptoren wie OmpF, die in die Nährstoffaufnahme eingebunden sind oder sie wirken nach Eindringen in die Zelle durch die Inhibition essentieller Enzyme, wie der DNA-Gyrase oder der RNA-Polymerase^{59,60}. Die Diversität der Modifikationen reicht von Thiazolen und Oxazolen, (die durch Modifikation von Glycin, Serin und Cystein entstehen) über N-Formylierung bis zur Addition von AMP-Resten oder 1,3-Propanolamin^{59,61}.

Microviridine sind RiPPs, die in Süßwasser-Cyanobakterien gefunden wurden (Abb. 1.5B). Sie wirken als Protease-Inhibitoren mit direkter Spezialisierung, zum Beispiel auf Elastase, Trypsin-ähnliche Proteasen oder Chymotrypsin. Die beschriebenen Microviridine bestehen aus 13 oder 14 Aminosäuren, sind cyclisch und N-acetyliert und enthalten meist ein Lactam (gebildet aus der ω -Carboxyfunktion von Glutamat oder Aspartat und der ϵ -Aminogruppe von Lysin) oder ein Lacton (gebildet durch Veresterung der ω -Carboxyfunktion von Glutamat oder Aspartat mit der Hydroxygruppe von Serin oder Threonin)⁶²⁻⁶⁶. Jüngere Untersuchungen sehen Microviridine nicht mehr als eigenständige RiPPs-Familie an. Demnach gehört die Microviridin-Gruppe neben der Thuringinin-Gruppe, der Plesiocin-Gruppe und mindestens neun weiteren, teils noch nicht näher charakterisierten Gruppen, zu einer erweiterten Familie, den *ω -ester-containing peptides* (OEPs)^{67,68}. Als verbindendes Element werden neben

bestimmten konservierten Sequenzbereichen die Synthetasen der ω -Ester angesehen, die zur Superfamilie der *ATP-grasp*-Enzyme gehören⁶⁹.

Eine weitere Peptidfamilie wird unter dem Akronym LAP (Lineare Azol(in)-haltige Peptide) zusammengefasst. Diese nicht-cyclisierten Peptide enthalten eine variable Kombination an Thiazolen und (Methyl-)Oxazolen. Diese Heterocyklen werden durch modifizierende Enzyme aus Cystein, Serin und Threonin gebildet⁷⁰. Auch weitere Modifikationen wie Acetylierungen, Methylierungen und Dehydratisierungen⁷¹⁻⁷³ kommen vor. Plantazolicin etwa wird von verschiedenen *Bacillus* sp.-Stämmen produziert und wirkt antimikrobiell, mit einer besonderen Spezifität gegen *Bacillus anthracis*^{74,75} (Abb. 1.5C).

Cyanobaktine sind RiPPs, die von Cyanobakterien produziert werden. Es handelt sich um 6-20 Aminosäuren große, „*head-to-tail*“-cyclisierte Peptide⁷⁶, die Thiozol(in)e und Oxazol(in)e enthalten⁷⁷. Weiterhin kommen Prenylierungen an Serin, Threonin und Tyrosin vor⁷⁸. Die proteolytische *leader*-Peptid-Abspaltung geschieht entweder durch zwei homologe Serin-Proteasen, durch die Cyclodehydratase des Patellamid-Wegs oder durch eine Prenyltransferase. Auch Thiazolin/Oxazolin-Dehydrogenasen und Methyltransferasen sind beteiligt^{44,79,80}. Die biologischen Aktivitäten der Cyanobaktine reichen von antiviral, antibiotisch oder cytotoxisch über Protease-Hemmung oder die Bindung von Metallionen⁸¹⁻⁸⁴. Ulithiacyclamid beispielsweise ist ein potentes cytotoxisches Peptid, das mit vier Heterocyklen und einer Disulfidbrücke eine sehr kompakte Struktur bildet⁸⁵ (Abb. 1.5D).

Thiopeptide sind eine Familie von mittlerweile über 100 beschriebenen Peptiden, die unter anderem antimikrobiell, cytotoxisch oder gegen Malaria^{86,87} wirken. Sie weisen einen oder zwei Makrocyclen auf und enthalten mehrere Thiazole und Dehydroaminosäuren. Das definierende Merkmal jedoch ist ein sechsgliedriger Heterocyclus, der in mindestens einer der folgenden drei Oxidationstufen vorliegt: als Piperidin wie in Thiopeptin⁸⁸, Dehydropiperidin wie in Thiostrepton⁸⁹ oder Pyridin wie in Micrococcin⁹⁰ (Abb. 1.5E).

Lassopeptide sind 6-21 Aminosäuren lange Peptide, die ein N-terminales Makrolactam aufweisen. Dieses wird durch die Kondensation der N-terminalen Aminogruppe mit der Seitenketten-Carboxyfunktion von Glutamat oder Aspartat gebildet⁴⁴. Bei der Bildung der Ringstruktur wird der C-terminale, lineare Teil des Peptids wie bei einem Lasso durch den Ring geführt und durch die Ringschließung sterisch arretiert. Diese einzigartige Sekundärstruktur macht das Peptid außerordentlich stabil gegenüber Denaturierung, Proteolyse und

Aggregation⁹¹. Neben der Lassostruktur kommen auch bis zu zwei Disulfidbrücken vor. Lassopeptide werden von mehreren Bakterienarten und sogar von einigen Archeen gebildet⁹². Die biologischen Aktivitäten reichen von Enzym-Inhibition⁹³ über Rezeptor-Antagonisten⁹⁴ bis hin zu anti-HIV⁹⁵ und antibakteriell⁹⁶. Capistruin ist ein 19 Aminosäuren langer RNA-Polymerase-Inhibitor (Abb. 1.5F). Im Zuge der biochemischen Charakterisierung von Capistruin wurde festgestellt, dass für die komplexe Bildung der Lassostruktur lediglich vier der 19 Aminosäuren essentiell sind^{91,97}.

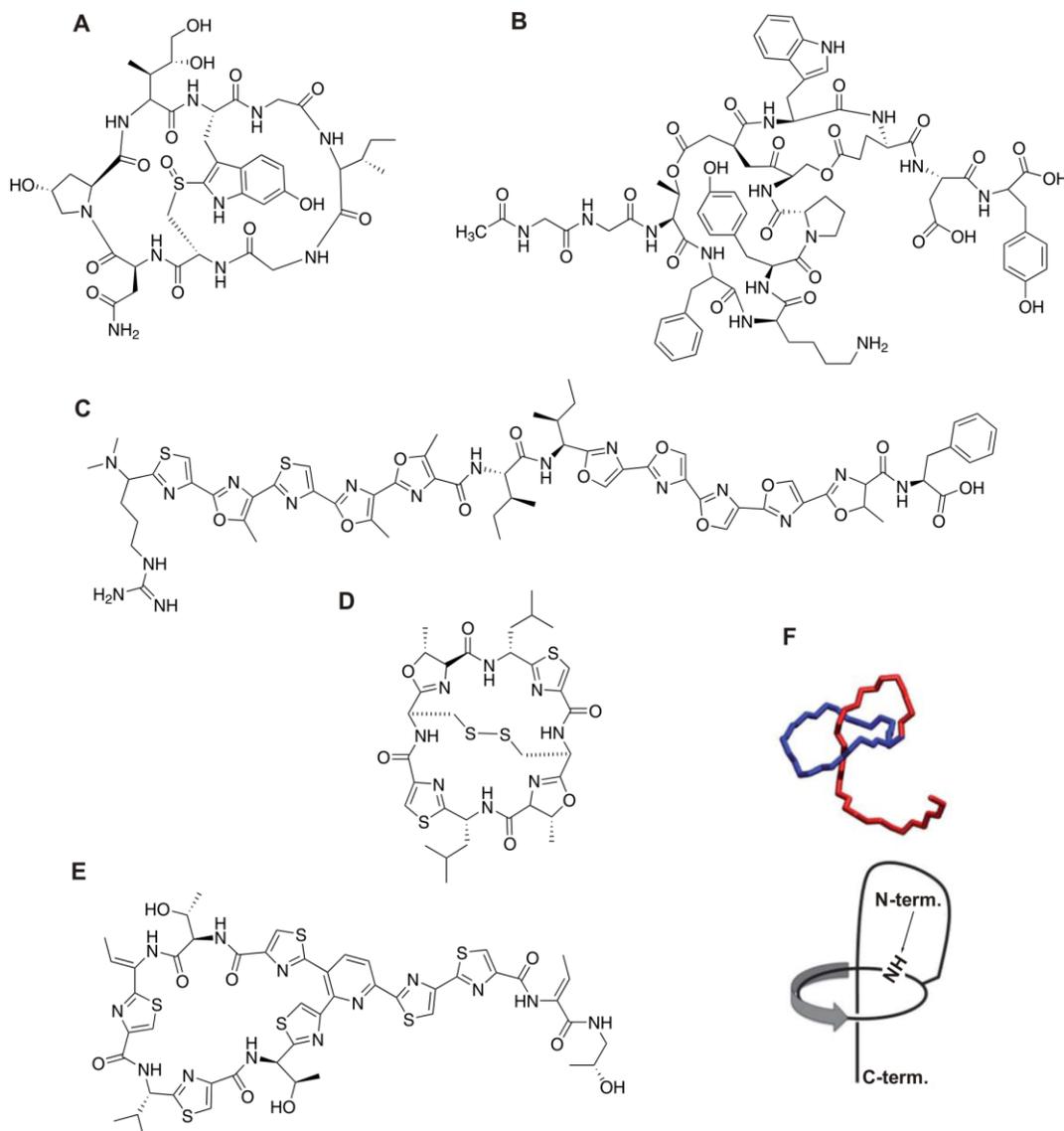


Abbildung 1.5 Auswahl einiger exemplarischer RiPPs.

(A) α -Amanitin (pilzliches Toxin). **(B)** Microviridin L1 (Microviridine) **(C)** Plantazolicin (LAPs) **(D)** Ulithiacyclamid (Cyanobaktine) **(E)** Micrococцин P1 (Thiopeptid) **(F)** Capistruin und Topologie-Modell der Lassopeptide (der Pfeil zeigt vom N-Terminus zum C-Terminus). Modifiziert nach Maksimov et al.⁹¹.

Borosine stellen eine der neuesten RiPP-Klassen dar. Diese bisher nur in Pilzen gefundenen Peptide gehen zurück auf Omphalotin A, einer gegen Nematoden wirksamen Verbindung aus *Omphalotus olearius*⁹⁸. Es handelt sich um ein cyclisches Dodecapeptid mit *N*-Methylierungen im Peptid-Rückgrat. Es enthält hauptsächlich hydrophobe Aminosäuren, die alle L-konfiguriert vorliegen. Omphalotin A und seine bisher beschriebenen acht Derivate Omphalotin B-I, verfügen meist über weitere Modifikationen wie etwa Hydroxylierungen oder Acetylierungen^{99,100}. Sie werden nicht sekretiert, sondern verbleiben innerhalb der Zelle¹⁰¹. Die *N*-Methylierungsreaktionen im Peptidrückgrat sind eine Herausforderung aufgrund der niedrigen Reaktivität des sekundären Amins im Kontext der Delokalisation des freien Elektronenpaars innerhalb der Peptidbindung¹⁰². Andere *N*-methylierte Peptide, wie etwa Cyclosporin A¹⁰³ oder Actinomycin S¹⁰⁴ werden daher durch NRPS-Systeme synthetisiert, wobei die *N*-Methylierung vor der Knüpfung der Peptidbindung geschieht. Das Omphalotin Vorläufer-Peptid ist über 400 Aminosäuren lang, wobei der N-Terminus eine SAM-abhängige Methyltransferase-Domäne darstellt. Das *core*-Peptid ist also direkt an das modifizierende Enzym gekoppelt. Eine spezifische Prolyl-Oligopeptidase (POP) ist für die Abspaltung und Makrocyclisierung des modifizierten *core*-Peptids verantwortlich^{105,106}.

Durch intensive Forschungsanstrengungen in dem Gebiet werden regelmäßig neue Familien der RiPPs beschrieben, so beispielsweise die pilzlichen Dikaridine¹⁰⁷, die pflanzlichen Lyciumine¹⁰⁸ oder die bakteriellen Thioamitide¹⁰⁹.

1.5 Lanthipeptide

Der Name „Lanthipeptid“ hat seinen Ursprung in der Bezeichnung „Lanthioninhaltige Peptide“ (engl. *lanthionine containing peptides*). Die Di-amino-di-säure Lanthionin (Lan) besteht aus zwei Alaninen, die kovalent an ihren β -Kohlenstoffatomen über eine Thioetherbrücke miteinander verbunden sind (Abb 1.7). Die ersten Lanthipeptide, die entdeckt und charakterisiert wurden, hatten antibiotische Wirkung und wurden daher auch Lantibiotika genannt^{44,110}.

Im Jahr 1928 veröffentlichte das amerikanische Landwirtschaftsministerium eine Studie, die zeigte, dass das Milchsäurebakterium *Lactococcus lactis* (damals noch *Streptococcus lactis*) einen Stoff absonderte, der das Wachstum des Milchsäurebakteriums *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (damals noch *Lactobacillus bulgaricus*) hemmte. Damit war das

erste Lanthipeptid Nisin entdeckt¹¹¹ (s. 1.5.2, S. 15). Das Konzept antibiotischer Stoffe war noch weitestgehend unbekannt. Alexander Fleming sollte erst im Mai des Folgejahres 1929 seine Entdeckung des Penicillins veröffentlichen¹¹². Erst allmählich wurde die erhebliche Bedeutung der Antibiotika für die Medizin erkannt. Die Strukturaufklärung von Nisin und damit die Identifikation als Lantibiotikum erfolgte erst im Jahr 1971¹¹³.

Bis zum Ende der 1980er Jahre war man der Überzeugung, dass Lanthipeptide nicht ribosomalen Ursprungs sein könnten, da der genetische Code den Einbau ungewöhnlicher, d.h. nicht-kanonischer Aminosäuren nicht zulasse¹¹⁴. Diese Annahme wurde zwar vereinzelt angezweifelt¹¹⁵, konnte aber erst 1988 mit der Sequenzierung des Biosynthese-Gens von Epidermin zweifelsfrei widerlegt werden¹¹⁰. Kurz darauf folgten auch die Entdeckungen der Biosynthese-Gene von Subtilin¹¹⁶, Nisin^{117,118} und Pep5¹¹⁹, wodurch die Einordnung der Lanthipeptide zu den RiPPs gefestigt wurde.

Das erste System zur Klassifizierung der Lanthipeptide wurde 1991 postuliert. Es teilte die bekannten Lanthipeptide anhand ihrer Struktur und ihres *modus operandi* in zwei Typen ein. Flexible, lineare Lanthipeptide, die Poren in Cytoplasma-Membranen bilden, wurden zu Typ A gezählt. Globuläre Lanthipeptide, die als kompetitive Enzym-Inhibitoren wirken, wurden zu Typ B gezählt^{120,121}. Im Laufe der folgenden Jahre brachten neue Erkenntnisse dieses System jedoch schnell ins Wanken. Die Charakterisierung von Lacticin 481 zeigte ein teils lineares, teils globuläres Peptid, dessen Modifikationssystem charakteristisch für Typ B war. Für Lacticin 481 wurde daher ein neuer Typ A II geschaffen. Mit der Entdeckung von SapB im Jahr 2004 erwies sich das Klassifizierungssystem als nicht länger tragfähig, als erkannt wurde, dass Lanthipeptide nicht ausschließlich antibiotische Wirkung zeigen¹²². Die Klassifizierung über die Peptidstruktur und-funktion hatte sich als nicht zielführend erwiesen. Über 20 Jahre später einigte man sich schließlich auf das noch heute bestehende Klassifizierungsmodell, das die Lanthipeptide anhand von Struktur-Eigenschaften der modifizierenden Enzyme in vier Klassen unterteilt¹²³ (Abb. 1.6).

Lanthipeptide der Klasse I werden von zwei unabhängigen Enzymen modifiziert, einer Dehydratase^{124–127} und einer Cyclase^{128–130}. Die Dehydratase bereitet die Bildung einer Lanthioninbrücke vor, die Cyclase schließt sie mithilfe eines Zn^{2+} -Ions im katalytischen Zentrum ab. Dafür bilden die Proteine wahrscheinlich einen binären Enzymkomplex¹³¹. Im Fall von Klasse II-Lanthipeptiden werden beide Funktionen von einem bifunktionalen Enzym mit

einer Dehydratase- und einer Cyclase-Domäne übernommen^{132,133}. Die Enzyme dieser beiden Klassen sind detailliert untersucht worden, es liegen Strukturdaten für verschiedene Vertreter vor und der Mechanismus der Katalyse ist hinreichend bekannt (s. 1.5.2, S. 15, s. 1.5.3, S. 18).

Eine bedeutende Anzahl von Lanthipeptiden wird darüber hinaus von trifunktionalen Enzymen modifiziert. Diese bestehen aus einer N-terminalen Phosphoserin(pSer)/Phosphothreonin(pThr)-Lyasedomäne^{134–136}, einer zentralen Ser/Thr-Kinasedomäne und einer C-terminalen Cyclasedomäne. Diese Lanthipeptide werden weiter in die Klassen III und IV unterteilt, die sich darin unterscheiden, dass die Aminosäuresequenz der Cyclasedomäne die konservierte Ligandentriade N-[CCxH]-C für die Bindung des Zn^{2+} -Ions enthält^{129,137,138}. Ob es sich in beiden Fällen um ein Metalloprotein handelt oder nicht, ist auf Grund fehlender Strukturdaten bisher noch nicht abschließend geklärt. Trotz signifikanter Ähnlichkeiten in Sequenz und Struktur legen bioinformatische Analysen nahe, dass Klasse III- und Klasse IV-Enzyme phylogenetisch unterschiedliche Kladen besetzen und somit wahrscheinlich konvergent evolviert sind¹³⁹. Einige Klasse III-Enzyme sind außerdem in der Lage, eine zusätzliche C-C-Brücke an Lanthionin zu koppeln und damit die Tri-amino-tri-säuren Labionin (Lab) oder Methyllabionin (MeLab) zu generieren^{12,140,141} (Abb. 1.7).

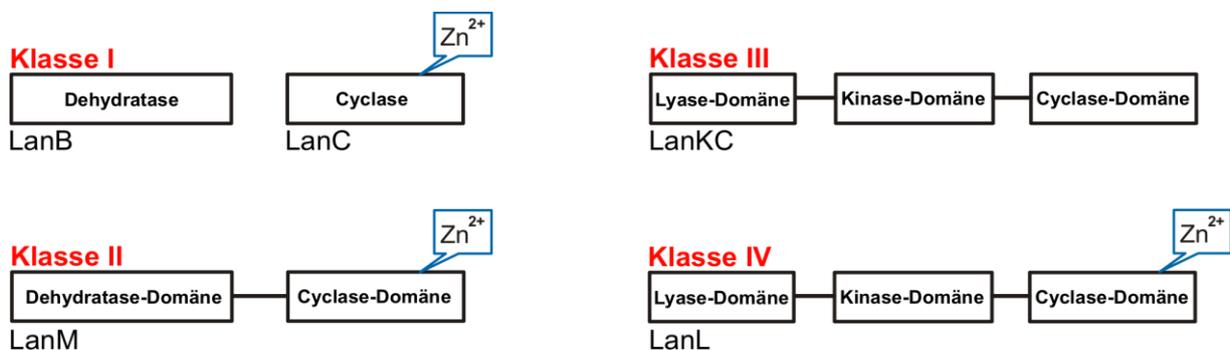


Abbildung 1.6 Klassifizierungssystem der Lanthipeptide.

Schematische Darstellung der Lanthionin-Synthetasen-Organisation. Klasse I verwendet zwei separate Enzyme: eine LanB genannte Dehydratase und eine LanC genannte Zink-abhängige Cyclase. Klasse II verwendet bifunktionale, LanM genannte, Synthetasen mit einer N-terminalen Dehydratasedomäne und einer C-terminalen Zink-abhängigen Cyclasedomäne. Klasse III verwendet trifunktionale Synthetasen mit einer N-terminalen pSer/pThr-Lyasedomäne, einer zentralen Ser/Thr-Kinasedomäne und einer C-terminalen, wahrscheinlich Zink-unabhängigen, Cyclasedomäne. Klasse IV verwendet ebenfalls trifunktionale Synthetasen mit einer N-terminalen pSer/pThr-Lyasedomäne, einer zentralen Ser/Thr-Kinasedomäne und einer Zink-abhängigen C-terminalen Cyclasedomäne. Das verwendete Präfix „Lan“ in der Bezeichnung der Proteine wird bei der Charakterisierung neuer Enzyme durch ein spezifisches Kürzel ersetzt, das Suffix bleibt erhalten (z.B. „NisB“ bei Nisin).

Eine weitere RiPP-Familie, die Linaridine, sind den Lanthipeptiden insofern sehr ähnlich, als dass auch sie über Thioether-Brücken verfügen. Die Untersuchung der korrespondierenden Gencluster macht jedoch deutlich, dass keine homologe Enzyme zu den Lanthipeptid-Dehydratasen an der Synthese der Linaridine beteiligt sind^{142–146}. Weitere Forschung ist nötig, um den Status der Linaridine genauer zu definieren. Es ist durchaus möglich, dass sie eine noch nicht charakterisierte fünfte Klasse der Lanthipeptide bilden⁴⁴. Ähnlich verhält es sich mit den erst kürzlich beschriebenen Peptiden Cacaoidin¹⁴⁷ und Lexapeptid¹⁴⁸, deren Modifikationen denen der Lanthipeptide sehr ähnlich sind, aber deren Biosyntheseweg grundsätzlich anders verläuft.

Eine neue Variante der Lanthipeptide wurde erst kürzlich entdeckt. Lipolanthine sind gekennzeichnet durch eine N-terminale Dimethylguanidin-Fettsäure (MGFA) und die neuartige Avionin-Gruppe, einer Kombination aus Aminovinylcystein (AviCys: S-[(Z)-2-aminovinyl]-D-cystein) und Labionin (Lab)¹⁴⁹. Avionin wird gebildet durch ein Zusammenspiel aus der Lanthionin-Synthetase MicKC und der FAD-abhängigen Cystein-Carboxylase MicD. Die Kopplung der von einer Polyketidsynthase (PKS) abgeleiteten MGFA geschieht nach vorangegangener Abspaltung des *leader*-Peptids¹⁵⁰. Das Lipolanthin Microvionin zeichnet sich durch eine starke antimikrobielle Wirkung gegen MRSA und *Streptococcus pneumoniae* aus. Die beiden bisher beschriebenen Lipolanthine Microvionin und Nocavionin sind auch deshalb außergewöhnlich, da alle anderen antibiotisch wirksamen Lipopeptide wie Polymyxin B¹⁵¹ durch NRPS gebildet werden^{149,152}.

1.5.1 Biosynthese der Lanthipeptide

Lanthipeptide werden zunächst als inaktive Vorläufer-Peptide von Ribosomen synthetisiert. Nach der Translation werden sie von spezifischen Lanthionin-Synthetasen modifiziert. Anschließend werden die modifizierten Peptide durch Transportproteine sekretiert. Im Allgemeinen sind die Gene für die Lanthipeptid Biosynthesen in Genclustern organisiert. Auch wenn Anzahl, Größe und Orientierung der Gene variieren, liegen mindestens drei Gene immer vor: Ein Gen für das Vorläufer-Peptid, ein Gen für die Lanthionin-Synthetase und ein Transportergen. Die Gencluster sind meist im Bakterien-Chromosom lokalisiert (z.B. Subtilin), kommen aber auch auf Plasmiden (z.B. Lacticin 481) oder konjugativen Transposons (z.B. Nisin) vor¹⁵³.

Maßgeblich für alle Lanthipeptide ist die Lanthionin-Brücke (Lan) und ihre Derivate Methyllanthionin (MeLan), Labionin (Lab) und Methyllabionin (MeLab). Spezifische Lanthionin-Synthetasen bilden die Thioetherbrücken zwischen den Aminosäuren Serin (bzw. Threonin) und Cystein (Abb. 1.7).

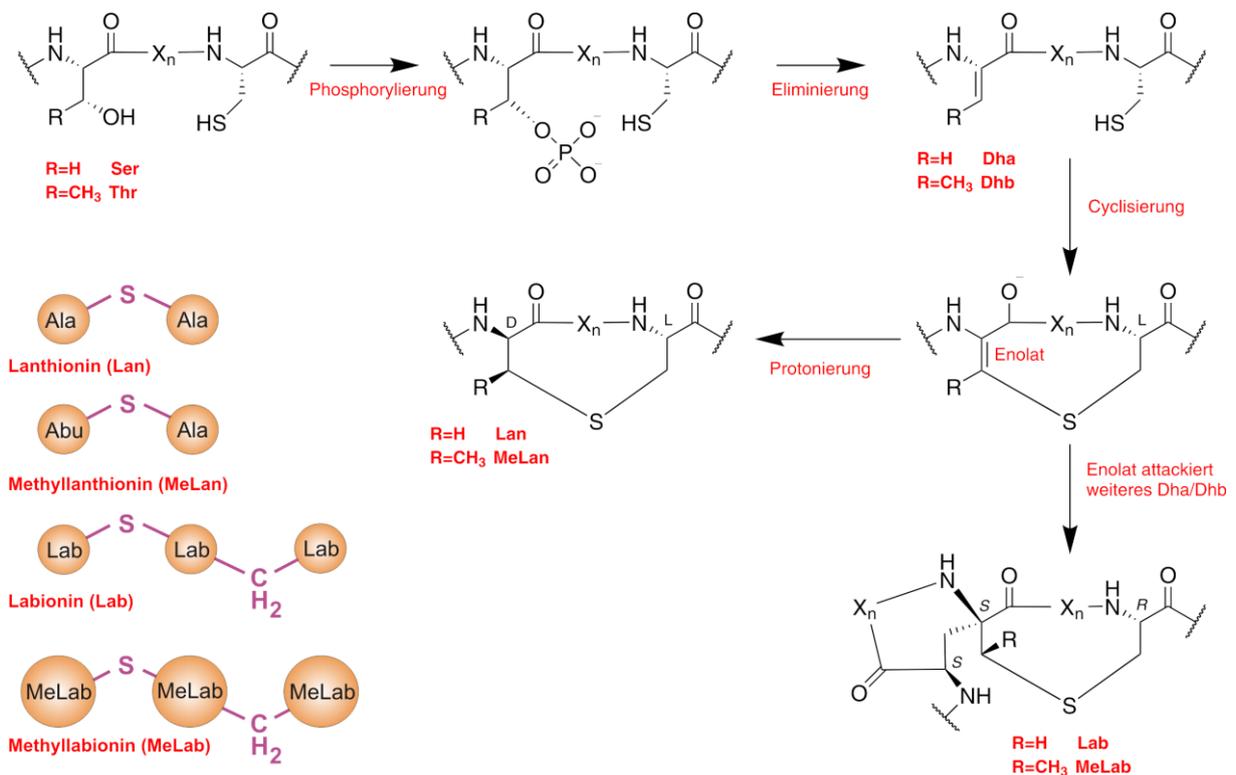


Abbildung 1.7 Biosyntheseweg von (Methyl-)Lanthionin und (Methyl-)Labionin.

Die Biosynthese von Lanthionin und Labionin startet mit der Phosphorylierung spezifischer Serin- bzw. Threonin-Seitenketten des *core*-Peptids. Durch die β-Eliminierung der Phosphatgruppe wird 2,3-Didehydroalanin (Dha) bzw. 2,3-Didehydrobutyrin (Dhb) gebildet (Abb. 1.9B). Bei Klasse I-Dehydratasen wird die Phosphorylierung durch eine Glutamylierung ersetzt. Die Cyclisierung geschieht durch eine intramolekulare Additionsreaktion eines Cystein-Thiolats (Abb. 1.8B) an Dha bzw. Dhb. Das resultierende Enolat wird entweder protoniert, was zur Bildung von (Methyl-)Lanthionin führt, oder es attackiert ein weiteres Dha bzw. Dhb, was zur Bildung von Labionin bzw. Methyllabionin führt.

Der Mechanismus der Lanthionin-Brückenbildung wird eröffnet mit der Glutamylierung (Klasse I) oder Phosphorylierung (Klassen II, III, IV) der Hydroxyfunktion von Serin bzw. Threonin. Durch die anschließende β-Eliminierung der jeweiligen Abgangsgruppe wird 2,3-Didehydroalanin (Dha) bzw. 2,3-Didehydrobutyrin (Dhb) gebildet (Abb. 1.8 B, Abb. 1.9 B).

Die Brückenbildung (Cyclisierung) erfolgt im Anschluss über eine intramolekulare Additionsreaktion ähnlich der Michael-Addition. Durch einen nukleophilen Angriff des Thiolats

von Cystein auf das β -Kohlenstoffatom von Dha bzw. Dhb entsteht ein Enolat (Abb. 1.8B). Dieses wird daraufhin entweder protoniert, wodurch die Lan- bzw. MeLan-Brücke gebildet wird oder das Enolat durchläuft eine zweite Michael-Addition, attackiert ein weiteres Dha bzw. Dhb und produziert so die, bei Klasse III-Lanthipeptiden vorkommenden Lab- bzw. MeLab-Brücken (Abb. 1.7).

1.5.2 Klasse I-Lanthipeptide

Nisin ist ohne Zweifel das bedeutsamste Lanthipeptid. Es wird seit Jahrzehnten industriell hergestellt und als Konservierungsmittel in Milch-, Fisch- und Fleischprodukten eingesetzt (Euro-Kennnummer 234). Es verhindert in diesem Zusammenhang zuverlässig das Wachstum der gefährlichen Pathogene *Listeria monocytogenes*, *L. innocua* und *Chlostridium botulinum*¹⁵⁴.

Nisin ist ein 34 Aminosäuren langes Peptid, das von *L. lactis* produziert wird und insgesamt acht post-translationale Modifikationen aufweist. Vier MeLan-Brücken und eine Lan-Brücke bilden die internen Makro-Ringstrukturen A-E. Außerdem liegen zweimal Dha und einmal Dhb vor¹¹³. Das Nisin-Gencluster kodiert für 11 Proteine: das Vorläufer-Peptid NisA, die modifizierenden Enzyme NisB, NisC und NisP, den ABC-Transporter NisT, die Regulatoren NisR und NisK sowie die Selbstimmunitäts-Proteine NisI, NisF, NisE und NisG (Abb. 1.8A).

Für die Lanthionin-Modifikation von Nisin wird die Glutamyl-tRNA^{Glu}-abhängige Dehydratase NisB und die Zn²⁺-abhängige Cyclase NisC benötigt. Nach der Translation wird das Vorläufer-Peptid NisA zunächst von NisB gebunden. Dabei ist die Aminosäurefolge N-[FNLD]-C innerhalb des *leader*-Peptids essentiell für die Bindung¹⁵⁵. Darauf erfolgt im N-terminalen Bereich von NisB die Aktivierung der Hydroxylfunktionen von Threonin und Serin durch Addition von Glutamin, das von der Glutamyl-tRNA^{Glu} bezogen wird¹⁵⁶. Die Bindung erfolgt über den Akzeptorarm der tRNA¹⁵⁷. Im C-terminalen Bereich von NisB wird dann das α -Proton der modifizierten Threonine bzw. Serine abstrahiert, um durch β -Eliminierung Dhb bzw. Dha zu bilden¹⁵⁸.

Die spezifische Cyclisierung der (Me)Lan-Brücken erfolgt durch die Cyclase NisC. Im katalytischen Zentrum von NisC ist ein Zn²⁺-Ion gebunden, koordiniert durch zwei Cysteine und ein Histidin (N-[CCX_nH]-C). Die Ringbildung wird erreicht durch den intramolekularen Angriff von Cystein-Thiolaten auf Dha und Dhb¹²⁹. Das gebildete Enolat abstrahiert ein Proton

aus dem katalytischen Zentrum, etwa von einem Histidin, wodurch die (Me)Lan-Brückenbildung vollendet wird. Das Zn^{2+} -Ion fungiert hier als Lewis-Säure, die den pK_a des Cystein-ständigen Schwefels soweit absenkt, dass die nukleophile Addition an Dha oder Dhb möglich wird¹³⁸ (Abb. 1.8B).

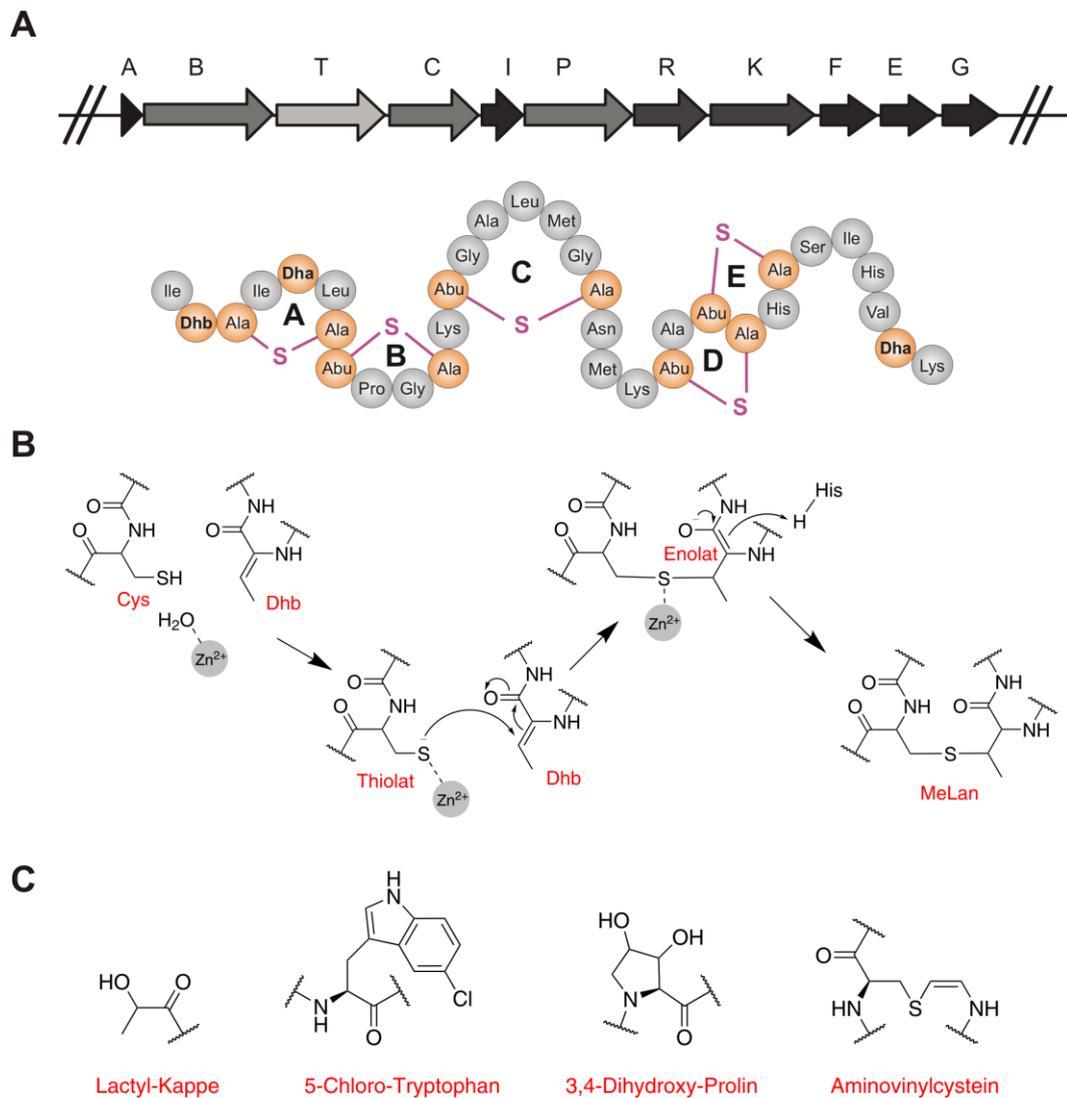


Abbildung 1.8 Lanthipeptid Klasse I und deren Biosynthese.

(A) Gencluster zur Nisin-Synthese (modifizierende Enzyme *nisB*, *nisC*, *nisP*, Vorläufer-Peptid *nisA*, Selbstimmunitätsgene *nisI*, *nisF*, *nisE*, *nisG*, Transportergen *nisT*, Regulatorgene *nisR*, *nisK*) und Modell von Nisin A. Das vollständig modifizierte Lanthipeptid ist schematisch im Kugelmodell dargestellt. Die Modifikationen sind in Orange und Magenta hervorgehoben. **(B)** Modell des Zink-abhängigen Cyclisierungsmechanismus durch NisC. **(C)** Post-translationale Modifikation an Klasse I-Lanthipeptiden, unabhängig von (Methyl-)Lanthioninbildung.

Der Synthese-Mechanismus ist directional ausgerichtet. Nach der Bindung des NisA-*leader*-Peptids durch NisB werden in N->C Direktionalität die fünf (Me)Lan Brücken nacheinander von

NisB dehydratisiert und simultan von NisC cyclisiert¹⁵⁹. Dafür bilden die beiden Synthetasen wahrscheinlich einen Komplex¹³¹. Darauf folgt die Abspaltung des modifizierten Nisin *core*-Peptids vom *leader*-Peptid durch die Serin-Protease NisP¹⁶⁰. Klasse I-Proteasen benötigen eine spezifische Erkennungssequenz im *leader*-Peptid. Bei NisP lautet diese Sequenz N-[A/G-AX₂R]-C¹⁶¹, bei anderen wie ElxP, der Protease von Epilancin 15X, lautet die Sequenz N-[D/E-L/V-X₂Q]-C¹⁶². Interessanterweise schneidet NisP nur das vollständig modifizierte Peptid, während ElxP auch das lineare Vorläufer-Peptid prozessieren kann. Die Sekretion des Peptids hängt schließlich vom ABC-Transporter NisT ab.

Unabhängig von der Lanthioninbildung sind in Klasse I-Lanthipeptiden weitere Modifikationen bekannt. Die verantwortlichen Enzyme befinden sich meist nicht innerhalb des Genclusters und erfordern nicht die Anwesenheit eines *leader*-Peptids¹⁵⁸. So zeigen die Lanthipeptide Epilancin 15X und Epicidin 280, die am N-Terminus des *core*-Peptides eine Didehydroaminosäure (Dha oder Dhb) tragen, eine teilenzymatische Umlagerung zu einer Lactyl-Endkappe¹⁶³. Nach der Abspaltung des *leader*-Peptids tautomerisiert Dha zu einem instabilen Imin, das durch nicht-enzymatische Hydrolyse zu einem Pyruvyl-Rest weiterreagiert. Dessen Reduktion durch eine Oxidoreduktase liefert die finale Lactyl-Endkappe des Peptids¹⁶⁴ (Abb. 1.8C).

Bei anderen Lanthipeptiden, wie Epidermin oder Microbisporicin (NAI-107) wird der C-Terminus durch die Bildung von Aminovinylcystein (AviCys) modifiziert. Diese Veränderung des C-Terminus bietet Schutz gegen den Abbau durch Carboxypeptidasen.¹⁶⁵ Die hierfür verantwortlichen Enzyme sind verwandt mit Enzymen der Coenzym-A-Synthese und die AviCys-Modifikation ist auch bei anderen RiPPs, wie Thioviridamid oder den Linaridinen bekannt¹⁵⁸. Das erste modifizierende Enzym LanD oxidiert das C-terminale Cystein mithilfe eines FMN-Cofaktors zum Thioaldehyd-Intermediat. Es folgt die spontane Decarboxylierung zum Thioenolat, das mithilfe einer Cyclase LanC ein benachbartes Dha zur AviCys-Ringbildung nutzt^{158,166} (Abb. 1.8C).

Beim Lanthipeptid Microbisporicin (NAI-107) findet sich außerdem eine Hydroxylierung an Prolin, sowie eine Chlorierung an Tryptophan. Eine Cytochrom P450 verwandte Hydroxylase LanO ist verantwortlich für die Prolin-Modifikation¹⁶⁵, während die Tryptophan-Halogenierung durch ein Zusammenspiel der FADH₂-abhängigen Halogenase LanH und der Flavinreduktase LanS katalysiert¹⁶⁷ wird (Abb. 1.8C).

1.5.3 Klasse II-Lanthipeptide

Cytolysine (altgr. κύτος kytos: Zelle, λύσις lysis: Auflösung) sind Toxine, die spezifisch bestimmte Arten von Zellen zerstören können. Das Bakterium *Enterococcus faecalis*, das im Darm von Säugetieren vorkommt, bildet ein Zwei-Komponenten-Cytolysin, das zur Klasse II der Lanthipeptide zählt^{168,169}. Die kleinere, 22 Aminosäuren große Komponente Cytolysin S trägt eine N-terminale MeLan-Brücke, eine C-terminale Lan-Brücke und zwei Dhb-Seitenketten. Die größere, 38 Aminosäuren große Komponente Cytolysin L dagegen trägt zusätzlich zum N-terminalen MeLan und C-terminalen Lan eine weitere zentrale Lan-Brücke, sowie eine Dha- und drei Dhb-Seitenketten^{170,171}.

Alle bekannten Zwei-Komponenten Lanthipeptide zählen zur Klasse II und werden in aller Regel von zwei verschiedenen Synthetasen modifiziert. Die Ausnahme von dieser Regel stellt das *E. faecalis*-Cytolysin dar. Beide Komponenten werden vom Enzym CylM modifiziert, das zur Familie der LanM Proteine gehört. Dabei handelt es sich um bifunktionale Enzyme, die sowohl die Dehydratase- als auch die Cyclase-Funktion übernehmen¹³⁹. Der C-Terminus der LanM Proteine zeigt Homologie zu den LanC Proteinen der Klasse I-Lanthipeptide. Der N-Terminus hingegen weist einerseits Merkmale von Lipid-Kinasen ($\alpha 10$ und $\alpha 11$ Helices) und andererseits Charakteristika von Ser/Thr-Kinasen (C- und N-terminale Regionen) auf^{158,170}. In CylM findet sich weiterhin eine KA-Domäne (Kinase Aktivierung), die katalytische Seitenketten für das aktive Zentrum enthält sowie die Ordnung der Aktivierungsschleife übernimmt.

Die Kristallstruktur von CylM (PDB ID: 5DZT) ermöglichte die Identifikation von essentiellen Seitenketten innerhalb des katalytischen Zentrums der Dehydratasedomäne^{158,170}. Das basische K274 bindet das γ -Phosphat von ATP, bringt es in Position zum Phosphoryl-Akzeptor und stabilisiert die Abgangsgruppe nach der Reaktion. Die Aktivierung der γ -Phosphat-Gruppe geschieht über D252 und H254, die das Kernstück der Kinase-typischen P-Schleife bilden. In der C-terminalen Region wirken D247 und H349 als Protonen-Akzeptoren für das Serin- oder Threonin-Nukleophil des Substrates. Für die β -Eliminierung der Phosphatgruppe vom Substrat sind ferner R506 und T512 essentiell, die in der KA-Domäne liegen. Die aktiven Zentren für Phosphorylierung und die anschließende Eliminierung überlappen also zu einem gewissen Grad^{172,173} (Abb. 1.9 B).

LanM-Enzyme benötigen ATP und Mg^{2+} -Ionen, um Serin oder Threonin für die Dehydratation zu aktivieren. Interessanterweise ist auch der Verbleib von ADP in der Bindetasche nach der Aktivierung essentiell für die β -Eliminierung der Phosphatgruppe. Der zugrundeliegende Mechanismus ist noch nicht abschließend geklärt. Möglich wäre, dass ADP bei der Bindung oder der korrekten Positionierung des phosphorylierten Substrats eine Rolle spielt oder dass es die Potentialbarriere der Aktivierungsenergie bei der Eliminierungsreaktion herabsetzt¹⁷³.

In der Cyclisierungsdomäne wird das Zn^{2+} -Ion von C875, C911 und H912 koordiniert und zeigt eine deutliche Homologie zu NisC¹⁷⁰. Das vollständig modifizierte Peptid wird bei den meisten Zwei-Komponenten-Lanthipeptiden zunächst sekretiert und dann von spezifischen Serin-Proteasen (LanP) geschnitten^{162,171,174–176}. Andere Klasse II-Lanthipeptide werden während des Exports von Cystein-Protease-Domänen im N-terminalen Bereich des Transportproteins LanT geschnitten, was zur Freisetzung des aktiven Peptids führt^{171,176–178}. Beide Prozesse benötigen, soweit bekannt, keine Cofaktoren¹⁷⁷.

Wie für Klasse I-Lanthionin-Synthetasen konnte auch für LanM-Synthetasen eine N->C Direktionalität im Synthese-Mechanismus nachgewiesen werden. Die Synthetasen LctM (Lacticin 481) und HalM1M2 (Haloduracin) binden zunächst die N-terminalen *leader*-Peptide. Nach der Bindung werden in N->C Direktionalität die (Me)Lan Brücken nacheinander dehydratisiert und simultan cyclisiert. Darauf folgt die Abspaltung des modifizierten *core*-Peptids vom *leader*-Peptid¹⁷⁹.

Ähnlich wie bei Klasse I-Lanthipeptiden sind auch für Klasse II-Lanthipeptide neben der Lanthioninbildung weitere Modifikationen bekannt. Das Cytolysin-Homolog Carnolysin enthält D-Aminosäuren, die auf ungewöhnliche Art und Weise gebildet werden. Im Gegensatz zu vielen, durch NRPS gebildeten Peptiden, ist keine Epimerase an der Modifikation beteiligt. Vielmehr wird die entsprechende Aminosäure durch die LanM-Synthetase dehydratisiert und anschließend durch eine, LanJ genannte, Reduktase diastereoselektiv hydrogeniert¹⁸⁰ (Abb. 1.9 C).

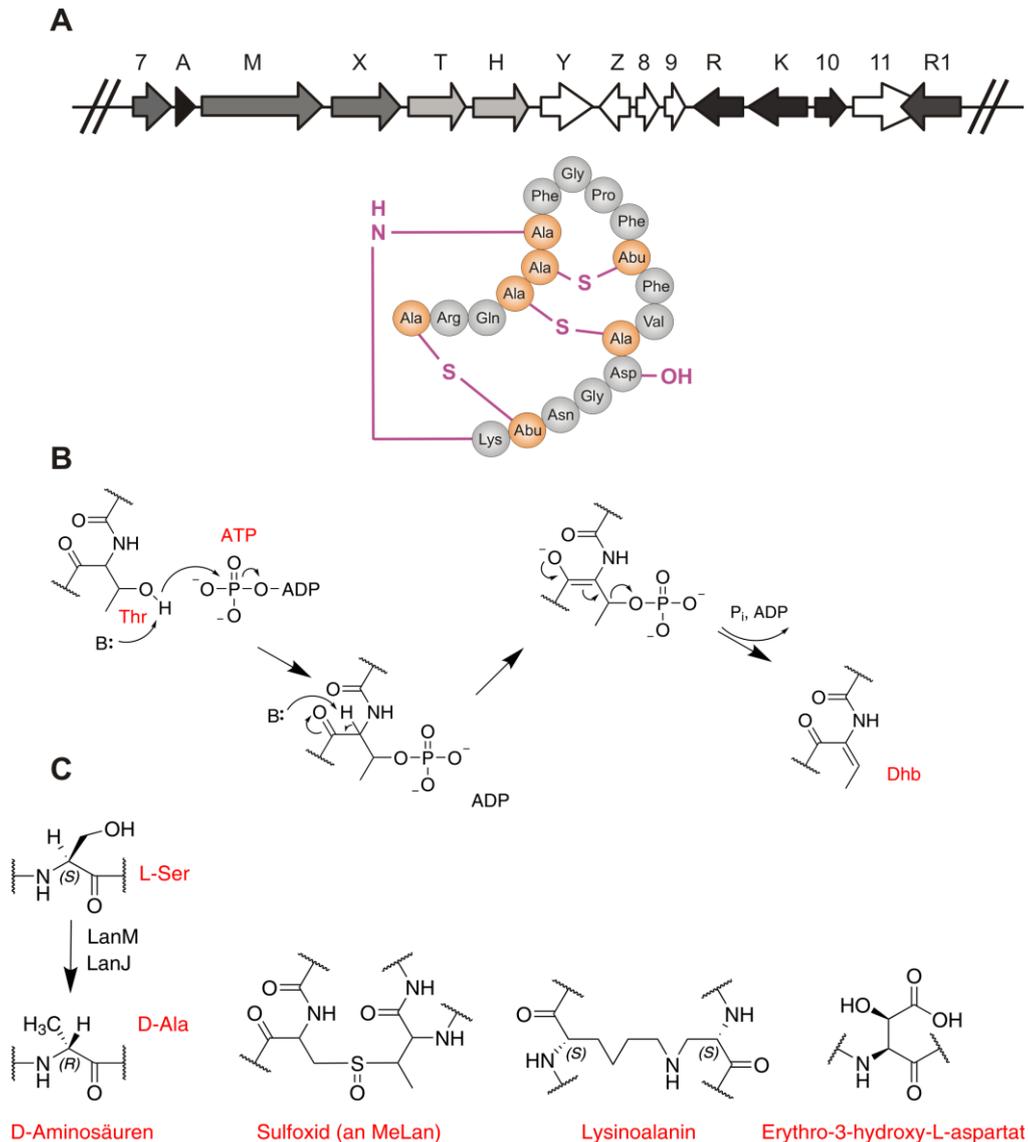


Abbildung 1.9 Lanthipeptid Klasse II und deren Biosynthese.

(A) Gencluster zur Cinnamycin Synthese (modifizierende Enzyme *cinM*, *cinX*, *cin-orf7*, Vorläufer-Peptid *cinA*, Selbstimmunitätsgene *cinR*, *cinK*, *cin-orf10*, Transportergene *cinT*, *cinH*, Regulatorgen *cinR1*). Die Funktion der Gene *cinY*, *cin-orf8*, *cin-orf9*, *cin-orf11* ist unbekannt, *cinZ* ist vermutlich eine Prolin Dipeptidase) und Modell von Cinnamycin. Das vollständig modifizierte Lanthipeptid ist schematisch im Kugelmodell dargestellt (Lys-NH-Ala: Lysinoalanin, Asp-OH: Erythro-3-hydroxy-L-aspartat). Die Modifikationen sind in Orange und Magenta hervorgehoben. **(B)** ATP-abhängige Dehydratisierung von Threonin. **(C)** Posttranslationale Modifikation an Klasse II-Lanthipeptiden unabhängig von der (Methyl-)Lanthioninbildung.

Cinnamycin ist ein 19 Aminosäuren langes Klasse II-Lanthipeptid, das zwei MeLan-Brücken und eine Lan-Brücke enthält. Außerdem ist das C-terminale Lysin mit dem Serin an Position 6 über eine Lysinoalanin-Brücke (Lal) verbunden und das Aspartat an Position 15 ist am β -Kohlenstoff hydroxyliert (Abb. 1.9A, 1.9C). Verantwortlich für diese β -Hydroxylierung ist die α -Ketoglutarat- und Eisen(II)-abhängige Hydroxylase CinX. Der Mechanismus der Lal-Brücken-

bildung ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Verschiedene *in vitro* Experimente legen nahe, dass deren Synthese von den Enzymen CinM, CinX und Cin-orf7 (auch CinN genannt) abhängt (Abb. 1.9 A). Studien des orthologen Proteins DurN aus der Duramycin-Biosynthese legen nahe, dass Lal-Brücken durch eine Aza-Michael-Addition (statt C-Nucleophile finden hier N-Nucleophile Verwendung) in Verbindung mit einem Substrat-abhängigen Mechanismus gebildet werden^{181,182}. Alternativ konnte aber auch eine spontane Cyclisierung von, von CinM und CinX modifiziertem, CinA beobachtet werden, wenn das Peptid einem pH von 9,5 ausgesetzt wurde^{158,183,184}.

Eine weitere ungewöhnliche zusätzliche Modifikation ist die Oxidation eines Melan-Thioethers zu einer Sulfoxidgruppe, wie sie im Klasse II-Lanthipeptid Actagardin beobachtet werden kann (Abb. 1.9C). Zur Katalyse dieser Reaktion wurde die Luciferase-ähnliche, Flavin-abhängige Monooxygenase GarO identifiziert^{185,186}.

1.5.4 Klasse III-Lanthipeptide

Das erste Lanthipeptid der Klasse III, das 1988 beschrieben wurde, war das Biotensid SapB, das von *Streptomyces coelicolor* produziert wird¹⁸⁷ (Abb. 1.10). Diese Bakterien wachsen in einer den Pilzen ähnlichen Hyphenform und bilden submers vegetative Myzelien. Die Bildung von Sporen als Verbreitungsvehikel erfordert eine Differenzierung einzelner Zellen in ein Luftmyzel. Damit die Hyphen die Phasengrenze überwinden können, bilden die Zellen in Abhängigkeit vom Nährstoffangebot entweder das Biotensid SapB oder Peptide der Familie der Chapline, um die Oberflächenspannung des Wassers so weit abzusenken, dass die Hyphen aus dem Medium in die Luft hineinwachsen können¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Die Struktur von SapB wurde 2004 aufgeklärt¹³⁷. Im selben Zeitraum wurden zwei weitere morphogene Lanthipeptide SapT von *S. tendae* und AmfS von *S. griseus* beschrieben^{190,191} (Abb. 1.10).

Aufgrund ihrer rein physiologischen Funktion wurde diesen Lanthipeptiden zunächst wenig Aufmerksamkeit gewidmet. Das Interesse eines breiteren Teils der wissenschaftlichen Gemeinschaft wurde geweckt durch die Beschreibung der Labyrinthopeptine, die antiviral und antiallodynisch (Allodynie, altgr. *ἄλλος* allos: anders, *ὀδύνη* odyne: Schmerz, neurologische Schmerzempfindung, die durch Reize ausgelöst wird, die grundsätzlich keinen Schmerz auslösen) wirken und somit das Potential medizinischer Anwendung bergen.

Inspiziert durch die Labyrinthopeptide wurde erstmals auch der Biosyntheseweg von Klasse III-Lanthipeptiden genauer untersucht^{8,12,192–195} und in den folgenden Jahren eine Reihe weiterer Klasse III-Lanthipeptide beschrieben^{140,141,196–200}, sodass die Charakterisierung dieser Verbindungen detaillierter wurde. Der Aufbau der Gencluster für die Biosynthese von Klasse III-Lanthipeptiden folgt zu einem großen Teil einem ähnlichen Muster (Abb. 1.10). Sie enthalten 4-5 Strukturgene innerhalb eines etwa 7-10 kbp großen Genom-Abschnitts. Meist folgt auf die Promotorregion ein Gen für die modifizierende Synthetase *lanKC*. Darauf folgen die Gene für das Vorläufer-Peptid *lanA* und für das ABC-Transportprotein *lanT*. Manche Gencluster enthalten außerdem ein Gen für einen Transkriptionsregulator *lanR* auf dem gegenläufigen Strang^{197,201}. Im Gegensatz zu Peptiden der Klassen I und II, liegen in Klasse III-Genclustern meist keine Gene für eine spezifische Peptidase zur *leader*-Abspaltung vor. Nur bei Flavipeptin und NAI-112 findet sich ein solches Gen *lanP* im Gencluster. Die Labyrinthopeptide haben eine interne Disulfidbrücke¹², im Gencluster fehlt aber, ähnlich wie bei den Klasse II-Lanthipeptiden Haloduracin α ²⁰² und Bovicin HJ50²⁰³ eine Disulfid-Isomerase, welche die Bildung der Disulfidbrücke katalysieren könnte. Bei NAI-112 ist darüber hinaus die Anordnung der Gene eine andere und es liegt zusätzlich ein Selbst-Immunitätsgen *aplH* sowie eine Glycosyltransferase *aplG* vor¹⁴⁰ (Abb. 1.10).

Klasse III-Vorläufer-Peptide haben eine Größe von etwa 3-4 kDa und bestehen aus dem N-terminalen *leader*-Peptid, das während der Reifung abgespalten wird und dem C-terminalen *core*-Peptid. Beide Abschnitte enthalten konservierte Bereiche. Im *leader*-Peptid ist eine N-terminale α -helicale Struktur konserviert, die durch ein N-[(Θ_0 xx) Θ_1 xx Θ_2 xx Θ_3 xx]-C Motiv gekennzeichnet ist (Θ : aliphatische Aminosäure I, L, V, M, selten T, x: jegliche kanonische Aminosäure). Diese α -Helix ist essentiell für die Bindung des Peptids an das modifizierende Enzym und die anschließende Prozessierung^{150,193}. Im *core*-Peptid ist das Motiv N-[SX₂S/TX₂₋₅C]-C konserviert (Abb. 1.10). Dies sind die Aminosäuren, die die (Me)Lan- oder (Me)Lab-Brücken bilden, deren relative Lage in allen bisher beschriebenen Klasse III-Lanthipeptiden konserviert ist¹⁴⁰. Lediglich Stackepeptin verfügt über eine zusätzliche, dritte Labioninbrücke¹⁴¹.

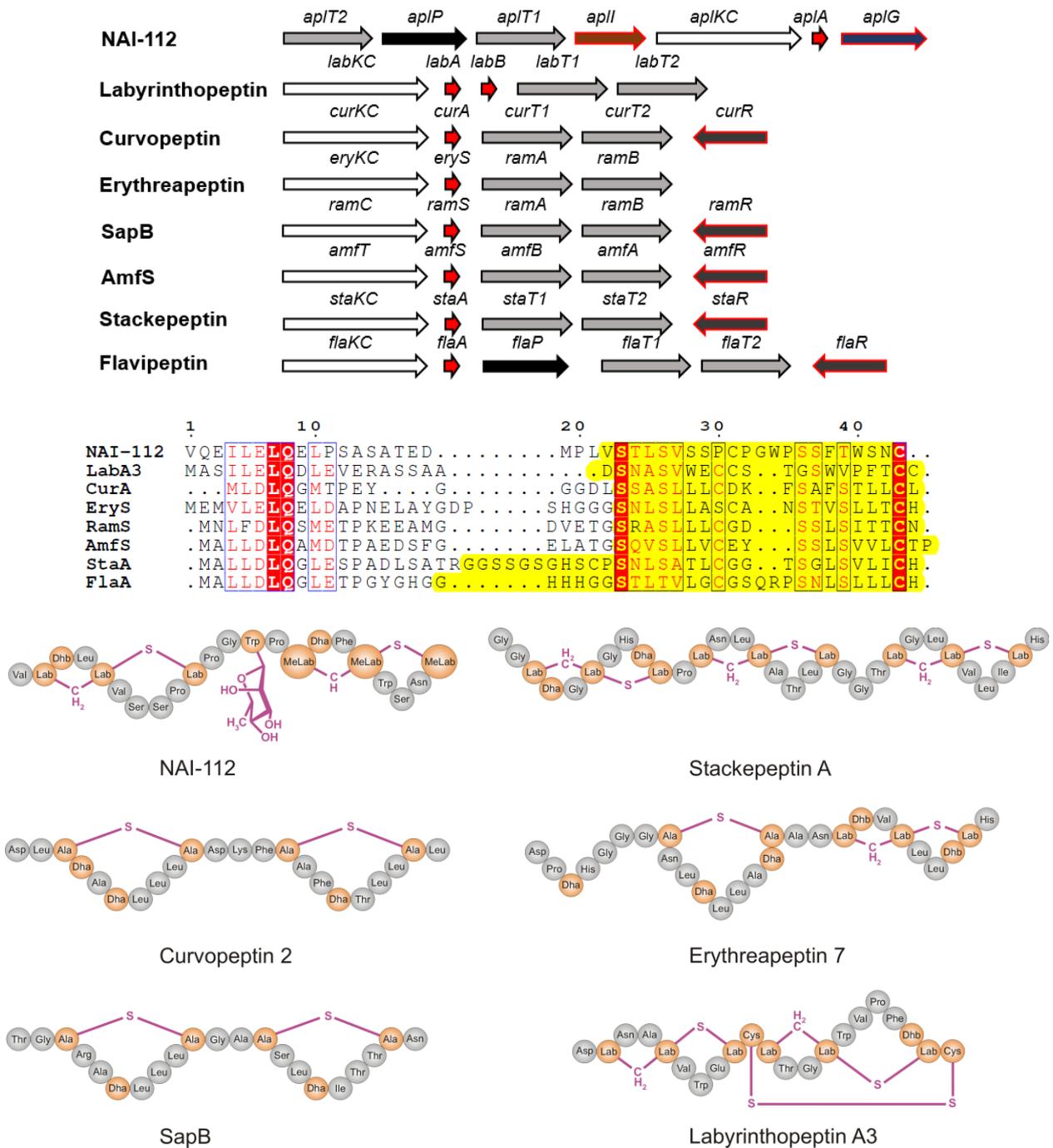


Abbildung 1.10 Lanthipeptid Klasse III und deren Biosynthese.

Schematische Darstellung einer Auswahl von Klasse III-Lanthipeptid-Genclustern, Sequenzvergleich der Vorläufer-Peptide und schematische Darstellung der modifizierten Peptide. Die Suffixe T1/T2 und I bezeichnen Transportproteine, P steht für Proteasen, KC/C/T steht für die Synthetasen (Abweichungen von KC sind historisch bedingt), A/B/S steht für die Vorläufer-Peptide (Abweichungen von A/B sind historisch bedingt), G steht für Glycosyltransferase, R steht für Regulatorprotein. Der Sequenzvergleich der Vorläufer-Peptide zeigt konservierte Bereiche in *leader*- und *core*-Peptid. Die *core*-Peptide sind in Gelb hinterlegt. In Rot sind vollständig konservierte Aminosäuren hinterlegt, in blauen Kästen sind Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften markiert. Die vollständig modifizierten Lanthipeptide sind schematisch im Kugelmodell dargestellt. Die Modifikationen sind in Gelb und Magenta hervorgehoben.

Die trifunktionalen Synthetasen der Klasse III-Lanthipeptide bestehen aus drei distinkten Domänen: einer N-terminalen pSer/pThr-Lyasedomäne, einer zentralen Ser/Thr-Kinasedomäne und einer C-terminalen Cyclasedomäne. Die Bildung von (Me)Lan und (Me)Lab durch die Synthetase LanKC geschieht in drei konsekutiven Schritten. Nach der Bindung des Vorläufer-Peptids phosphoryliert die Kinasedomäne eine Anzahl von Serin- bzw. Threonin-Seitenketten. Ein gut untersuchtes Homolog einer Klasse III-Kinasedomäne stellt die Ser/Thr-Kinase PknB (PDB ID: 1O6Y) von *Mycobacterium tuberculosis* dar²⁰⁴. Drei konservierte katalytische Zentren innerhalb des Enzyms konnten identifiziert werden. Die P-Schleife enthält eine Reihe von Gycinen, deren Rückgrat-Amide die Phosphate des Cofaktors koordinieren. Weiterhin kommt ein DFG-Motiv (N-[DFG/E]-C) vor, das essentielle Mg²⁺-Ionen koordiniert, unter anderem unter Mitwirkung von Seitenketten innerhalb des dritten Zentrum, der katalytischen Schleife, die über je ein konserviertes Asparagin und eine Asparaginsäure verfügt^{204,205}. Alle bisher untersuchten LanKC-Kinasedomänen zeigen hinsichtlich der Cofaktoren eine breite Toleranz und akzeptieren verschiedene Nukleotide als Phosphat-Donoren. Einzig die Labyrinthopeptin-Synthetase LabKC hängt spezifisch von (d)GTP ab^{133,192,202}. Die β -Eliminierung der Phosphatgruppe wird von der pSer/pThr-Lyasedomäne katalysiert. Sie zeigt eine signifikante Homologie zu SpvC (PDB ID: 2Q8Y), einer Lyase aus *Salmonella* sp., die in den MAPK-Weg eingebunden ist (s. 4.1.3.1, S. 77, Abb. 4.5 C). Im katalytischen Zentrum erfolgt die Aktivierung der pSer/pThr-Carbonyl-Funktionen und die Deprotonierung der α -Kohlenstoffe^{134,206} (Abb. 1.9 B). Die Cyclasedomäne schließlich führt die Michael-Addition durch und vollendet den Ringschluss. Der genaue Mechanismus der Reaktion bei Klasse III-Lanthipeptiden ist aufgrund des wahrscheinlich fehlenden Zn²⁺-Ions zur Zeit noch unbekannt. Es konnte gezeigt werden, dass kein ATP benötigt wird und dass das *leader*-Peptid essentiell für die Cyclisierung ist¹⁹⁶.

Die Direktionalität, mit der die Modifikationen in das *core*-Peptid eingeführt werden, verläuft bei den untersuchten Fällen vom C-Terminus zum N-Terminus und steht damit im direkten Gegensatz zu den Lanthipeptiden der Klassen I und II, deren Syntheserichtung andersherum verläuft^{159,179,194,195} (s. 1.5.2, S. 15, s. 1.5.3, S. 18).

Spezifische Proteasen kommen in den Genclustern von Klasse III-Lanthipeptiden kaum vor, im Gegensatz zu den Klassen I und II. Lediglich die Prozessierung von Flavipeptin und NAI-112 hängt von der Prolyl-Oligopeptidase (POP) FlaP¹⁹⁹ bzw. der Protease AplP ab^{140,207}. Die übrigen

Klasse III-Lanthipeptide werden vermutlich von unspezifischen Endo- und Amino-Peptidasen der jeweiligen Produzentenstämme geschnitten¹⁹⁷. Dafür spricht die Tatsache, dass von den Klasse III-Lanthipeptiden Erythreapeptin, Avermipeptin, Griseopeptin, Curvopeptin, Stackepeptin, Labyrinthopeptin und SapB jeweils mehrere Peptidformen vorliegen, die sich lediglich in der Länge der N-terminalen Überhänge unterscheiden^{12,136,141,158,197,198}. Erst kürzlich ist man, anhand der Protease ApIP von NAI-112, auf Zn²⁺-abhängige Proteasen aufmerksam geworden, die sowohl Endo- als auch Amino-Peptidasefunktion zeigen. Homologe Protease-Gene konnten in den Genomen aller bekannter Klasse III-Lanthipeptide ausfindig gemacht werden, jedoch mitunter sehr weit vom Biosynthese-Gencluster entfernt. Die Verwendung solcher zinkabhängiger, bifunktionaler Proteasen ist bisher einzigartig in den Familien der RiPPs.²⁰⁷

1.5.5 Klasse IV-Lanthipeptide

Die Lanthionin-Synthetasen der Klassen III und IV weisen dieselbe Organisation der Proteindomänen auf. Einzig die Cyclasedomäne von Klasse IV-Synthetasen zeigt, wie die NisC-ähnlichen Cyclasen der Klassen I und II, die konservierten Liganden des Zn²⁺-Ions. Dies ist bei Klasse III-Synthetasen nicht der Fall. Bisher sind lediglich zwei Klasse IV-Lanthipeptide genauer beschrieben worden. 2010 wurde das von *Streptomyces venezuelae* produzierte Venezuelin beschrieben. Die initiale Charakterisierung der Synthetase bestätigte die Funktion der Domänen durch *in vitro*-Experimente mit separat exprimierten, rekombinanten Domänen. Auch konnten einige essentielle Aminosäurefunktionen in der Lyasedomäne identifiziert werden^{134,135} (Abb. 1.12).

Kurz darauf wurde die Struktur von Venezuelin aufgeklärt und die native Produktion konnte in mehreren *Streptomyces* sp.-Stämmen nachgewiesen werden^{208,209}. Untersuchungen zur biologischen Funktion von Venezuelin blieben bisher ohne Erfolg¹³⁴. Mit Streptocollin wurde ein weiteres Klasse IV-Lanthipeptid beschrieben, das sich im *core*-Peptid von Venezuelin lediglich in vier Aminosäuren unterscheidet, während das *leader*-Peptid größere Unterschiede zeigt^{136,208} (Abb. 1.11).

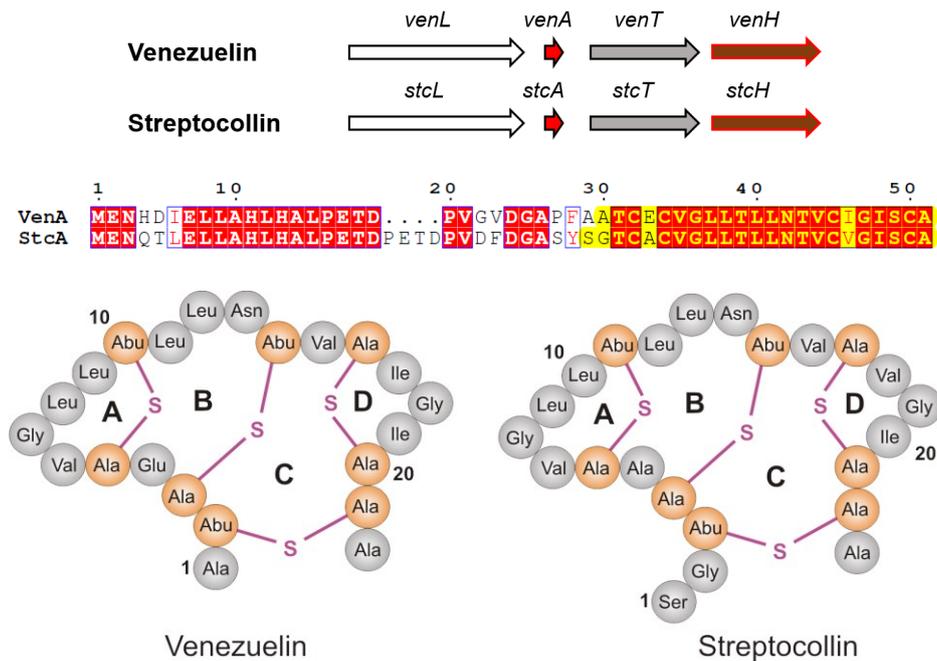


Abbildung 1.11 Lanthipeptide der Klasse IV.

Schematische Darstellung von Klasse IV-Lanthipeptid-Genclustern, Sequenzvergleich der Vorläufer-Peptide und schematische Darstellung der modifizierten Peptide. Die Gene sind nicht maßstabsgetreu dargestellt, Die Suffixe T/H bezeichnen ABC-Transporter, L steht für die Synthetasen, A steht für die Vorläufer-Peptide. Der Sequenzvergleich der Vorläufer-Peptide demonstriert eine hochgradige Homologie zwischen VenA und StcA. Die *core*-Peptide sind in Gelb hinterlegt. In Rot sind vollständig konservierte Aminosäuren hinterlegt, in blauen Kästen sind Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften markiert. Die reifen Lanthipeptide sind im schematischen Kugelmodell dargestellt, Modifikationen sind in Orange und Magenta hervorgehoben. Die Makrocyclen sind durch die Buchstaben A-D klassifiziert.

Anhand verschiedener *in vitro*-Experimente mit separat exprimierten Enzymdomänen konnte die Funktion der Venezuelin-Synthetase VenL soweit charakterisiert werden, dass sich ein Modell der Lyasefunktion postulieren ließ¹³⁵. Die initiale Bindung des Vorläufer-Peptids VenA erfolgt durch die Kinasedomäne. Dabei wird der N-terminale bis zentrale Teil des *leader*-Peptids gebunden, welcher im Sequenzabschnitt N-[HDIELLAHLHA]-C eine α -Helix-Struktur einnimmt. Eine Deletion von mehr als den ersten drei N-terminalen Aminosäuren der α -Helix führte zu einer Störung des Bindevermögens¹³⁶, welche sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass keine vollständige α -Helix mehr ausgebildet werden kann¹⁵⁰.

Nach der Phosphorylierung von Ser/Thr erfolgt die β -Eliminierung der Phosphatgruppe in der Lyasedomäne. Durch eine Mutagenesestudie konnten einige daran beteiligte, essentielle Aminosäuren identifiziert werden¹³⁵. Das Lysin K51 aktiviert den Carbonyl-Sauerstoff von pSer/pThr und unterstützt die Deprotonierung des α -Protons. Das Lysin K80 fungiert als katalytische Base, die das α -Proton abstrahiert, was zur Ausbildung des Enolats führt und die

β -Eliminierung auslöst. Das Histidin H53 fungiert als katalytische Säure, die das Brücken-Sauerstoffatom der Phosphat-Abgangsgruppe protoniert. Arginin R156 und Lysin K103 stabilisieren die Phosphatgruppe durch Wasserstoff-Brückenbindungen (Abb. 1.12). Die jeweilige Deletion der Aminosäuren W50, D137 und R149 führt zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Katalysefunktion. Der Grund dafür ist jedoch noch unklar¹³⁵. Der Nachweis des dargelegten Reaktionsmechanismus muss abschließend durch die Kristallstruktur erbracht werden.

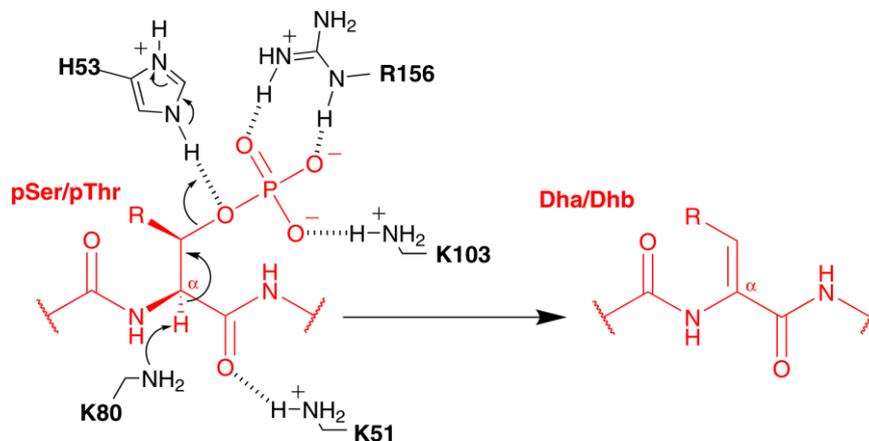


Abbildung 1.12 Putativer Mechanismus der β -Eliminierungsreaktion der VenL-Lyasedomäne.

Dargestellt ist das Mechanismusmodell unter Beteiligung essentieller Aminosäure-Seitenketten im katalytischen Zentrum der Lyasedomäne. Modifiziert nach Goto *et al.*¹³⁵.

1.6 Das Curvocidin-System

Das Curvocidin-Gencluster wurde durch *genome mining* über die online-Plattform BAGEL2²¹⁰ in *Thermomonospora curvata*, dem Produzenten des Klasse III-Lanthipeptids Curvopeptin¹⁹⁸, als Klasse IV-Lanthipeptid-Gencluster identifiziert. Weitere bioinformatische Daten wurden der online-Datenbank NCBI²¹¹ entnommen. Demnach besteht das Curvocidin-Gencluster aus fünf Genen: zwei stromabwärts gerichtete Transporterprotein-Gene *cuvT2* und *cuvT1*, zwei stromaufwärts gerichtete Vorläufer-Peptidgene *cuvA* und *cuvB*, sowie das ebenfalls stromaufwärts gerichtete Synthetase-Gen *cuvL* (Abb. 1.13A). Die Vorläufer-Peptide CuvA und CuvB verfügen über eine Sequenz-Homologie von 84% (Abb. 1.13 B) und zeigen keine der zuvor beschriebenen, in Klasse III konservierten, Bereiche in *leader*- und *core*-Peptid (s. 1.5.4,

S. 21). Auch beinhaltet das Gencluster keine Gene für Regulation, Selbstimmunität oder Proteolyse des *leader*-Peptids. Daher ist es in dieser Hinsicht vergleichbar mit den Genclustern der beschriebenen Klasse IV und einem Großteil der Klasse III-Lanthipeptide.

Der Produzentstamm *T. curvata* B9^T (DSM 43183; ATCC 19995; JCM 3096)²¹² wurde auf Festmedium inkubiert und eine Analyse des Kulturüberstands ergab drei Peptide, die mit dem Vorläufer-Peptid-Gen *cuvA* korrespondieren. Das Gen *cuvB* scheint unter den gegebenen Bedingungen still, also nicht aktiv zu sein, da keine entsprechende Peptid-Massen gefunden wurden. Die Struktur der CuvA-Peptide wurde durch HPLC-ESI-MS/MS bestimmt. Eine womöglich unspezifische N-terminale *leader*-Abspaltung führt zu Curvocidin A1 und A2. Die C-terminale Abspaltung der letzten Aminosäure Serin von Curvocidin A2 führt zu Curvocidin A3 (Abb. 1.13C). Bisher ist keine vergleichbare, spezifische C-terminale Aminosäure-Abspaltung bei Lanthipeptiden beschrieben worden.

Davon abgesehen verfügen alle Curvocidine über drei, sich jeweils überlappende MeLan-Brücken. Alle übrigen Serine bzw. Threonine zeigen keine Dehydratisierung zu Dha bzw. Dhb. Die resultierende kompakte Topologie zeugt, ähnlich wie bei Venezuelin und Streptocollin, von einer ausgeprägt globulären Struktur der aktiven Peptide. Ähnliche Strukturen sind zwar auch von Klasse II-Lanthipeptiden wie Cinnamycin¹⁸⁴ (Abb. 1.9A) oder Duramycin²¹³ bekannt, Klasse III-Lanthipeptide jedoch zeigen weitestgehend lineare Strukturen. Die Struktur der Curvocidine ist weniger komplex als die der Venezueline oder von Streptocollin. Es liegen nur drei MeLan Brücken vor (d.h. keine zusätzliche Lan-Brücke) und alle Brücken sind ineinander verschränkt. Dadurch ist die Struktur besser geeignet für eine mechanistische Charakterisierung als die übrigen Klasse IV-Lanthipeptide. Auch ist die Synthetase CuvL mit rund 93 kDa (MW 92809,9) die kleinste bekannte Klasse IV-Synthetase und dadurch besser zugänglich für kristallographische Methoden. Durch *in silico*-Untersuchungen zu CuvL konnten die ungefähren Domänengrenzen anhand von Homologie-Abgleichen (BLAST) festgelegt werden (Abb. 1.13D).

Die in diesem Abschnitt einleitend beschriebenen, experimentellen Ergebnisse sind nicht Teil dieser Dissertation und die Arbeiten daran wurden von Dipl.-Chem. Martin Jasyk in der Arbeitsgruppe Süssmuth durchgeführt.

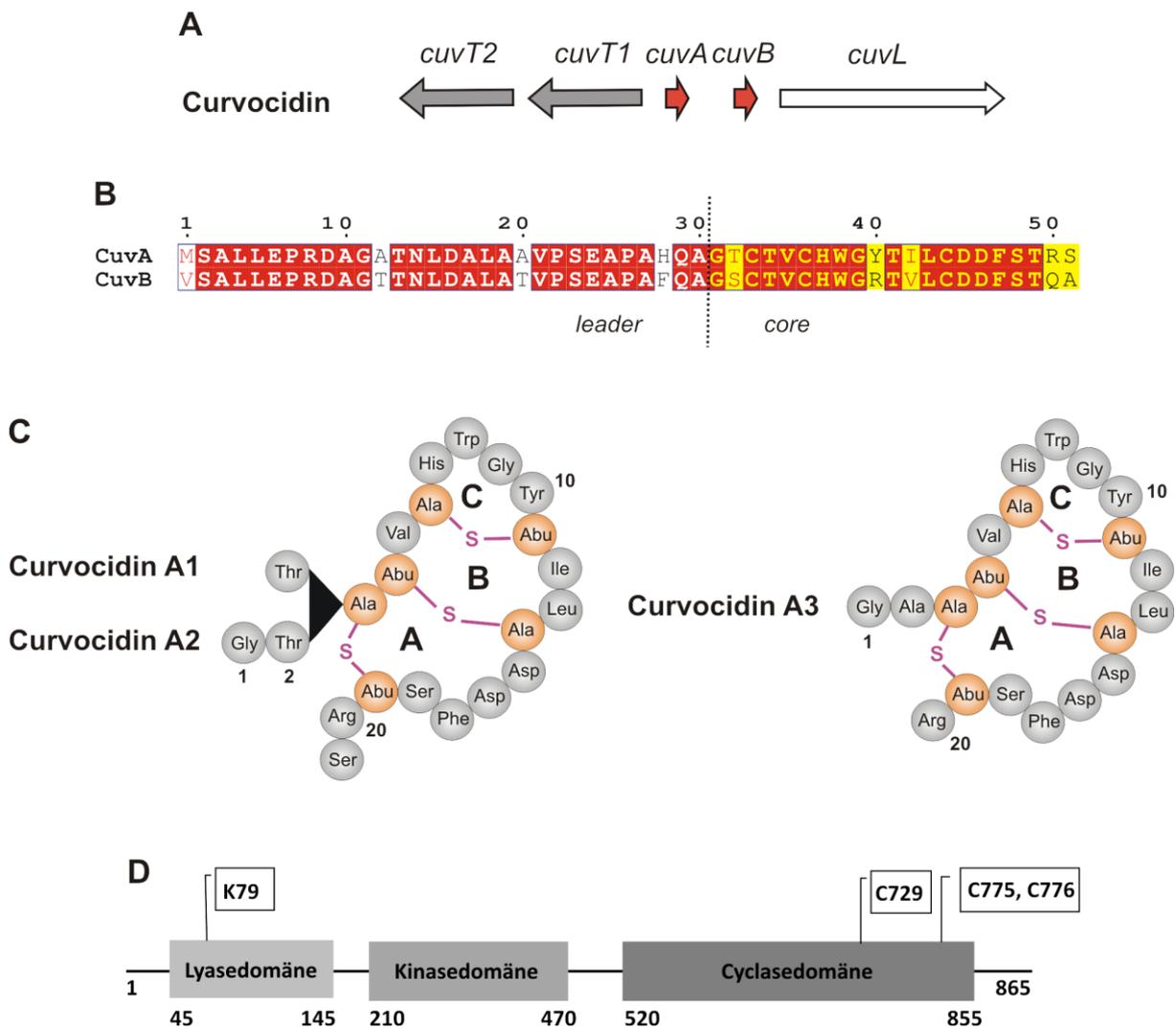


Abbildung 1.13 Schematische Darstellung des Curvocidin-Systems.

(A) Curvocidin-Gencluster, das sich von den Genclustern der anderen Klasse IV-Lanthipeptide (Abb. 1.11) unterscheidet. (B) Sequenzvergleich der beiden Vorläufer-Peptide: CuvA und CuvB unterscheiden sich lediglich in 9 von 51 Aminosäuren. Das *core*-Peptid beginnt ab Position 31 (Gelb hinterlegt). In Rot sind vollständig konservierte Aminosäuren hinterlegt, in blauen Kästen sind Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften markiert. (C) Die reifen Lanthipeptide sind im schematischen Kugelmodell dargestellt, Modifikationen sind in Orange und Magenta hervorgehoben. Die Makrocyclen sind durch die Buchstaben A-C klassifiziert. (D) Schema der CuvL-Synthetase, das die ungefähren Domänengrenzen und potentiell essentielle Aminosäuren zeigt (s. 4.1.3.1, S. 77, s. 4.1.3.3, S. 81).

2 Zielsetzung

Während die mono- und bifunktionalen Synthetasen der Klasse I- und II-Lanthipeptide weitestgehend charakterisiert sind, ist über den Mechanismus und vor allem die molekulare Struktur der trifunktionalen Synthetasen der Klassen III und IV bisher kaum etwas bekannt.

Das kürzlich identifizierte, neue Klasse IV-Lanthipeptid Curvocidin aus *T. curvata* eignet sich aufgrund seiner einfachen Struktur und seines kurzen Genclusters aus nur drei Strukturgen-Klassen in besonderem Maße als Modell zur Untersuchung von Mechanismus und Struktur der Klasse IV-Lanthipeptid-Synthetasen. Ausgehend von der Gensequenz der Synthetase CuvL soll der posttranslationale Synthese-Mechanismus *in vitro* genauer untersucht werden.

Dafür soll *cuvL* in Überexpressionsvektoren kloniert werden, um die heterologe Expression und Aufreinigung der CuvL-Synthetase zu ermöglichen. Parallel werden CuvA Vorläufer-Peptide durch SPPS oder heterologe Expression hergestellt und isoliert. Von besonderem Interesse bei den *in vitro* Analysen sind Daten zur Biosyntheserichtung, der Abhängigkeit von Metallionen, primär Zn^{2+} -Ionen in der Cyclasedomäne, zur Präferenz der Phosphat-Donor Cofaktoren, der Dauer der Umsetzung, zu Transportprozessen sowie zu Struktur-Funktions-Beziehungen. Durch gezielte Mutation, sowohl in der CuvL-Synthetase als auch im CuvA-Substrat, sollen an der Synthese beteiligte, essentielle Aminosäuren oder Sequenzbereiche identifiziert werden.

Mit Hilfe von Röntgenproteinkristallographie sollen Strukturmodelle der CuvL-Synthetase erstellt werden. Idealerweise können mehrere Kristallstrukturen in unterschiedlichen Stadien des Synthese-Mechanismus die Interaktion der einzelnen Domänen untereinander aufklären. Die besondere Herausforderung besteht darin, die CuvL-Synthetase mit ihren drei Domänen *in cis* zu kristallisieren, ein Unterfangen, das bisher noch bei keiner trifunktionale Lanthionin-Synthetase gelungen ist.

Durch Vergleiche des CuvL-Strukturmodells mit dem Strukturmodell eines CuvL-CuvA-Cokristalls ließen sich bindungsinduzierte Strukturänderungen identifizieren. Ein solcher Cokristall würde es ebenfalls ermöglichen, die Interaktion zwischen Synthetase und Substrat in den katalytischen Zentren anhand daran beteiligter Aminosäuren näher zu beschreiben.

Durch die gezielte Mutation einzelner essentieller Aminosäuren kann die Synthetase in unterschiedlichen Stadien der Katalyse eingefroren werden, wodurch die Interaktion der Domänen untereinander besser verstanden werden kann. Schließlich könnten diese Daten genutzt werden, um die Katalyse-Mechanismen anderer Klasse IV-Lanthipeptide besser nachzuvollziehen. Womöglich können auch Unterschiede zu den Synthetasen der Klasse III-Lanthipeptide, vor allem in Hinsicht auf die vermeintlich unterschiedliche Cyclase-Funktion, aufgeklärt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte, Säulen und Software

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tabelle 3.1 Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung (<i>Hersteller</i>)
Agarosegel Dokumentation	Gel Jet Imager (<i>Intas</i>), Gel System Flexi 5020 S (<i>Biostep</i>)
Autoklav	Varioklav 500 EZ-P (<i>H+P Labortechnik</i>)
CD-Spektrometer	J-815 (<i>Jasco</i>)
FPLC-System	ÄKTApurifier (<i>GE Healthcare</i>)
<i>french press</i>	SIM-AMINCO (<i>SLM Instruments</i>), CF-1 (<i>Constant Systems</i>)
Gefriertrocknung	Alpha 2-4 LD plus (<i>Christ</i>)
Homogenisatoren	EmulsiFlex B15 (<i>Avestin</i>), RiboLyser (<i>Hybaid</i>)
HPLC	UHPLC 1290 Infinity series, HPLC 1100 series (<i>Agilent Technologies</i>)
Inkubatoren	BD53 (<i>Binder</i>), 760154 (<i>Memmert</i>), Multitron II HAT (<i>Infors</i>)
Kristallisations-Screens	Digilab HoneyBee Automated Rapid Plate Preparation (<i>Zinsser Analytic</i>)
Massenspektrometer	ESI-Orbitrap-MS, Exactive (<i>Thermo Fisher Scientific</i>), ESI-LTQ-Orbitrap-MS, Orbitrap XL (<i>Thermo Fisher Scientific</i>)
Magnetrührer	MR 3000 (<i>Heidolph</i>)

Gerät	Bezeichnung (<i>Hersteller</i>)
PCR Thermocycler	T-Gradient Thermoblock (<i>Biometra</i>), Labcycler Basic, 3x21 (<i>Sensoquest</i>), C1000 Thermal Cycler (<i>Bio-Rad</i>)
pH-Meter	pH-Meter 763 (<i>Knick</i>), CyberScan pH510 (<i>Eutech Instruments</i>)
SDS-PAGE Apparatur	Mini-PROTEAN 3-System (<i>Bio-Rad</i>)
Semi-Dry Western Blot Apparatur	Trans-Blot SD semidry Transfer Cell (<i>Bio-Rad</i>)
Spannungsquellen	ST 305 (<i>Life Technologies</i>), Power Pac HC (<i>Bio-Rad</i>)
Spektrophotometer	Lambda 35 LS54 (<i>PerkinElmer</i>), UltraSpec2100 pro Classic (<i>Amersham Biosciences</i>), UltraSpec10 Cell Density Meter (<i>Amersham Biosciences</i>), NanoPhotometer P330 (<i>Implen</i>)
SpeedVac	EZ-2 (<i>Genevac</i>) Savant SPD131DDA SpeedVac Concentrator (<i>Thermo Scientific</i>), Savant RVT 4104 Refrigerated Vapor Trap (<i>Thermo Scientific</i>)
Thermoblock	Thermomixer comfort (<i>Eppendorf</i>)
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex (<i>Schalltech</i>)
Vortex Mixer	Reax top (<i>Heidolph</i>)
Waagen	XR 125SM (<i>Precisa Instruments</i>), EW6000-1M (<i>Kern</i>)
Wasser-Aufbereitung	MQ-Reference (<i>Merck Millipore</i>)
Zentrifugen	Centrifuge 5417R, Centrifuge 5415R, Centrifuge 5810R (<i>Eppendorf</i>), Avanti J-26 XP (<i>Beckman Coulter</i>)

Die in dieser Arbeit verwendeten Säulen für FPLC, HPLC und HPLC-ESI-MS sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

Tabelle 3.2 Verwendete Säulen

Säule	Hersteller
HiLoad 16/60 200 Superdex	<i>GE Healthcare</i>
HisTrap FF crude 1 ml	<i>GE Healthcare</i>
HisTrap FF crude 5 ml	<i>GE Healthcare</i>
HiTrap DEAE FF 1ml	<i>GE Healthcare</i>

Säule	Hersteller
Grom-Sil 120 ODS-5 ST, 10 µm, 250 mm x 20 mm	<i>Grace</i>
Vydac TP C4 300A, 10-15 µm, 100 mm x 20 mm	<i>Grace</i>
Vydac 218 MS C18, 5 µm, 150 mm x 2,1 mm	<i>Grace</i>
Poroshell 120 EC-C18 2,7 µm, 50 mm x 2,1 mm	<i>Agilent</i>

Die in dieser Arbeit verwendete Software, sowohl offline (*Hersteller*) als auch online (Homepage) sind in Tabelle 3.3 aufgelistet.

Tabelle 3.3 Verwendete Software

Software	Hersteller/Homepage
BLAST	NCBI ²¹¹
ChemDraw Professional 16.0	<i>CambridgeSoft</i>
Clone Manager Professional 9	<i>SciED Central</i>
ClustalW2, Clustal Omega	EMBL-EBI ^{214,215}
CoralDraw Graphic Suite X3	<i>Coral Corporation</i>
CoralDraw Graphic Suite X9	<i>Coral Corporation</i>
ESPrpt 3.0	<i>CNRS IBCP</i> ²¹⁶
OligoCalc	Biotoools.Nubic ²¹⁷
PeptideShaker	CompOmics ²¹⁸
ProtParam	Expasy ²¹⁹
PyMol	<i>Schrödinger</i>
SnapGene Viewer	<i>GSL Biotech</i>
SWISS-MODEL	Expasy ²¹⁹
Xcalibur 2.1	<i>Thermo Scientific</i>

3.1.2 Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 3.4 aufgelistet. Falls an entsprechender Stelle nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien im Reinheitsgrad $\geq 98\%$ oder p.a.-Qualität von den Firmen *Thermo Fisher*, *Merck*, *Carl Roth*, *Sigma Aldrich* oder *VWR Chemicals* bezogen.

Tabelle 3.4 Verwendete Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Acetonitril	<i>Carl Roth, Thermo Scientific</i>
Acrylamid/bis-Acrylamid (37,5:1)	<i>Carl Roth</i>
Agar-Agar	<i>Carl Roth</i>
Ameisensäure	<i>Carl Roth</i>
APS	<i>Carl Roth</i>
(d)ATP, (d)GTP, (d)CTP, dTTP, UTP	<i>Fermentas</i>
Amicon Ultra <i>Centrifuge filter units</i>	<i>Merck Millipore</i>
AMP-PNP	<i>Sigma-Aldrich</i>
BCIP	<i>Carl Roth</i>
Benzamidin	<i>Sigma-Aldrich</i>
Biotin	<i>Sigma Aldrich</i>
Bromphenolblau	<i>Carl Roth</i>
CaCl ₂	<i>Carl Roth</i>
CaCO ₃	<i>Carl Roth</i>
CuSO ₄	<i>Carl Roth</i>
Coomassie R250	<i>Carl Roth</i>
Difco Bacto Pepton	<i>Thermo Scientific</i>
Difco Hefeextrakt	<i>Thermo Scientific</i>
DNase I (Rind)	<i>Sigma-Aldrich</i>
DMF	<i>Acros Organics</i>
DMSO	<i>Carl Roth</i>
DTT	<i>Carl Roth</i>
EDTA	<i>Carl Roth</i>
Essigsäure	<i>Carl Roth</i>
Ethidiumbromid	<i>Carl Roth</i>
FeSO ₄	<i>Carl Roth</i>
D-Glucose	<i>Carl Roth</i>
Glycerin	<i>Carl Roth</i>
Guanidin-HCl	<i>Carl Roth</i>
HCl, 37%	<i>Sigma-Aldrich</i>
IAA	<i>Sigma-Aldrich</i>
L-Ile	<i>Sigma-Aldrich</i>

Produkt	Hersteller
Imidazol	<i>Sigma-Aldrich</i>
IPTG	<i>Sigma-Aldrich</i>
Isopropanol	<i>Sigma-Aldrich, Merck</i>
K ₂ HPO ₄	<i>Sigma-Aldrich</i>
KH ₂ PO ₄	<i>Sigma-Aldrich</i>
Lactose	<i>Sigma Aldrich</i>
2-log DNA Ladder	<i>NEB</i>
L-Leu	<i>Sigma Aldrich</i>
D-Lys-HCl	<i>Carl Roth</i>
Lysozym (Hühnerei)	<i>Serva</i>
β-Mercaptoethanol	<i>Carl Roth</i>
MES	<i>Carl Roth</i>
Methanol	<i>VWR</i>
MgCl ₂	<i>Carl Roth</i>
MgSO ₄	<i>Carl Roth</i>
Monoklonaler α-His Antikörper (Maus)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Natriumacetat	<i>Carl Roth</i>
NaCl	<i>Carl Roth</i>
Na ₂ HPO ₄	<i>Carl Roth</i>
NaOH	<i>Carl Roth</i>
NBT	<i>Carl Roth</i>
Ni-NTA Agarose beads	<i>Quiagen</i>
dNTP Mix	<i>Fermentas</i>
PageRuler Prestained Protein Ladder	<i>Fermentas</i>
PageRuler Unstained Protein Ladder	<i>Fermentas</i>
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	<i>Thermo Scientific</i>
L-Phe	<i>Sigma-Aldrich</i>
Phusion DNA Polymerase	<i>NEB</i>
PMSF	<i>Thermo Scientific</i>
Polyklonaler α-Maus-AP konjugierter Antikörper (Ziege)	<i>Sigma-Aldrich</i>
PVDF Membran	<i>Carl Roth</i>
PVDF-Spritzenfilter 0,22 µm, 0,45 µm	<i>Carl Roth</i>
Q5 High Fidelity DNA Polymerase	<i>NEB</i>
Restriktions-Enzyme	<i>Fermentas, NEB</i>
RNAse A	<i>Sigma-Aldrich</i>
Rotiphorese Gel 30, Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	<i>Carl Roth</i>
D-(+)-Saccharose	<i>Carl Roth</i>
SAM	<i>Carl Roth</i>
DL-SeMet	<i>Thermo Scientific</i>
SDS	<i>Carl Roth</i>

Produkt	Hersteller
T4-Ligase	<i>Fermentas, NEB</i>
Taq DNA Polymerase	<i>NEB</i>
TEMED	<i>Carl Roth</i>
TES	<i>Carl Roth</i>
Thiaminchlorid	<i>Sigma Aldrich</i>
L-Thr	<i>Sigma Aldrich</i>
Tricine	<i>Carl Roth</i>
Tris-HCl	<i>Carl Roth</i>
Trypton	<i>Carl Roth</i>
TriDye 2-Log DNA Ladder	<i>NEB</i>
Tween 80	<i>Thermo Fisher</i>
L-Val	<i>Sigma-Aldrich</i>
Vent DNA Polymerase	<i>NEB</i>
Whatman Papier 17 Chr	<i>Biometra</i>
ZnCl ₂	<i>Carl Roth</i>

3.1.3 Kits, Kristallisations-Screening-Lösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits und die Screening-Lösungen für je eine 96-Mikrotiterplatte für Kristallisations-Tests sind in Tabelle 3.5 aufgelistet.

Tabelle 3.5 Verwendete Kits und Kristallisation Screening-Lösungen

Produkt	Hersteller
GeneJET Gel Extraction Kit	<i>Thermo Scientific</i>
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	<i>Thermo Scientific</i>
Wizard Genomic DNA Purification Kit	<i>Promega</i>
In-Fusion HD-cloning Kit	<i>Clontech</i>
Macrosil™/Footprint	<i>Molecular Dimensions</i>
PEG/Ion™	<i>Hampton Research</i>
ProPlex™	<i>Molecular Dimensions</i>
MemGold™	<i>Molecular Dimensions</i>
Wizard™ Cryo	<i>Molecular Dimensions</i>
MDL Structure	<i>Molecular Dimensions</i>

Produkt	Hersteller
SaltRX™	Hampton Research
JCSG™ plus	Molecular Dimensions
Morpheus®	Molecular Dimensions
PACT™	Molecular Dimensions

3.1.4 Oligonukleotide, Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.6 aufgelistet. Bei jenen Oligonukleotiden, die für gerichtete Mutagenese (SPRINP) verwendet wurden, sind die zu mutierenden Codons unterstrichen.

Tabelle 3.6 Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' -> 3'	Beschreibung
P-017-FP	TTAACATATGGTGTCCACGCACCCGCCAC	Überexpression <i>T. curvata</i> CuvL
P-018-RP	AATTAAGCTTGGTGTGTCAGCGGGCGGTGCCTGC G	Überexpression <i>T. curvata</i> CuvL
P-042-S	GCCGACGACTCCTTCTGG	Sequenzier-primer pSD006-insert
P-043-S	TCGAAGCCGACTACTACTCC	Sequenzier-primer pSD006-insert
P-044-S	GGCGGCTCACCAAAGACG	Sequenzier-primer pSD006-insert
P-074-S	TTTGGCAGCCGCATTGGAGTCC	Sequenzier-primer pSD018-insert und Derivate
P-075-S	GTATGAGCGGCACCATTCTGG	Sequenzier-primer pSD018-insert und Derivate
P-076-S	CCTGTTAGAACATCTGCCACC	Sequenzier-primer pSD018-insert und Derivate
P-077-FP	TGGCAGTCCCGTGCATTTT <u>AA</u> AGTTGTCGTA GCGGTCGTCA	SPRINP-primer, Ziel: CuvL-A79K, pSD019

Name	Sequenz 5' -> 3'	Beschreibung
P-078-RP	TGACGACCGCTACGAACAAC <u>TTTT</u> AAAATGACAC GGAAGTGCCA	SPRINP- <i>primer</i> , Ziel: CuvL- A79K, pSD019
P-081-FP	AACCGATGCATGCCAGCTTT <u>GCT</u> CAAGGTCTTG CCGGTATTGG	SPRINP- <i>primer</i> , Ziel: CuvL- C729A, pSD021
P-082-RP	CCAATACCGGCAAGACCTTG <u>AGC</u> AAAGCTGGC ATGCATCGTT	SPRINP- <i>primer</i> , Ziel: CuvL- C729A, pSD021
P-083-FP	GTATGTATGCACTGACACAG <u>GCTGCT</u> GGCTTAG CTGGTATTGGCGA	SPRINP- <i>primer</i> , Ziel: CuvL- C775A, C776A, pSD022
P-084-RP	TCGCCAATACCAGCTAAGCC <u>AGCAGC</u> CCTGTGTC AGTGCATACATAC	SPRINP- <i>primer</i> , Ziel: CuvL- C775A, C776A, pSD022
P-085-FP	CTCCGGCTCACCAGGCTGGT <u>GCT</u> TGCACCGTTT GCCACTGGGG	SPRINP- <i>primer</i> , Ziel: CuvA-T2A, pSD024
P-086-RP	CCCCAGTGGCAAACGGTGCA <u>AGC</u> ACCAGCCTG GTGAGCCGGAG	SPRINP- <i>primer</i> , Ziel: CuvA-T2A, pSD024
P-106-FP	CTCACCAGGCTGGT <u>GCTTGC</u> GCTTTGCCACT GGGGTTACAC	SPRINP- <i>primer</i> , Ziel: CuvA-T2A,T4A, pSD025
P-107-RP	GTGTAACCCCAGTGGCAAAC <u>AGCGCA</u> AGCACC AGCCTGGTGAG	SPRINP- <i>primer</i> , Ziel: CuvA-T2A,T4A, pSD025
P-089-FP	CCGTTTGCCACTGGGGTTAC <u>GCT</u> ATCCTGTGCG ACGACTTCTC	SPRINP- <i>primer</i> , Ziel: CuvA-T2A,T11A, pSD026
P-090-RP	GAGAAGTCGTCGCACAGGAT <u>AGCG</u> TAAACCCCA GTGGCAAACGG	SPRINP- <i>primer</i> , Ziel: CuvA-T2A,T11A, pSD026
P-091-FP	TCCTGTGCGACGACTTCTCT <u>GCT</u> CGTTCTTAAAA GCTTGCGGC	SPRINP- <i>primer</i> , Ziel: CuvA-T2A,T19A, pSD027
P-092-RP	GCCGCAAGCTTTTAAGAACG <u>AGC</u> AGAGAAGTC GTCGCACAGGA	SPRINP- <i>primer</i> , Ziel: CuvA-T2A,T19A, pSD027
P-093-FP	CTCCGGCTCACCAGGCTGGT <u>TCC</u> TGCACCGTTT GCCACTGGGG	SPRINP- <i>primer</i> , Ziel: CuvA-T2S, pSD028
P-094-RP	CCCCAGTGGCAAACGGTGCA <u>AGGA</u> ACCAGCCTG GTGAGCCGGAG	SPRINP- <i>primer</i> , Ziel: CuvA-T2S, pSD028

Name	Sequenz 5' -> 3'	Beschreibung
P-108-FP	CTCACCAGGCTGGT <u>TCCTGCTCCG</u> TTTGCCACTG GGGTTACAC	SPRINP- <i>primer</i> , Ziel: CuvA-T2S, T4S pSD029
P-109-RP	GTGTAACCCCAGTGGCAAAC <u>GGAGCAGGA</u> ACC AGCCTGGTGAG	SPRINP- <i>primer</i> , Ziel: CuvA-T2S, T4S pSD029
P-097-FP	CCGTTTGCCACTGGGGT <u>TACTCC</u> ATCCTGTGCG ACGACTTCTC	SPRINP- <i>primer</i> , Ziel: CuvA-T2S, T4S, T11S pSD030
P-098-RP	GAGAAGTCGTCGCACAGGAT <u>GGAG</u> TAACCCCA GTGGCAAACGG	SPRINP- <i>primer</i> , Ziel: CuvA-T2S, T4S, T11S pSD030
P-099-FP	TCCTGTGCGACGACTTCTCT <u>CCCG</u> TTCTTAAAA GCTTGCGGC	SPRINP- <i>primer</i> , Ziel: CuvA-T2S, T4S, T11S, T19S pSD031
P-100-RP	GCCGCAAGCTTTTAAGAAC <u>GGGA</u> GAGAGAAGTC GTCGCACAGGA	SPRINP- <i>primer</i> , Ziel: CuvA-T2S, T4S, T11S, T19S pSD031

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 3.7 aufgelistet.

Tabelle 3.7 Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Hersteller
pET28a(+)-TEV	T 7-Expressionsvektor mit N-terminalem Hexahistidin-tag, der durch TEV-Schnittstelle vom <i>insert</i> getrennt ist, Kanamycin-Resistenz-Kassette	Novagen, Merck KG
pG-KJE8	Vektor zur Coexpression bei heterologer Proteinexpression, codiert Chaperone DnaK, DnaJ, GrpE, GroES, GroEL, Induktion: L-Arabinose, Tetracyclin, Chloramphenicol-Resistenz-Kassette	Takara Bio (Cat. #3340)
pGro7	Vektor zur Coexpression bei heterologer Proteinexpression, codiert Chaperone GroES, GroEL, Induktion: L-Arabinose, Chloramphenicol-Resistenz-Kassette	Takara Bio (Cat. #3340)
pG-Tf2	Vektor zur Coexpression bei heterologer Proteinexpression, codiert Chaperone GroES, GroEL, TF, Induktion: Tetracyclin, Chloramphenicol-Resistenz-Kassette	Takara Bio (Cat. #3340)

Plasmid	Eigenschaften	Hersteller
pKJE7	Vektor zur Coexpression bei heterologer Proteinexpression, codiert Chaperone DnaK, DnaJ, GrpE, Induktion: <i>L</i> -Arabinose, Chloramphenicol-Resistenz-Kassette	Takara Bio (Cat. #3340)
pTF16	Vektor zur Coexpression bei heterologer Proteinexpression, codiert Chaperon TF, Induktion: <i>L</i> -Arabinose, Chloramphenicol-Resistenz-Kassette	Takara Bio (Cat. #3340)

Die im Zuge der vorliegenden Arbeit konstruierten Vektoren sind in Tabelle 3.8 aufgelistet.

Tabelle 3.8 Konstruierte Vektoren

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pSD006	<i>cuvL</i> aus <i>T. curvata</i> in pET28a(+)TEV, über <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i>	<i>Diese Arbeit</i>
pSD018	Synthetisches <i>cuvL</i> -K79A in pET28a(+)TEV, über <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i>	<i>ProteoGenix, Diese Arbeit</i>
pSD019	<i>cuvL</i> , Zielgerichtete Mutation A79K in pSD018	<i>Diese Arbeit</i>
pSD021	<i>cuvL</i> -C729A, Zielgerichtete Mutation C729A in pSD019	<i>Diese Arbeit</i>
pSD022	<i>cuvL</i> -C775A, C776A, Zielgerichtete Mutation C775A, C776A in pSD019	<i>Diese Arbeit</i>
pSD2122	<i>cuvL</i> -C729A, C775A, C776A, Zielgerichtete Mutation C729A in pSD022	<i>Diese Arbeit</i>
pSD023	Synthetisches <i>cuvA</i> in pET28a(+)TEV, über <i>NdeI</i> und <i>HindIII</i>	<i>Integrated DNA Technologies, Diese Arbeit</i>
pSD024	<i>cuvA</i> -T2A, Zielgerichtete Mutation T2A in pSD023	<i>Diese Arbeit</i>
pSD025	<i>cuvA</i> -T2A, T4A Zielgerichtete Mutation T4A in pSD024	<i>Diese Arbeit</i>
pSD026	<i>cuvA</i> -T2A, T11A Zielgerichtete Mutation T11A in pSD024	<i>Diese Arbeit</i>
pSD027	<i>cuvA</i> -T2A, T19A Zielgerichtete Mutation T19A in pSD024	<i>Diese Arbeit</i>

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pSD028	<i>cuvA</i> -T2S, Zielgerichtete Mutation T2S in pSD023	<i>Diese Arbeit</i>
pSD029	<i>cuvA</i> -T2S, T4S Zielgerichtete Mutation T4S in pSD028	<i>Diese Arbeit</i>
pSD030	<i>cuvA</i> -T2S, T4S, T11S Zielgerichtete Mutation T11S in pSD029	<i>Diese Arbeit</i>
pSD031	<i>cuvA</i> -T2S, T4S, T11S, T19S Zielgerichtete Mutation T19S in pSD030	<i>Diese Arbeit</i>

3.1.5 Mikroorganismen, Kulturmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen sind in Tabelle 3.9 aufgelistet.

Tabelle 3.9 Verwendete Mikroorganismen

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F- Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ^- <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	<i>Invitrogen (Life Technologies)</i>
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (r _B ⁻ , m _B ⁺) <i>gal dcm</i> (DE3)	<i>Invitrogen (Life Technologies)</i>
<i>E. coli</i> BL21gold(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ , m _B ⁺) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA Hte</i>	<i>Stratagene (Agilent)</i>
<i>E. coli</i> Arctic Express	B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA Hte</i> [<i>cpn10 cpn60 Gent</i> ^r]	<i>Agilent</i>

Die in dieser Arbeit verwendeten Kulturmedien und ihre Zusammensetzung sind in Tabelle 3.10 aufgelistet. Falls an entsprechender Stelle nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und andere Bestandteile von den Firmen *Thermo Fisher*, *Merck*, *Carl Roth*, *Sigma Aldrich* oder *VWR Chemicals* bezogen.

Tabelle 3.10 Verwendete Kulturmedien

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium (<i>lysogeny broth</i>)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 L dH ₂ O
LB-Agar	10 g Trypton 15 g Agar 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 L dH ₂ O
2xYT-Medium	16 g Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 L dH ₂ O
SB-Medium (<i>super broth</i>)	32 g Trypton 20 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1 L dH ₂ O
TB-Medium (<i>terrific broth</i>)	20 g Trypton 24 g Hefeextrakt 4 g Glycerin 100 mL Phosphatpuffer (0,17 M KH ₂ PO ₄ , 0,72 M K ₂ HPO ₄) ad 1 L dH ₂ O

Medium	Zusammensetzung
M9-Minimalmedium zur Expression SeMet-markierter Proteine	10 mL Spurenelemente (100x) 1 mL MgSO ₄ (1 M) 300 µL CaCl ₂ (1 M) 100 mL M9-Salze (10x) 10 mL Glucose (20 % w/v) 1,5 mL Thiaminchlorid (0,1 % w/v) 1,5 mL Biotin (0,1 % w/v) 2 mL NH ₄ Cl Je 100 mg L-Lys-HCl, L-Thr, L-Phe Je 50 mg L-Leu, L-Ile, L-Val, DL-SeMet ad 1 L ddH ₂ O

3.1.6 Lösungen, Puffer, Antibiotika

Die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer und ihre Zusammensetzung sind in Tabelle 3.11 aufgelistet.

Tabelle 3.11 Verwendete Lösungen und Puffer.

Medium	Zusammensetzung
Spurenelemente (100x) pH 7,2-7,3	2,5 g EDTA 250 mg FeSO ₄ 25 mg ZnCl ₂ 5 g CuSO ₄
M9-Salze pH 7,5-7,7	64 g Na ₂ HPO ₄ 20 g KH ₂ PO ₄ 5 g NaCl

Medium	Zusammensetzung	
5052 Autoinduktionslösung (50x)	2,5 % w/v	D-Glucose
	10 % w/v	Lactose
	25 % v/v	Glycerin
Agarose-Gelelektrophorese 10x Ladepuffer pH 8	0,2 % w/v	SDS
	0,15 % w/v	Bromphenolblau
	50 % w/v	Saccharose
	1,5 mM	EDTA
	15 mM	Tris-HCl
Agarose-Gelelektrophorese 50x TAE-Laufpuffer	242 g	Tris-HCl
	57,1 mL	Essigsäure
	100 mL	EDTA (0,5 M)
	ad 1 L	dH ₂ O
SDS-PAGE 5x Ladepuffer pH 6,8-7	250 mM	Tris-HCl
	8 % w/v	SDS
	35 % w/v	Glycerin
	0,04 % w/v	Bromphenolblau
	0,1 M	DTT
SDS-PAGE Färbelösung	25 % v/v	Methanol
	10 % v/v	Essigsäure
	0,1 % w/v	Coomassie R250
SDS-PAGE Entfärbelösung	25 % v/v	Methanol
	10 % v/v	Essigsäure
SDS-PAGE 10x Laufpuffer	250 mM	Tris-HCl
	1,9 M	Glycin
	35 mM	SDS

Medium	Zusammensetzung	
SDS-PAGE Sammelgel-Puffer pH 8,8	1,5 M	Tris-HCl
SDS-PAGE Trenngel-Puffer pH 6,8	0,25 M	Tris-HCl
Chemisch kompetente Zellen Waschpuffer A	0,1 M	MgCl ₂
Chemisch kompetente Zellen Waschpuffer B	0,1 M	CaCl ₂
Chemisch kompetente Zellen Lagerpuffer	0,1 M	CaCl ₂
	15 % w/v	Glycerin
Plasmidisolierung alkalische Lyse P1-Puffer pH 8	25 mM	Tris-HCl
	50 mM	Glucose
	10 mM	EDTA
	0,1 mg/mL	RNAse A
Plasmidisolierung alkalische Lyse P2-Puffer	200 mM	NaOH
	1 % w/v	SDS
Plasmidisolierung alkalische Lyse P3-Puffer pH 5,2	3 M	Natriumacetat
Plasmidisolierung alkalische Lyse TE-Puffer pH 8	10 mM	Tris-HCl
	1 mM	EDTA

Medium	Zusammensetzung	
Proteinaufreinigung	50 mM	Tris-HCl
Lysepuffer	300 mM	NaCl
pH 8	10 mM	Imidazol
	10 µM	MgCl ₂
	1 mM	Benzamidin
	1 mM	PMSF
	10 µg/mL	DNase I
	250 µg/mL	Lysozym
Proteinaufreinigung	50 mM	Tris-HCl
Washpuffer	300 mM	NaCl
pH 8	20mM	Imidazol
Proteinaufreinigung	50 mM	Tris-HCl
Elutionspuffer	300 mM	NaCl
pH 8	250 mM	Imidazol
Peptidaufreinigung (<i>inclusion body cracker</i>)	20 mM	NaH ₂ PO ₄
Lysepuffer	500 mM	NaCl
pH 8	500 µM	Imidazol
	20 % w/v	Glycerin
	1 mM	Benzamidine
	10 µM	MgCl ₂
	10 µg/mL	DNase I
Peptidaufreinigung (<i>inclusion body cracker</i>)	20 mM	NaH ₂ PO ₄
Waschpuffer	500 mM	NaCl
pH 8	10 mM	Imidazol
	6 M	Guanidin-HCl

Medium	Zusammensetzung	
Peptidaufreinigung (<i>inclusion body cracker</i>) Elutionspuffer pH 8	20 mM	NaH ₂ PO ₄
	500 mM	NaCl
	500 mM	Imidazol
	4 M	Guanidin-HCl
SEC-Puffer pH 8	20 mM	Tris-HCl
	150 mM	NaCl
	10 % v/v	Glycerin
	500 µM	DTT
DEAE-IEX Waschpuffer pH 7,5	20 mM	Tris-HCl
	500 µM	DTT
DEAE-IEX Elutionspuffer pH 7,5	20 mM	Tris-HCl
	500 µM	DTT
	1 M	NaCl
Western Blot Transferpuffer pH 8,3	25 mM	Tris-HCl
	190 mM	Glycin
	20 % v/v	Methanol
Western Blot TBS-Puffer pH 7,4	50 mM	Tris-HCl
	200 mM	NaCl
Western Blot TBS-Tween-Puffer pH 7,4	50 mM	Tris-HCl
	200 mM	NaCl
	0,1 % v/v	Tween 80
Western Blot AP-Puffer pH 9,5	100 mM	Tris-HCl
	100 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂

Medium	Zusammensetzung
Western Blot	15 mL AP-Puffer
Detektions-Lösung	300 μ L BCIP (10 mg/mL in DMF)
	135 μ L NBT (50 mg/mL in 70% v/v DMF)

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika sind in Tabelle 3.12 aufgelistet.

Tabelle 3.12 Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration/Lösemittel, <i>Hersteller</i>
Kanamycin	50 μ g/mL/H ₂ O, <i>Carl Roth</i>
Chloramphenicol	34 μ g/mL/EtOH, <i>Carl Roth</i>

3.2 Methoden

3.2.1 Mikrobiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung

Kulturen zur Extraktion von Plasmid-DNA wurden in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 18°C oder 37°C wachsen gelassen. Die Ernte erfolgte am folgenden Tag durch Zentrifugation bei 10.000x g.

Für Kulturen zur Expression von Proteinen oder Peptiden wurde eine Vorkultur in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 18°C wachsen gelassen. Am folgenden Tag wurde die OD₆₀₀ gemessen und eine weitere Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,01 angeimpft. Diese Vorkultur wurde bei 37°C wachsen gelassen, bis sie eine OD₆₀₀ von 1,6-1,8 erreicht hatte. Mit dieser Kultur wurden die Hauptkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,03 angeimpft. Für eine Induktion mit IPTG wurde das Wachstum verfolgt bis eine OD₆₀₀ von 0,6-0,8 erreicht war, dann wurde IPTG zugegeben und die Kultur für 18 Stunden bei 18°C inkubiert. Für eine Induktion mit Autoinduktionslösung wurde diese direkt beim Animpfen der Hauptkultur zugegeben und die Kultur für zwei Stunden bei 37°C und anschließend für 18 Stunden bei 18°C inkubiert. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation bei 5.000x g. Alle Kulturen einer Expressions-Charge wurden in identischem Medium durchgeführt.

Für Kulturen zur Expression von SeMet-markiertem CuvL wurde Minimalmedium verwendet. Eine Vorkultur wurde in Minimalmedium mit den entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 18°C wachsen gelassen. Am folgenden Tag wurde die OD₆₀₀ gemessen und eine weitere Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft. Diese Vorkultur wurde bei 37°C wachsen gelassen, bis sie eine OD₆₀₀ von 1,5 erreicht hatte. Mit dieser Kultur wurden die Hauptkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft. Die Hauptkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 wachsen gelassen und 15 min vor der Induktion wurden Aminosäuren in Feststoffform zugegeben (je 50 mg/500 mL Lys, Thr, Phe und je 25 mg/500 mL Ile, Leu, Val, SeMet). Für die Induktion wurde IPTG zugegeben und die Kultur für 18 Stunden bei 18°C inkubiert. Die Ernte erfolgte durch Zentrifugation bei 5.000x g.

3.2.1.2 Cryo-Konservierung

Bakterienstämme wurden zur längeren Lagerung bei -80°C eingefroren. Dafür wurden 2 mL Kulturröhrchen verwendet. Diese wurden zuvor mit 600 μL 50 % (w/v) Glycerinlösung befüllt und autoklaviert. Von dem einzulagernden Stamm wurde eine 10 mL LB-Kultur angeimpft und über Nacht bei 18°C schüttelnd inkubiert. Von dieser Kultur wurden 375 μL mit der Glycerinlösung gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.1.3 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde ein modifiziertes Protokoll nach Hanahan²²⁰ verwendet. Dafür wurde eine 100 mL LB-Kultur mit einer frischen Kolonie von einer Agarplatte angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,6-0,8 wachsen gelassen. Die Kultur wurde auf zwei 50 mL Gefäße aufgeteilt und bei 4°C für 10 min bei 4.000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in je 30 mL Waschpuffer A resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation unter den beschriebenen Bedingungen. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden dann in je 30 mL Waschpuffer B resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in insgesamt 3 mL Lagerpuffer resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden zu je 100 μL aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Da bei der Kultivierung kein Antibiotikum zugegeben werden kann, wurde besonders auf sterile Arbeitstechnik geachtet. Außerdem wurde stets auf Eis gearbeitet, um die Kompetenz der Zellen zu maximieren.

3.2.1.4 Transformation

Zur Transformation wurden 100 μL kompetenter Zellen mit 1 μL reinem Plasmid oder mit 20 μL Ligationsansatz versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock folgte für 2 min bei 42°C im Thermoblock. Die Zellen wurden anschließend für 5 min auf Eis abgekühlt und dann mit 1 mL LB-Medium versetzt. Der Transformationsansatz wurde für eine Stunde bei 37°C und 600 rpm im Thermoblock inkubiert, für zehn Minuten bei 4.000x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 100 μL LB-Medium resuspendiert und auf einer Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Bei Retransformationen von

Plasmiden wurden lediglich 200 μ L des Transformationsansatzes direkt nach der Inkubation, ohne Zentrifugation, ausplattiert.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Heterologe Expression und Aufreinigung von Proteinen

Zur Expression heterologer Proteine wurden typischerweise 4 L Hauptkultur angesetzt, untergeteilt in je 500 mL in 2,5 L Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Sobald die Vorkultur eine OD_{600} von 1,6–1,8 erreicht hatte, wurden 10 mL Vorkultur und 10 mL 50x 5052 Autoinduktionsmedium zu 500 mL vorgewärmtem 2xYT-Medium mit Antibiotikum zugegeben und für 1h bei 37°C und 160 rpm inkubiert. Dann wurde die Temperatur auf 18°C gesenkt und für 18h weiter inkubiert. Zur SeMet-Markierung von Proteinen wurden die exprimierenden Zellen statt in 2xYT-Medium in M9-Minimalmedium kultiviert (s. 3.2.1.1, S. 51). Anschließend wurden die Zellen bei 4°C, 5.000x g für 30 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Aufschluss der Zellen wurden pro Charge 40 g Zellen in 400 mL Lysepuffer resuspendiert und bei einem Druck von 15 kPsi in der *french press* aufgeschlossen. Zelldebris wurde bei 4°C, 50.000x g für 30 min durch Zentrifugation abgeschieden. Der Überstand wurde für 30 min auf Eis inkubiert, um durch die Aktivität der DNase die Viskosität der Lösung zu verringern. Daraufhin wurde an der FPLC eine Affinitätschromatographie (NiNTA IMAC) mit einem Stufen-Gradienten durchgeführt, um die His₆-fusionierten Proteine aufzureinigen. Die Fraktion, die das stärkste UV/VIS-Signal bei $\lambda=280$ nm aufwies, wurden vereinigt und mit einem Amicon-Zentrifugenfilter (MWCO 50.000) auf 1 mL ankonzentriert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration gemessen, mit Waschpuffer auf 40 mL aufgefüllt und TEV-Protease im Verhältnis 1:20 dazugegeben. Die Abspaltung des His₆-tags erfolgte für 18h bei 4°C. Daraufhin wurde eine erneute FPLC (NiNTA IMAC) durchgeführt, wobei der Durchfluss gesammelt wurde. Dieser wurde mit einem Amicon Zentrifugenfilter (MWCO 50.000) auf 1,5-2 mL ankonzentriert und der FPLC-Gelfiltration (SEC) zugeführt. Die Fraktion mit dem stärksten UV/VIS-Signal bei $\lambda=280$ nm wurden vereinigt, mit einem Amicon Zentrifugenfilter (MWCO 50.000) auf 1-2 mL ankonzentriert und die Proteinkonzentration gemessen. Zur Lagerung wurden die Proteinlösungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Kristallisationsproben wurden maximal einmal eingefroren, um Degradation durch Scherkräfte zu minimieren.

3.2.2.2 Kristallisation

Für das Screening von Kristallisationsbedingungen wurde zunächst eine Masterlösung aus Protein, AMP-PNP und *leader*-Peptid angesetzt. Von dieser Masterlösung wurde zudem eine 1:2-Verdünnung hergestellt. Mit beiden Konzentrationen wurden 96-*well*-Mikrotiterplatten für die Testierung der Bedingungen angesetzt. Dafür wurde ein HoneyBee-Pipettier-Roboter genutzt, der zum einen das Reservoir mit 80 μ L Screening-Lösung füllte und zum anderen pro Bedingung die zwei Proteinkonzentrationen als sitzende Tropfen auf die Platte aufbrachte. Dabei wurde die Proteinlösung im Verhältnis 1:2 mit der Testierungslösung gemischt, sodass ein Tropfenvolumen von 1 μ L entstand. Die Entstehung von Kristallen in den Tropfen wurde mit einem Binokular in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Die Vermessung der Kristalle geschah am BESSY II Synchrotron in Berlin oder am DESY Synchrotron in Hamburg durch die Kooperationspartner der Arbeitsgruppe Dobbek der HU Berlin (Dr. Berta Martins). Auch die Modellierung anhand der Elektronendichtekarte wurde durch Kooperationspartner durchgeführt (Dr. Berta Martins, AG Dobbek, Benjamin Röhl, AG Süssmuth).

3.2.2.3 Expression und Aufreinigung heterologer Peptide

Zur Expression der heterologen Peptide wurden typischerweise 4 L Hauptkultur angesetzt, untergeteilt in je 500 mL in 2,5 L Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Sobald die Vorkultur eine OD_{600} von 1,6-1,8 erreicht hatte, wurden die Hauptkulturen auf eine OD_{600} von 0,01 angeimpft. Bei einer OD_{600} von 0,6-0,8 wurde mit 0,5 mM oder 1 mM IPTG die Expression induziert. Die Kulturen wurden für 5h bei 37°C und 160 rpm inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen bei 4°C, 5.000x g für 30 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Pro Charge wurden 16 g Zellen in 160 mL Lysepuffer resuspendiert. Die Zellen wurden im Homogenisator aufgeschlossen und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert, um durch die Aktivität der DNase die Viskosität der Lösung zu verringern. Die *inclusion bodies* wurden durch Zentrifugation bei 10.000x g für 30 min bei 4°C sedimentiert, der Überstand verworfen und in 80 mL Waschpuffer resuspendiert. Die Lösung wurde im Anschluss für 30 min im

Ultraschallbad inkubiert und danach bei 50.000x g bei 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch PVDF-Filtereinheiten mit der Porengröße 0,45 µm filtriert und die Peptide durch Affinitätschromatographie (NiNTA IMAC) mit linearem Gradienten an der FPLC aufgereinigt. Die Fraktionen, die bei 33% Elutionspuffer das stärkste UV/VIS-Signal bei $\lambda=280$ nm aufwiesen, wurden vereinigt und mit einem Amicon Zentrifugenfilter (MWCO 3.000) auf 1 mL ankonzentriert. Das Konzentrat wurde an der präparativen HPLC mit einer C4-Säule weiter aufgereinigt. Die Fraktionen des prominenten *peaks* bei $\lambda=280$ nm und $\lambda=215$ nm wurden zum einen per HPLC-ESI-MS auf die Reinheit der Peptide untersucht und zum anderen mit einem SpeedVac-Vakuum-Konzentrator getrocknet. Die Fraktionen mit der besten Reinheit wurden vor der Verwendung im Experiment in 20 mM Tricin-Puffer pH 8 gelöst und vereinigt.

3.2.2.4 Konzentrationsmessung von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden dreimal 1:10 verdünnt und an einem UV-VIS-Spektralphotometer gegen eine Negativ-Kontrolle vermessen. Die Ergebnisse bei $\lambda=280$ nm wurden gemittelt und die Konzentration mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ermittelt. Die erforderlichen Parameter wurden durch Eingabe der Proteinsequenz in die Internet Plattform ProtParam²¹⁹ erhalten. Durch die Aufnahme von Absorptionsspektren konnte durch den Quotient der Wellenlängen $\lambda=260$ nm und $\lambda=280$ nm (A_{260}/A_{280}) außerdem der Grad der Verunreinigung der Proben mit Nukleinsäuren kontrolliert werden (s. 3.2.2.15, S. 60).

3.2.2.5 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Für die Visualisierung von Proteinen und Proteinverunreinigungen wurde die SDS-PAGE, modifiziert nach Laemmli²²¹, angewendet. Zur Vorbereitung eines 10%igen Gels wurde zunächst das Trenngel gegossen (2 mL dH_2O , 1,25 mL Trenngelpuffer, 1,67 mL Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 50 µL 10 % (w/v) SDS, 25 µL APS (100 mg/mL), 12,5 mL TEMED) und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel gegossen (1,45 mL dH_2O , 625 µL Sammelgelpuffer, 330 µL Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung, 25 µL 10 % (w/v) SDS, 12,5 µL APS (100 mg/mL),

6,25 mL TEMED). Anschließend wurde der Kamm gesteckt und nach vollständiger Polymerisation wieder gezogen, um die erforderliche Anzahl an Probenkammern zu erreichen.

Die Proteinproben wurden zunächst 1:5 mit Probenpuffer vermischt und für 5 min bei 98°C inkubiert. Die Proben wurden gemeinsam mit einem Standard (*PageRuler Protein Ladder*) in das vorbereitete SDS-PA-Gel geladen. Solange sich die Proben im Sammelgel befanden, wurde eine Stromstärke von 20 mA angelegt. Nach dem Eintritt in das Trenngel wurde auf 40 mA erhöht. Nach der Trennung wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel gründlich mit dH_2O gewaschen. Danach wurde es für 2h in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Die Entfärbung erfolgte in mehreren Schritten in Entfärbelösung. Für die Verwendung des Gels im Western Blot wurde das Gel lediglich mit dH_2O gewaschen aber nicht gefärbt.

3.2.2.6 Western Blot

Zur Identifizierung heterolog exprimierter Proteine wurde die Western Blot-Technik eingesetzt. Dafür wurden je zwei identische SDS-PA-Gele vorbereitet, wobei nur eines mit Coomassie angefärbt wurde. Das andere Gel wurde dazu verwendet, die enthaltenen Proteine auf eine PVDF-Membran zu überführen. Dazu diente eine Semi-Dry-Blotting-Apperatur, die aus zwei horizontalen Elektroden-Platten besteht. Zwischen die Platten wurde der Transferturm aus dem Gel, der Membran und Filterpapier geschichtet. Die Membran wurde in Methanol aktiviert und mit Transferpuffer gewaschen. Das SDS-PA-Gel wurde mit Transferpuffer gewaschen und entgegen der Transfer-Richtung auf die Membran aufgebracht. Auf beiden Seiten wurde eine etwa 4-6 mm dicke Platte aus Whatman-Filterpapier, getränkt mit Transferpuffer geschichtet. Dieser Transferturm wurde so zwischen den Elektoden-Platten platziert, dass die Membran auf der Anodenseite lag.

Zum Transfer der Proteine wurde eine Stromstärke von 40 mA für 40-90 min angelegt. Zur Detektion der Proteine wurde die Membran zunächst für 2h in Blocklösung (5 % w/v Magermilchpulver in TBS) schüttelnd inkubiert, um alle verbliebenen Proteinbindestellen auf der Membran abzusättigen. Danach wurde die Membran einmal mit TBS-Tween und zweimal mit TBS gewaschen. Alle Waschschrte der Membran geschahen in einem geschlossenen Behälter, die Membran wurde mit 2 cm Lösung überschichtet und für 10 min auf einem Pendelschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 2h in Primärantikörper-

Lösung (α -His-Antikörper (Maus) in 15 mL 1 % w/v Magermilchpulver in TBS, Verdünnung 1:2.000) inkubiert. Danach folgte ein Waschschrift in TBS-Tween und zwei Waschschriften in TBS. Daraufhin wurde die Membran für zwei Stunden in Sekundäantikörperlösung (α -Maus-AP-konjugierter Antikörper (Ziege) in 15 mL 1 % w/v Magermilchpulver in TBS, Verdünnung 1:5.000) inkubiert, gefolgt von weiteren drei Waschschriften. Die Visualisierung der Proteine erfolgte anhand der am Sekundäantikörper gekoppelten Alkalischen Phosphatase (AP) durch Inkubation der Membran in Detektionslösung für 2-10 min. Nachdem definierte Banden zu erkennen waren, wurde die Reaktion durch Zugabe von dH_2O gestoppt.

3.2.2.7 Tryptischer Verdau (*in gel*)

Der tryptische Verdau von im SDS-PA-Gel aufgetrennten Proteinen dient der Identifikation der vorliegenden Proteine. Dafür wurde die Methode nach Shevchenko *et al.*²²² angewendet. Für die HPLC-ESI-MS und MS/MS wurde eine ESI-LTQ-Orbitrap XL in Kombination mit einer Vydac 218 MS (C18, 5 μ m, 150 mm x 2,1 mm) Säule verwendet. Für die HPLC-gestützte Auftrennung der Peptide wurde ein Gradient (5 % Puffer B (Acetonitril, 0,1 % v/v Ameisensäure) für 1 min, 5-70 % B innerhalb von 24 min, 70-100 % B innerhalb von 2,5 min, 100 % B für 6 min, 100-5 % B innerhalb von 0,1 min, 5 % B für 6 min (Puffer A: ddH_2O , 0,1 % v/v Ameisensäure)) angelegt. Die Flussrate lag dabei bei 0,2 mL/min. MS/MS Spezifikationen wurden wie folgt gewählt: *data-dependent top-1*, *CID*, *dynamic exclusion 120 s*, *repeat count 2*, *repeat duration 10 s*, $R_s=15.000$, *collision induced energy 35 %*. Die erhaltenen Massenspektren wurden mithilfe von PeptideShaker²¹⁸ ausgewertet.

3.2.2.8 *In vitro* Assays

Für einen typischen *in vitro* Aktivitäts-Assay wurde zunächst das entsprechende Peptid in 20 mM Tricin pH 8 resolubilisiert. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug 25 μ L und enthielt neben dem Peptid und der Synthetase CuvL 10 mM ATP, 1 mM DTT, 10 mM $MgCl_2$ und 20 mM Tricin pH 8. Die Reaktion wurde auf einem Heizblock bei 37°C, schüttelnd bei 500 rpm durchgeführt. Zum Beenden der Reaktion wurde der Ansatz mit 1x vol. Acetonitril gemischt. Zur Vorbereitung auf die Messungen an dem HPLC-ESI-MS Exactive Massenspektrometer wurde die Probe für 20 min bei 13.000x g und 4°C zentrifugiert und der

Überstand in ein Messröhrchen überführt, um die Probe vom denaturierten Enzym zu trennen.

Zur Derivatisierung der Peptide mit Iodacetamid (IAA) als Testierung der Cyclisierungsreaktion^{129,223} wurden 20 µL des Aktivitäts-Assays, nach Beenden der Reaktion, mit 2 µL 500 mM IAA, 1 µL 50 mM TCEP und 27 µL 100 mM Tricin pH 8,5 gemischt, mit Aluminiumfolie vor Lichteinwirkung abgeschirmt und bei Raumtemperatur für 2h inkubiert.

3.2.2.9 Isolation genomischer DNA

Von einer *T. curvata* Kultur wurden 1,5 mL in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei 10.000x g für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zur Isolation der genomischen DNA wurde das *Wizard Genomic DNA Purification Kit* genutzt. Das DNA Sediment wurde in TE-Puffer resuspendiert und bei 4°C gelagert.

3.2.2.10 Isolation von Plasmid DNA

Plasmid-DNA aus *E. coli* Kulturen, die zur Sequenzierung vorgesehen waren, wurden mithilfe des *Wizard Genomic DNA Purification Kits* aufgereinigt.

Für alle anderen Anwendungen wurde eine Modifikation der Methode der Alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly²²⁴ angewendet. Für einen einfachen Ansatz wurden 1,5 mL einer über Nacht Kultur in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei 10.000x g für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig verworfen und die Zellen in 200 µL P1-Lösung resuspendiert. Für die Aktivität der RNase wurde der Ansatz für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 300 µL P2-Lösung dazugegeben und vorsichtig durch Invertieren gemischt. Dann wurden 300 µL P3-Lösung hinzugegeben und erneut vorsichtig durch Invertieren gemischt. Der Ansatz wurde bei 13.000x g für 10 min zentrifugiert und 750 µL des Überstandes in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Fällung der DNA wurden 750 µL Isopropanol hinzugegeben und durch invertieren vermischt. Anschließend wurde bei 13.000x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA Sediment wurde mit 500 µL 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut für eine Minute bei 13.000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde

verworfen und das Sediment getrocknet. Die DNA wurde in 20-50 μL TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C gelagert.

3.2.2.11 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Oligonukleotide für die Amplifikation wurden mithilfe der Programme *Clone Manager*, *SnapGene Viewer* und *OligoCalc* entworfen. Die Wahl der Polymerase, die Bindungstemperatur $T_{\text{annealing}}$, sowie die Dauer der Elongation variierten je nach den Anforderungen des jeweiligen Amplicons. Für Optimierungen wurde ein Temperaturgradient für $T_{\text{annealing}}$ verwendet. Ein typischer Zyklus hatte folgende Spezifikationen: 1x(98°C , 5 min), 25x(98°C , 1 min $-65^{\circ}\text{C}\pm 7^{\circ}\text{C}$, 1 min -72°C , 1 min), 1x(72°C , 5 min), Lagerung bei 4°C .

3.2.2.12 Zielgerichtete Mutagenese

Zur zielgerichteten Mutagenese wurde die SPRINP-Methode nach Edelheit *et al.*²²⁵ eingesetzt. Mit dieser Methode können bis zu drei benachbarte Codons spezifisch mutiert werden. Die Oligonukleotide wurden mit 20 Nukleotiden Überhang in 5'- und 3'-Richtung der zu mutierenden Codons entworfen (Tab. 3.6). Dabei stellte das eine Oligonukleotid das revers komplementäre Gegenstück des zweiten dar. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung der mutierten Bereiche überprüft.

3.2.2.13 Klonierung

Für eine typische Klonierung wurde mittels PCR das *insert* amplifiziert und anschließend mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten. Das Zielplasmid wurde mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten und beide Ansätze wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, um einer Religation vorzubeugen. Die Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels des *GeneJET Gel Extraction-Kits* aufgereinigt. Die Ligation erfolgte mit der T4 Ligase in einem molare Verhältnis *insert*:Vektor von 3:1, 5:1 oder 7:1. Die Ligation erfolgte für 45 min bei Raumtemperatur und 2 μL des Ligationsansatzes wurden anschließend direkt in *E. coli* Dh5 α transformiert. Die Plasmid-DNA von einer Anzahl positiver Klone wurde isoliert, gereinigt und sequenziert, um den Erfolg der Klonierung zu bestätigen.

3.2.2.14 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurde ihrer Größe nach mit Hilfe einer horizontalen Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und mit einem Transilluminator ($\lambda=315$ nm) dokumentiert. Die Agarosegele (1,5 % w/v, in TAE-Puffer) wurden dabei, nach Beladung mit DNA-Proben und 2log-DNA Größenstandard, einer konstanten Spannung von 100 V in TAE-Puffer ausgesetzt. Durch den im Ladepuffer enthaltenen Farbstoff konnte der Fortschritt der Auftrennung visuell observiert und bei Bedarf gestoppt werden. Mit Hilfe dieser Methode wurden auch DNA-Fragmente aufgereinigt. Dafür wurde das entsprechende Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem *GeneJET Gel Extraction Kit* aus der Gelmatrix extrahiert.

3.2.2.15 Konzentrationsmessung von DNA-Lösungen

Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines Nanodrop-Photometers (Nanophotometer P330, Implen) bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm gemessen. Die Reinheit der DNA-Lösung wurde zum einen bestimmt durch den Quotienten der Wellenlängen $\lambda=260$ nm und $\lambda=280$ nm (A_{260}/A_{280}). Beträgt der Quotient einen Wert zwischen 1,7 und 2,0, liegt eine ausreichende Reinheit für Reinheits-sensible Anwendungen wie einer Sequenzierung vor. Zum anderen von Interesse war der Quotient der Wellenlängen $\lambda=260$ nm und $\lambda=230$ nm (A_{260}/A_{230}). Eine gute Reinheit entspricht einem Wert von über 1,5. Bei $\lambda=280$ nm absorbieren aromatische Aminosäuren. Somit werden Verunreinigungen mit Peptiden und Proteinen angezeigt. Bei $\lambda=230$ nm absorbieren chaotrope Salze und weitere organische Verbindungen, die das Ergebnis der Konzentrationsmessung verfälschen können.

3.2.2.16 DNA-Sequenzierung und -synthese

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde von der Firma *Eurofins Genomics* übernommen. Bei Klonierungen wurde das gesamte *insert* sequenziert, bei der zielgerichteten Mutagenese die mutierte Region. Die Synthese von Codon-optimierter DNA des *cuvL*-Gens wurde von der Firma *ProteoGenix SAS* geleistet. Die Synthese von Codon-optimierter DNA des *cuvA*-Gens im Rahmen eines gBlock-Gen-Fragments wurde von der Firma *IDT* übernommen.

3.2.3 Analytische Methoden

3.2.3.1 Präparative HPLC

Die präparative HPLC wurde als finaler Aufreinigungsschritt für Peptide eingesetzt. Dabei sind zwei Arten von Peptiden zu unterscheiden. Zum einen synthetische Peptide, die durch Festphasensynthese (SPPS: *solid phase peptide synthesis*) von Kooperationspartnern innerhalb der Arbeitsgruppe Süssmuth hergestellt wurden (Eric van Herwerden, Bianca Schmid, Romina Schnegotzki). Von den synthetischen Peptiden wurden je 20 mg Lyophilisat in ein Eppendorf-Gefäß abgewogen und 500 µL Acetonitril zugegeben. Dann wurden 500 µL *ddH*₂O zugegeben, gemischt und die Lösung für 3 min im Ultraschallbad belassen. Danach wurde für 5 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein HPLC-Röhrchen gegeben und ohne weitere Verzögerung in die präparative HPLC eingespeist. Verwendet wurde hierfür die Grom-Sil 120 C18-Säule. Für die Auftrennung wurde ein Gradient (5 % Puffer B (Acetonitril, 0,1 % v/v Ameisensäure) für 1 min, 5-100 % B innerhalb von 10 min, 100 % B für 3 min, 100-5 % innerhalb von 0,1 min, 5 % B für 3 min (Puffer A: *ddH*₂O, 0,1 % v/v Ameisensäure)) angelegt. Die Flussrate lag dabei bei 15 mL/min.

Zum anderen wurden heterolog exprimierte Peptide mittels der präparativen HPLC aufgereinigt. Dazu wurde das Eluat der FPLC mit Amicon Zentrifugenfiltern (MWCO 3.000) auf 1 mL ankonzentriert und direkt in die präparative HPLC eingespeist. Verwendet wurde hierbei die Vydac TP C4-Säule. Für die Auftrennung wurde ein Gradient (5 % Puffer B (Acetonitril, 0,1 % v/v Ameisensäure) für 1 min, 5-100 % B innerhalb von 10 min, 100 % B für 3 min, 100-5 % innerhalb von 0,1 min, 5 % B für 3 min (Puffer A: *ddH*₂O, 0,1 % v/v Ameisensäure)) angelegt. Die Flussrate lag dabei bei 15 mL/min.

In beiden Fällen wurde von jeder Fraktion eine 60 µL Probe zur Reinheitsbestimmung über HPLC-ESI-MS-Exactive genommen und anschließend durch einen SpeedVac-Vakuum-Konzentrator und Lyophilisation getrocknet. Danach wurden die Fraktionen bei -20°C gelagert.

3.2.3.2 HPLC-ESI-MS Exactive Massenspektrometer

Das Exactive Massenspektrometer wurde verwendet, um Proben im Scan-Modus zu vermessen. Hierfür ist ein Agilent 1200 HPLC System über eine beheizbare ESI-Quelle (HESI)

mit dem Massenspektrometer gekoppelt. Für die chromatographische Trennung wurde unter Anlegung einer Flussrate von 0,3 mL/min der folgende Gradient verwendet: 5-100 % Puffer B (Acetonitril, 0,1 % v/v Ameisensäure), 100 % Puffer B für 3 min, 100-5 % Puffer B in 0,1 min, 5 % Puffer B für 4 min (Puffer A: ddH₂O, 0,1 % v/v Ameisensäure). Die Proben wurden im positiven Ionisierungsmodus zwischen 400 und 2.000 *m/z* gemessen.

3.2.3.3 CD-Spektroskopie

Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie wurde eingesetzt, um zum einen die Sekundärstruktur zu bestimmen und damit den Faltungsstatus zu prüfen und zum anderen, um Proteinschmelzkurven aufzunehmen, also die thermale Stabilität unter verschiedenen Bedingungen zu bestimmen. Die Analyten wurden dafür in einem 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 gelöst bzw. umgepuffert, da der pH-Wert eines Tris-HCl Puffers temperaturabhängig ist. Für Spektrum-Messungen wurden folgende Parameter gewählt: *digital integration time: 1 s, band width: 1 nm, wavelengt range: 320-200 nm, data pitch: 0.1 nm, scanning speed: 25 nm/min, cell length: 1 mm, temperature: 25°C und 45°C*. Für Schmelzkurven wurden die folgenden zusätzlichen Parameter gewählt: *monitor wavelength: 222 nm, temperatur range: 40-80°C, temperature ramp: 1 °C/min*.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Kristallisation der Curvocidin-Synthetase CuvL

4.1.1 Isolierung von CuvL

Um die Mechanismen eines unbekanntes Biosynthesewegs aufzuklären, hat es sich bewährt, die beteiligten Enzyme aufzureinigen und die enzymatischen Reaktionen *in vitro* zu rekonstituieren. Aus dem Experimentdesign und der Analyse der Produkte ergeben sich Informationen, die in Synergie Rückschlüsse auf die Biosynthese *in vivo* zulassen. Die etablierte Methodik beinhaltet die Klonierung der an der Synthese beteiligten Gene in induzierbare Überexpressionsvektoren und damit die gezielte Expression in *E. coli* Expressionsstämmen.

Bei der Klonierung des Synthetase-Gens *cuvL* aus isolierter genomischer DNA zeigte sich, dass der initiale Schritt, die PCR-gestützte Amplifizierung des Gens, den entscheidenden Flaschenhals darstellte. Beim Produzenten von Curvocidin, *T. curvata* handelt es sich um grampositive, thermophile Bakterien aus der Ordnung Actinomycetales, die ihr Temperatur-optimum bei etwa 50°C haben²¹². Die genomische DNA hat einen erheblichen GC-Gehalt, um die Stabilität gegenüber den hohen Temperaturen zu gewährleisten. Die Bereiche der DNA um das Start- und Stopcodon von *cuvL* liegen bei einem GC-Gehalt von rund 75%. Dementsprechend hoch ist die Schmelztemperatur und die Bindung der Oligonukleotide für die Amplifikation im Verlauf der PCR ist deutlich erschwert. Dasselbe gilt für diejenigen DNA-Abschnitte, in denen im weiteren Verlauf der Experimente verschiedene Punktmutationen etabliert werden sollten.

Die Klonierung des *cuvL*-Gens gelang erst, nachdem eine umfangreiche Optimierung der PCR-Bedingungen und die Testierung einer größeren Zahl verschiedener Oligonukleotid-Paare die

Amplifikation des Gens ermöglichte (P-017-FP und P-018-RP, Tab. 3.6). Über die verwendeten Oligonukleotide wurden die Restriktionsschnittstellen *NdeI* am 5'-Ende des Gens und *HindIII* am 3'-Ende in das Amplicon integriert (s. 3.2.2.13, S. 56). Sowohl das Amplicon als auch der Expressionsvektor pET28a(+)-TEV wurden mit *NdeI* und *HindIII* geschnitten, gereinigt und anschließend ligiert, woraus der Überexpressionsvektor pSD006 hervorging (Tab. 3.8, Abb. A4). Unter der Kontrolle des T7-Promotors²²⁶, dessen hohe Transkriptionsleistung induzierbar ist (Laktose oder IPTG), kodiert dieser Vektor für ein CuvL-Fusionsprotein, das N-terminal über eine TEV-Schnittstelle mit einem Hexahistidin-*tag* fusioniert ist (His₆-TEV-CuvL). Ein Expressionstest mit sieben unterschiedlichen Expressionsstämmen wurde durchgeführt und die Identität des Fusionsproteins wurde mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blot bestätigt (Abb. 4.1). Der Expressionstest sollte zeigen, ob die Coexpression verschiedener Chaperone die Ausbeute des heterolog exprimierten Proteins signifikant erhöhen kann. Da gezeigt werden konnte, dass dies nicht der Fall ist (Abb. 4.1A), wurde auf diese Coexpression verzichtet.

Im weiteren Verlauf der Experimente schlossen sich die Klonierungen zweier CuvL-Punktmutanten an. Ein putativ essentielles Lysin der Lyasedomäne von CuvL an Position 79 wurde durch ein Alanin ersetzt, um CuvL-K79A zu erzeugen (Tab 3.8). Die Lyasefunktion geht durch diese Substitution höchstwahrscheinlich verloren. Die Identifizierung dieser Aminosäureposition gelang durch Vergleich der CuvL-Lyasedomäne mit der Ser/Thr-Lyase SpvC mit Hilfe von BLAST und SWISS-MODEL (s. 4.1.3.1, S. 77). In der Mutante CuvL-C729A,C775A,C776A sollten die Cysteine C729, C775 und C776, die putativ für die Koordinierung der Zn²⁺-Ionen verantwortlich sind, durch Alanin ersetzt werden. CuvL-C729A,C775A,C776A besitzt daher vermutlich keine funktionelle Cyclasedomäne mehr (s. 4.1.3.3, S. 81).

Bemühungen zur Etablierung der genannten Punktmutationen durch gerichtete Mutagenese blieben ergebnislos. Daher wurde das *cuvL-K79A*-Gen für *E. coli* Codon-optimiert, von der Firma *ProteoGenix SAS* synthetisiert und in den Expressionsvektor pET28a(+)-TEV kloniert (pSD018, Tab. 3.8, Abb. A4). Durch gerichtete Mutagenese²²⁵ dieses Plasmids wurde anschließend ein Wildtyp-Allel von CuvL hergestellt. Davon ausgehend wurde mit derselben Methode die CuvL-C729A,C775A,C776A-Tripel-Mutante erstellt. Bei allen Vektoren wurde das

cuvL-insert sequenziert, um die Implementierung der korrekten Punktmutation nachzuweisen.

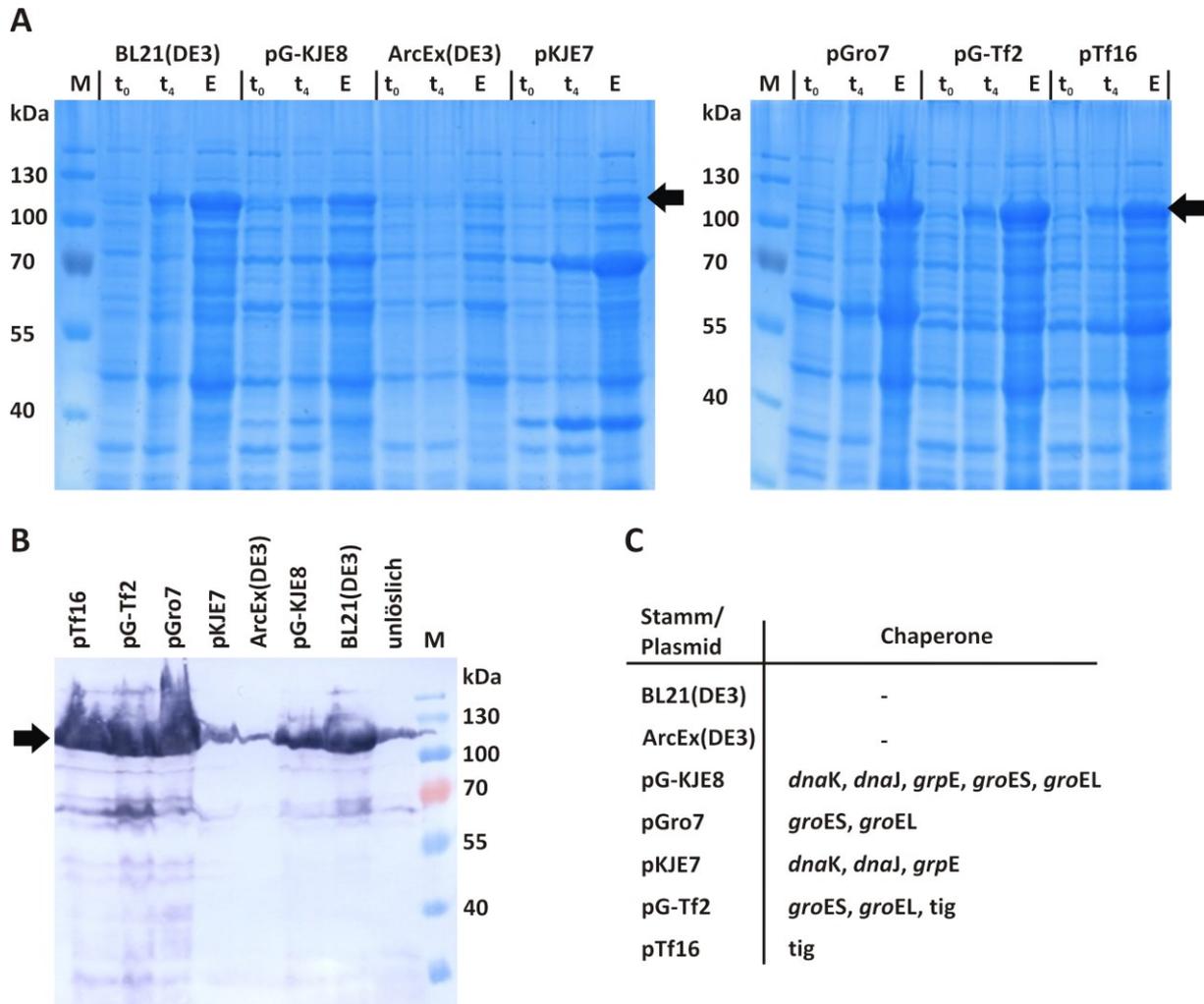


Abbildung 4.1 Expression von rekombinatem CuvL.

(A) SDS-PAGE von Proteinextrakten aus sieben verschiedenen *E. coli*-Expressionsstämmen. (t_0) Zellen vor Induktion (t_4) Zellen vier Stunden nach Induktion (E) Zellextrakt, schwarze Pfeile: CuvL. Zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit wurde die Zellzahl der verschiedenen Stämme über die OD_{600} normalisiert. Keiner der getesteten Stämme exprimiert signifikant mehr lösliches Protein als BL21(DE3), ArcEx(DE3) scheint unter den gegebenen Bedingungen kaum Protein zu exprimieren. (B) Western Blot mit Zellextrakten zum Nachweis der Protein-Identität, die unlösliche Fraktion bezieht sich auf das Zentrifugations-Sediment von *E. coli* BL21(DE3) nach dem Zellaufschluss, schwarzer Pfeil: CuvL. (C) Übersicht über die unterschiedlichen Expressionsstämmen, die unterschiedliche Kombinationen an Chaperonen coexprimieren. BL21(DE3) ist der verwendete Expressionsstamm und ArcEx(DE3) ist ein für niedrige Expressionstemperaturen optimierter Expressionsstamm.

Die Aufreinigung der rekombinanten CuvL-Proteine erfolgte zunächst über eine initiale Affinitätschromatographie (NiNTA IMAC; Abb. 4.2A). Danach wurde der His₆-tag durch Inkubation mit His₆-TEV-Protease entfernt. Im Anschluss wurde sowohl der abgetrennte

His₆-tag als auch die His₆-TEV-Protease in einer zweiten Affinitätschromatographie (NiNTA IMAC) entfernt.

In der Regel folgte darauf eine Größenausschluss-Chromatographie (SEC) (Abb. 4.2B). Zur Qualitätskontrolle wurde mit den SEC-Fractionen eine SDS-PAGE durchgeführt, wobei auch der Erfolg der TEV-Protease-Reaktion überprüft wurde. Der direkte Vergleich der Proteinbanden im Gel vor (theoretisch 95,6 kDa) und nach dem TEV-Schnitt (theoretisch 92,8 kDa) zeigt einen geringen (theoretisch 2,8 kDa), aber deutlichen Größenunterschied (Abb. 4.2C, 4.2E). Weiterhin wäre das nicht TEV-geschnittene, also noch His₆-markierte Protein nicht in der Durchfluss-Fraktion der zweiten NiNTA IMAC nachweisbar. Auffällig ist, dass CuvL-Banden in SDS-PA-Gelen bei etwa 110 kDa und damit atypisch etwa 14% zu hoch verlaufen. Solche sogenannten *gel-shifting*-Anomalien sind bei großen Proteinen und Membranproteinen wohl bekannt²²⁷ und vermutlich auf SDS-Bindungsanomalien zurückzuführen. In solchen Fällen ist es wichtig, die Protein-Identität anderweitig nachzuweisen (Western Blot, Abb. 4.1B, tryptischer Verdau, s.u.).

Die Kontrolle der SEC-Fractionen zeigt eine deutliche Zunahme der CuvL-Konzentration, die mit der Höhe des mAU-Signals des SEC-Chromatogramms korreliert (Abb. 4.2C). Die Reinheit der Synthetase ist dabei in den Fractionen sehr unterschiedlich. Das relative Verhältnis von CuvL zu Verunreinigungen mit höherer und niedrigerer Masse ist bei den Fractionen im mAU-Maximum am geringsten.

Ein tryptischer in-Gel-Verdau mit anschließender HPLC-ESI-MS/MS-Messung und Auswertung durch PeptideShaker konnte den Signalen eine Protein-Identität zuweisen. Zum einen konnte das rekombinante CuvL zweifelsfrei nachgewiesen werden (Abb. 4.2Cb). Unter den höheren Massen konnte die Fruktose-1,6-Bisphosphat-Aldolase identifiziert werden. Dieses Enzym ist zentraler Bestandteil des Primärmetabolismus von *E. coli* und verfügt in seiner Rolle als Metalloprotein über mehrere intrinsische Metallionen-Bindestellen²²⁸. Das erklärt die falschpositive Bindung an die NiNTA-Matrix bei der Affinitätschromatographie (Abb. 4.2Ca). In den Signalen mit niedrigerer Masse ließ sich neben CuvL-Bruchstücken hauptsächlich das *E. coli* Hsp70-Chaperon DnaK nachweisen. Dieses Protein bindet naszierende Proteine während der Translation und verhindert auf diese Weise verfrühte und damit fehlerhafte Proteinfaltung²²⁹. Eine rekombinante Überexpression stellt für die betroffenen Zellen einen

immensen Stressfaktor dar, der unter anderem durch eine erhöhte Chaperon-Produktion kompensiert wird²³⁰ (Abb. 4.2Cc).

In der Bemühung, die relative Menge dieser unerwünschten Proteine zu minimieren, wurde zwischen den NiNTA IMAC- und SEC-Schritten eine Ionenaustauschchromatographie (IEX) an einer DEAE-Säule zwischengeschaltet. Nach der Bindung des Proteins an die Säule erfolgte die Elution über einen NaCl-Gradienten von 300 mM bis 1 M (Abb. 4.2D). Die Kontrolle der IEX-Fraktionierungen anhand einer SDS-PAGE zeigt, dass die relative Menge an Verunreinigungen durch IEX nicht wesentlich minimiert werden konnte (Abb. 4.2E).

Stattdessen wurden die Expressionsbedingungen weiter optimiert. Zur Verminderung des Zellstress durch die Überexpression wurde Autoinduktionsmedium verwendet. Die darin enthaltene Laktose induziert die Zielgen-Transkription schonender als das bei der IPTG-Induktion der Fall ist. Weiter wurde das Temperatur-Zeit-Profil der Expression Zellstressminimierend gestaltet. Anstatt die Zellen nach der Induktion mit IPTG sechs Stunden bei 37°C zu inkubieren, wurden die Ansätze nach Induktion mit Autoinduktionsmedium eine Stunde bei 37°C und anschließend bei 18°C für 18 Stunden inkubiert, wodurch die allgemeine Stoffwechselrate gesenkt wird. Diese Maßnahmen erhöhten die Proteinausbeute schließlich auf insgesamt über 20 mg/L Kulturmedium. Somit wurde eine optimierte Aufreinigungskaskade etabliert, nach der auf den Aufschluss von 40 g Zellmaterial die initiale NiNTA IMAC anschloss, gefolgt von TEV-Proteaseverdau, sekundärer NiNTA IMAC, SEC und schließlich dem Ankonzentrieren der Proteinlösung auf 15 mg/mL, entsprechend einer Ausbeute von 7-8 mg/L Kulturmedium. Serielle Verdünnungen, verwendet für SDS-PAGE-Analysen, wurden als Qualitätskontrolle für Proteinlösungen etabliert, da so die Menge der Verunreinigungen anschaulich verdeutlicht und kontrolliert werden kann (Abb. 4.2F).

Die Aufreinigung von CuvL und deren Mutanten diente sowohl der Verwendung des Enzyms für *in vitro*-Experimente (Abschnitt 4.2) als auch der Kristallisation und deren Optimierung.

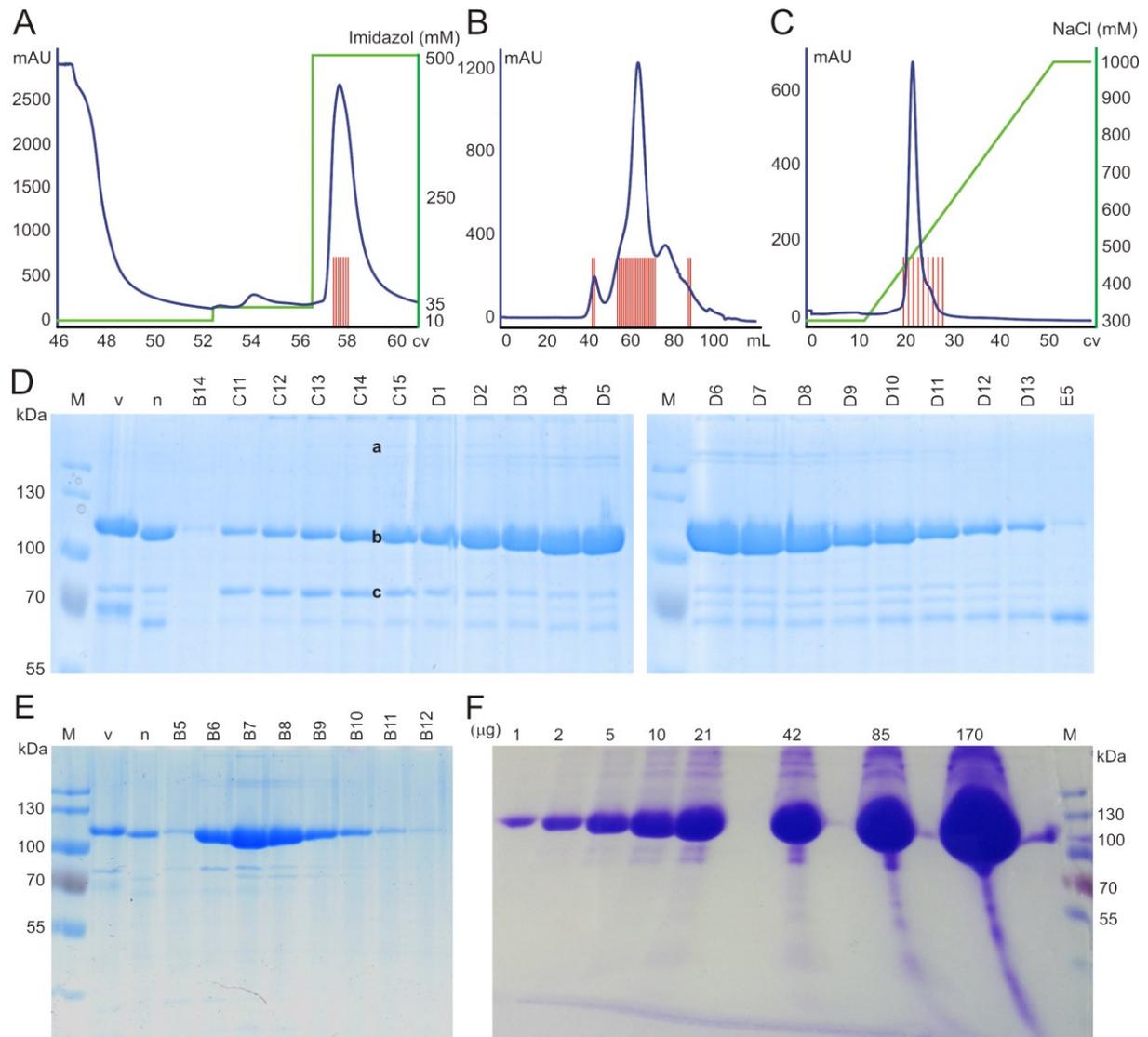


Abbildung 4.2 Aufreinigungskaskade von CuvL.

(A) FPLC-Chromatogramm der initialen NiNTA IMAC. Die roten Balken repräsentieren die Proteinfraktionen, die vereinigt und für den TEV-Schnitt verwendet wurden **(B)** FPLC-Chromatogramm der Gelfiltration. Die roten Balken repräsentieren die Fraktionen, die auf dem SDS-PA-Gel aufgetragen wurden (B14 Links, C11-D13 Mitte, E15 rechts) **(C)** FPLC-Chromatogramm der IEX, die roten Balken repräsentieren die Fraktionen, die auf dem SDS-PA-Gel aufgetragen wurden, B5 ist der Balken bei 20 cv, B12 bei etwa 28 cv **(D)** SDS-PAGE mit Fraktionen der Gelfiltration nach (B). Die Kleinbuchstaben kennzeichnen die mittels tryptischem in-Gel Verdau und HPLC-ESI-MS/MS identifizierte Proteine. a: Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase, b: CuvL, c: DnaK-CuvL-Fragment-Aggregate. M: Marker, v: His₆-TEV-CuvL vor TEV-Schnitt, n: CuvL nach TEV-Schnitt **(E)** SDS-PAGE von Fraktionen der IEX nach (D). M: Marker, v: vor TEV-Schnitt, n: nach TEV-Schnitt **(F)** SDS-PAGE mit Verdünnungsreihe des CuvL-Isolats am Ende der Aufreinigungskaskade. Die schwächste Verdünnung von 170 µg wurde dafür jeweils 1:2 weiterverdünnt.

4.1.2 Kristallisations-Screens

Ein Proteinstruktur-Modell ermöglicht das präzise Verständnis der Funktionsweise eines Proteins. Es erlaubt, Hypothesen und Prognosen zu erstellen, wie sich das Protein kontrollieren oder modifizieren lässt. Die Topologie der aktiven Zentren und damit die spezifischen Aminosäurefunktionen, die an der Bindung der Substrate und Cofaktoren sowie der Katalyse beteiligt sind, lassen sich erst im Strukturmodell ermitteln.

Zur Strukturaufklärung der 93 kDa großen, trifunktionalen Curvolidin-Synthetase CuvL wurde die Methode der Röntgen-Proteinkristallographie verwendet. Dafür wurde eine Kooperation mit Dr. Berta Martins aus der Strukturbiologie-Arbeitsgruppe um Professor Holger Dobbek von der Humboldt-Universität zu Berlin eingerichtet, die zum einen über die Infrastruktur für die Experimente und zum anderen über die Expertise für die Berechnungen verfügt.

Für die Testierung der Kristallisations-Bedingungen wurden 96-well-Mikrotiter-Platten verwendet, die pro Bedingung zwei Tropfen (*sitting-drop vapor-diffusion*) vorsehen. Für den ersten Tropfen wurde eine bestimmte Proteinlösung verwendet, deren Konzentration für den zweiten Tropfen halbiert wurde. Im Ganzen wurden also 192 verschiedene Bedingungen pro Platte getestet. Im Laufe des Projekts wurden über 60 Mikrotiter-Platten angesetzt, was einem Experimentvolumen von über 11000 getesteten Bedingungen entspricht. Die Variabilität wird durch zwei Faktoren bestimmt. Zum einen wurden die Testierungslösungen von *Molecular Dimensions* und von *Hampton Research* (Tab. 3.5) verwendet. Diese enthalten 96 verschiedene Pufferlösungen, die auf die Mikrotiter-Platten übertragen werden. Zum anderen wurde für jede neue Ansatz-Charge die Zusammensetzung der Proteinlösungen leicht variiert (Tab. 4.1). Jede Testierung, das heißt jeder Tropfen bestand aus 0,5 μ L Pufferlösung und 0,5 μ L Proteinlösung.

Da CuvL aus drei distinkten Domänen besteht (Abb. 1.13), behindert die Einnahme vieler unterschiedlicher Proteinkonformationen möglicherweise die Bildung einer einheitlichen Kristallstruktur. Durch die Arretierung einer Substratbindung kann die Formung unterschiedlicher Konformationen minimiert werden. Demnach wurden Cokristalle von CuvL mit einem SPPS-synthetisiertem *leader*-Peptid als Substrat (Abb. 4.3) und einem nicht-hydrolysierbarem ATP-Analog (AMP-PNP) als Cofaktor angestrebt.

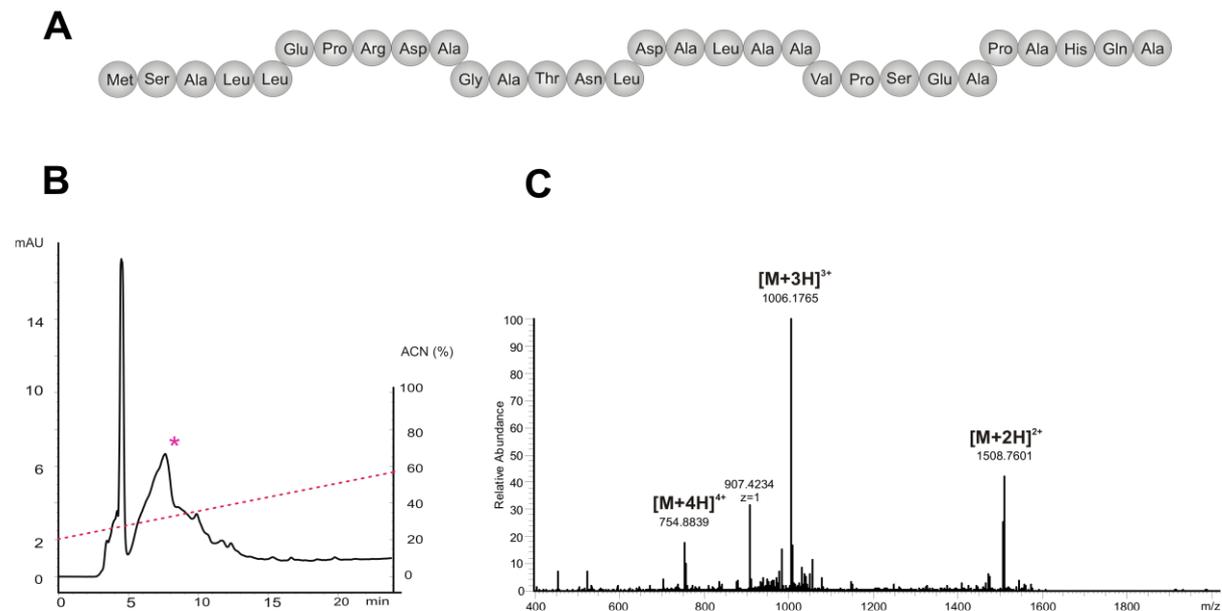


Abbildung 4.3 Leader Peptid Aufreinigung von SPPS synthetisiertem Peptid

Leader Peptid Aufreinigung von SPPS synthetisiertem Peptid (A) Primärsequenz des Curvocidin *Leader*-Peptids **(B)** Präparatives HPLC Chromatogramm, Sternchen*: Fraktion mit höchster *leader*-Peptid Konzentration. **(C)** HPLC-ESI-MS Massenspektrum des *leader* Peptids: $[M+4H]^{4+}$ berechnet: 754.6363 m/z, gemessen: 754.6336 m/z; $[M+3H]^{3+}$ berechnet: 1005.8457 m/z, gemessen: 1005.8422 m/z; $[M+2H]^{2+}$ berechnet: 1508.2656 m/z, gemessen: 1508.2603 m/z. Im späteren Verlauf wurde D>E *leader*-Peptid synthetisiert und aufgereinigt, um Piperidid-Bildung vorzubeugen. Der Ablauf der Aufreinigung blieb dabei erhalten.

Zur Vermeidung von Aspartamid- oder Piperidid-Bildung während der SPPS wurden die im *leader*-Peptid enthaltenen Aspartate durch Glutamate ersetzt (D>E *leader*-Peptid). Das Bindeverhalten wurde durch iTC- und CD-Spektroskopie untersucht²³¹. Die iTC ergab keine verwertbaren Ergebnisse, CD-Schmelzkurven (*thermal shift assay*) jedoch ergaben, dass CuvL nach Bindung von Substrat und Cofaktor bei einer um $0,85 \pm 0,12$ °C höheren Temperatur denaturiert (Abb. 4.4). Diese eher insignifikante Erhöhung lässt darauf schließen, dass durch Substratbindung keine wesentlich bessere Proteinestabilität zu erwarten ist. Dafür ist die Denaturierungstemperatur T_m mit rund 63°C insgesamt recht hoch (Tab. A1). Ein Unterschied von mehr als 25 K zwischen T_m und der Temperatur, in der die Mikrotiterplatten gelagert werden (18°C), begünstigt die Protein-Kristallisation²³².

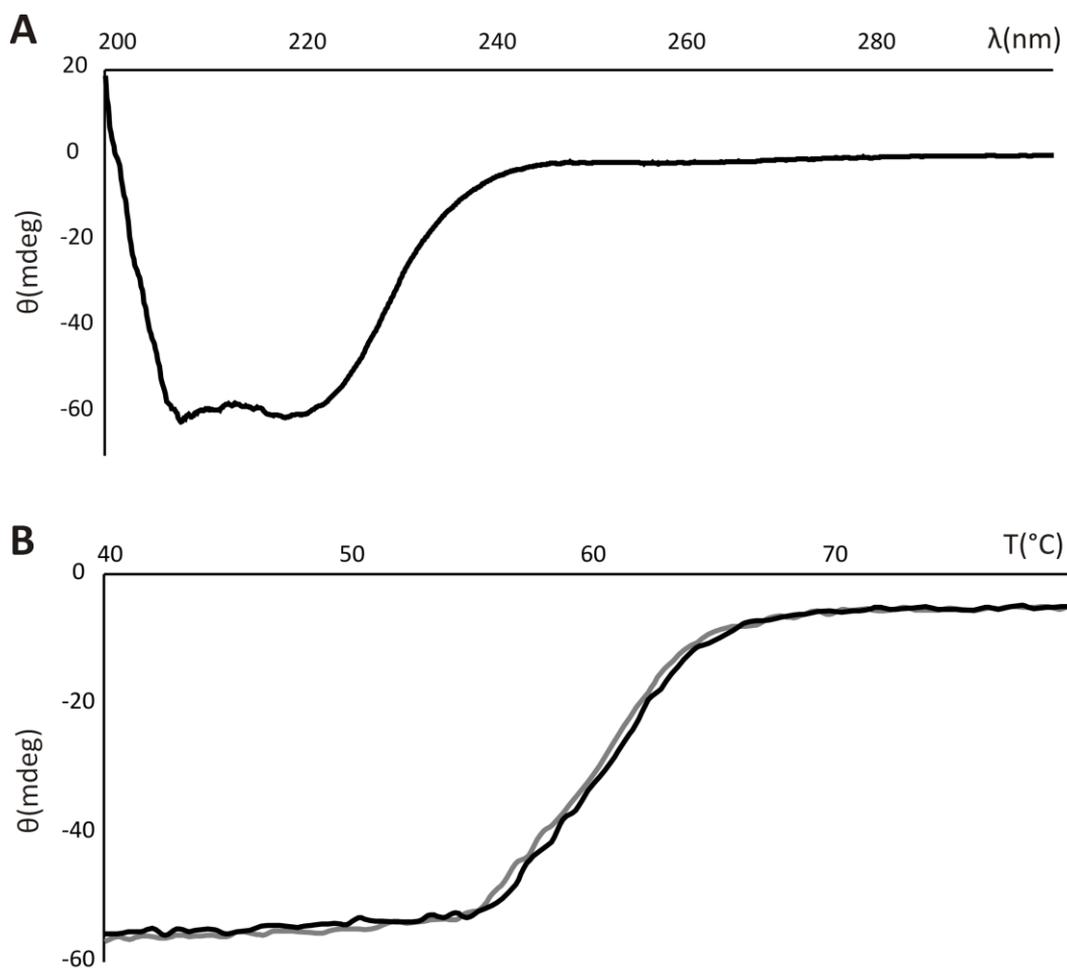


Abbildung 4.4 CD-Spektroskopie

(A) CD-Spektrum von CuvL (6 μM CuvL, 50 mM NaPO_4 -Puffer pH 8,0, 100 mM NaCl). Die Messung wurde als Triplicat aufgenommen und von jedem Datenpunkt der Durchschnitt gebildet. Das Spektrum zeigt eine typische α -helicale Struktur. **(B)** CD-Schmelzkurve von CuvL (6 μM , 50 mM NaPO_4 -Puffer pH 8,0, 100 mM NaCl) in Grau und CuvL (6 μM , 50 mM NaPO_4 -Puffer pH 8,0, 100 mM NaCl) mit CuvA-T2AT11A-Peptid (20 μM) und AMP-PNP (6 μM) in Schwarz. Die Schmelztemperatur steigt durch die Bindung von Substrat und Cofaktor um $0.85 \pm 0.12^{\circ}\text{C}$ an (Tab. A1).

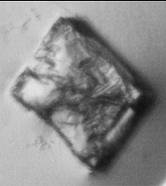
Die ersten Kristalle, die erfolgreich geerntet und am BESSY vermessen werden konnten (Platten #8, #9, #14, #16, Messungen am BESSY durch Dr. Berta Martins), erwiesen sich aufgrund ihres Diffraktions-Verhaltens als Salzkristalle. Die entsprechenden Bedingungen enthielten Li_2SO_4 oder verschiedene Metallchloride. Es ist davon auszugehen, dass es sich um Salzkristalle dieser Inhaltsstoffe handelt (Tab. 4.1).

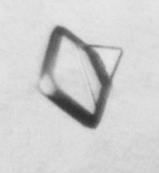
Der erste tatsächliche CuvL-Kristall konnte nach etwa fünf Monaten Wachstum der Mikrotiterplatte #30 (Bedingung D5) entnommen werden (Tab. 4.1). Es handelte sich um einen hexagonal-bipyramidalen Kristall, der mit Synchrotron-Strahlung (BESSY, Berlin) eine

verwertbare Auflösung von 3,2-3,0 Å erreichte. Ein Strukturmodell ließ sich aus verschiedenen Gründen aus diesem Kristall nicht errechnen. Zum einen zeigte der Kristall eine signifikante Verzwilligung (*twinning*) und zum anderen waren Homologien zu Proteinen mit bekannter Struktur nicht hoch genug, um die Struktur mit der Patterson-Methode (*molecular replacement*) zu berechnen. Somit blieb das Phasenproblem bestehen und ließ sich vorerst nicht lösen.

Nach sieben Monaten waren auf derselben Mikrotiterplatte #30, aber unter einer anderen Bedingung (E9), vier weitere Kristalle hexagonaler Form gewachsen (Tab. 4.1). Im Bestreben, das Phasenproblem durch anomale Streuung²³³ (*anomalous scattering*) zu lösen, wurden diese Kristalle vor dem Einfrieren in Thiomersal getränkt (eine organische Quecksilberverbindung, deren Quecksilberatome durch Einlagerung in die Kristallstruktur zur anomalen Streuung genutzt werden können²³⁴). Bei der Röntgen-Diffraktion ergab sich eine nur unzureichende Auflösung von 8-6 Å.

Tabelle 4.1 Zusammenfassung getesteter CuvL-Kristalle

Kristall	Platten-Nr. Screen Ergebnis	Ansatz* (0,5 µL Proteinlösung)	Bedingung* (0,5 µL Pufferlösung)
	Platte #8 Memgold D4 Salz	7.5 mg/mL His ₆ -TEV-CuvL (80 µM), 30 µM AMP-PNP, 80 µM SPPS D>E <i>leader</i> - Peptid, in 20 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 10 % (w/v) Glycerin	100 mM Tris pH 8,5, 200 mM CaCl ₂ , 44 % w/v PEG 400
	Platte #9 SaltRX F8 Salz	7.5 mg/mL His ₆ -TEV-CuvL (80 µM), 30 µM AMP-PNP, 80 µM SPPS D>E <i>leader</i> - Peptid, in 20 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 10 % (w/v) Glycerin	100 mM Bis/Tris Propan pH 7, 800 mM Li ₂ SO ₄ ·H ₂ O
	Platte #14 Morpheus A7 Salz	7.5 mg/mL His ₆ -TEV-CuvL (80 µM), 30 µM AMP-PNP, 80 µM SPPS D>E <i>leader</i> - Peptid, in 20 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 10 % (w/v) Glycerin	100 mM HEPES/MOPS pH 7,5, 60 mM CaCl ₂ , MgCl ₂ 30 % w/v Glycerin/PEG4000

Kristall	Platten-Nr. Screen Ergebnis	Ansatz* (0,5 µL Proteinlösung)	Bedingung* (0,5 µL Pufferlösung)
	Platte #16 JCSG G5 Salz	7.5 mg/mL His ₆ -TEV-CuvL (80 µM), 30 µM AMP-PNP, 80 µM SPPS D>E <i>leader</i> -Peptid, in 20 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 10 % (w/v) Glycerin	100 mM HEPES pH 7,5, 5 mM CoCl ₂ , CdCl ₂ , MnCl ₂ , NiCl ₂ , 12 % w/v PEG3350
	Platte #30 Morpheus D5 3,2-3,0 Å	16 mg/mL CuvL (170 µM), 850 µM AMP-PNP, 210 µM SPPS D>E <i>leader</i> -Peptid, in 50 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 10 % (w/v) Glycerin	100 mM Na-HEPES/MOPS pH 7,5, 120 mM Alkohol-mix (je 20 mM 2-Propanol, 1,2-Propandiol, 1,3-Propandiol, 1-Butanol, 1,4-Butandiol, 1,6-Hexandiol), 30 % v/v PEG-mix (40 % v/v PEG 550MME, 20 % w/v PEG 20000)
	Platte #30 Morpheus E9 (Hg) 8-6 Å	10 mg/mL CuvL (115 µM), 575 µM AMP-PNP, 210 µM SPPS D>E <i>leader</i> -Peptid, in 50 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 10 % (w/v) Glycerin	100 mM Tris/Bicin pH 8,5, 120 mM Ethylenglycol-mix (je 300 mM Di-, Tri-, Tetra, Pentaethylenglycol), 30 % v/v PEG-mix (40 % v/v PEG 550MME, 20 % w/v PEG 20000)
	Platte #30 Morpheus E9 (Hg) 8-6 Å	16 mg/mL CuvL (170 µM), 850 µM AMP-PNP, 210 µM SPPS D>E <i>leader</i> -Peptid, in 50 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 10 % (w/v) Glycerin	100 mM Tris/Bicin pH 8,5, 120 mM Ethylenglycol-mix (je 300 mM Di-, Tri-, Tetra, Pentaethylenglycol), 30 % v/v PEG-mix (40 % v/v PEG 550MME, 20 % w/v PEG 20000)
	Platte #30 Morpheus E9 (Hg) 8-6 Å	16 mg/mL CuvL (170 µM), 850 µM AMP-PNP, 210 µM SPPS D>E <i>leader</i> -Peptid, in 50 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 10 % (w/v) Glycerin	100 mM Tris/Bicin pH 8,5, 120 mM Ethylenglycol-mix (je 300 mM Di-, Tri-, Tetra, Pentaethylenglycol), 30 % v/v PEG-mix (40 % v/v PEG 550MME, 20 % w/v PEG 20000)
	Platte #30 Morpheus E9 (Hg) 8-6 Å	10 mg/mL CuvL (115 µM), 575 µM AMP-PNP, 210 µM SPPS D>E <i>leader</i> -Peptid, in 50 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 10 % (w/v) Glycerin	100 mM Tris/Bicin pH 8,5, 120 mM Ethylenglycol-mix (je 300 mM Di-, Tri-, Tetra, Pentaethylenglycol), 30 % v/v PEG-mix (40 % v/v PEG 550MME, 20 % w/v PEG 20000)

Kristall	Platten-Nr. Screen Ergebnis	Ansatz* (0,5 µL Proteinlösung)	Bedingung* (0,5 µL Pufferlösung)
	Platte #51 Morpheus G2 6-5 Å	10 mg/mL SeMet-CuvL (115 µM), 1,2 mM AMP- PNP, 990 µM SPPS D>E <i>leader</i> -Peptid, in 20 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 10 % (w/v) Glycerin	100 mM Glycin pH 9, 50 mM MgCl ₂ , 22 % v/v PEG 400
	Platte #59 Morpheus C9 2,7 Å Strukturmodell basiert auf diesem Kristall	15 mg/mL SeMet-CuvL (160 µM), 1 mM AMP-PNP, 1 mM SPPS D>E <i>leader</i> - Peptid, in 20 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 10 % (w/v) Glycerin	100 mM Tris/Bicin pH 8,5, 90 mM NPS (je 300 mM NaNO ₃ , Na ₂ HPO ₄ , (NH ₄) ₂ SO ₄), 30 % v/v PEG- mix (40 % v/v PEG 500MME, 20 % w/v PEG 20000)

* alle Testbedingungen wurden im Zuge dieser Arbeit angesetzt (s. 3.2.2.2, S. 54)

Die effektivere Methode, schwere Atome für anomale Streuung zu nutzen, ist ihr direkter Einbau in die Struktur des Proteins. Dies kann erreicht werden, indem man dem Produzentenstamm bei der Expression in Minimalmedium Selenomethionin (SeMet) zufüttert (s. 3.2.1.1, S. 51). Dieses Methionin-Analogon trägt anstelle des Schwefelatoms ein Selen-Atom, das zur anomalen Streuung und damit zum Lösen des Phasenproblems genutzt werden kann^{235,236}.

Die Kristallisation von SeMet-CuvL verlief schneller. Bereits nach sechs Wochen konnte der erste SeMet-Kristall aus der Mikrotiterplatte #51 (G2) geerntet und vermessen werden. Dieser Kristall war kleiner als die bisher vermessenen CuvL-Kristalle und hatte eine rechteckige Quaderform. Da er nur eine unzureichende Auflösung von 6-5 Å erreichte, wurde ein zweiter SeMet-Kristall von der Mikrotiterplatte #59 (C9) gemessen, der eine hexagonal-bipyramidale Kristallform aufwies (Tab. 4.1). Dieser Kristall ergab schließlich eine Auflösung von ca. 2,7 Å und ist die Basis für das in dieser Arbeit beschriebene vorläufige Strukturmodell (Tab. 4.2).

Tabelle 4.2 Statistik der Beugungsdaten und Verfeinerung.

Beugungsdaten	
Raumgruppe	P6 ₅ 22
Elementarzelle a/b/c (Å)	135,6/135,6/335,5

Elementarzelle $\alpha/\beta/\gamma$ (°)	90/90/120
Auflösung (d_{\min}) (Å)*	48,11-2,68 (2,85-2,68)
Gesamtzahl der Reflexe	2014376
Unabhängige Reflexe	96250
Multiplizität (<i>redundancy</i>)	20,93
Vollständigkeit (<i>completeness</i>) (%)*	99,7 (88,59)
$I/\sigma(I)$ *	13,68 (0,48)
R_{meas} (%)*	22,7 (672,6)
$CC(1/2)$ *	99,9 (20,1)
Verfeinerung	
R_{work}	0,296
R_{free} **	0,34
Anzahl an Atomen	6138
Rmsd	
Bindungslänge (Å)	0,018
Bindungswinkel (°)	2,186

Die in Tab. 4.2 gezeigten Daten wurden von Dr. Berta Martin erhoben und zur Verfügung gestellt. *Werte für den höchsten Auflösungsbereich sind in Klammern angegeben. ** 5% nicht genutzte Reflexe.

4.1.3 Kristallstruktur

Die hier präsentierte Kristallstruktur von CuvL stellt das erste umfassende Proteinmodell einer trifunktionalen Synthetase der Klassen III und IV der Lanthipeptide dar.

Trotz der Cokristallisation mit SPPS-synthetisiertem *leader*-Peptid und AMP-PNP sind diese Substrate nicht in der Struktur zu sehen. In der Lyase-Bindetasche ist ein PO_4^{2-} -Ion und ein NO_3^- -Ion gebunden, welche vermutlich aus der Mutterlösung der Kristallisationsbedingung stammen (Tab. 4.1). Auch das Zn^{2+} -Ion in der Cyclasedomäne ist in der gegenwärtigen Elektronendichtekarte nicht zu sehen. Es besteht demnach der Bedarf an weiteren Kristallen, um die Lage der Substrate in der Struktur darzulegen und Fragen hinsichtlich der *leader*-Peptid-Bindestelle beantworten zu können. Der überwiegende Teil der Kristallstruktur ist

bereits modelliert (Dr. Berta Martin, Benjamin Röhl) , sodass künftige Kristallstrukturen mit der Patterson-Methode (*molecular replacement*) in relativ kurzer Zeit bestimmt werden können, um das Proteinmodell zu vervollständigen.

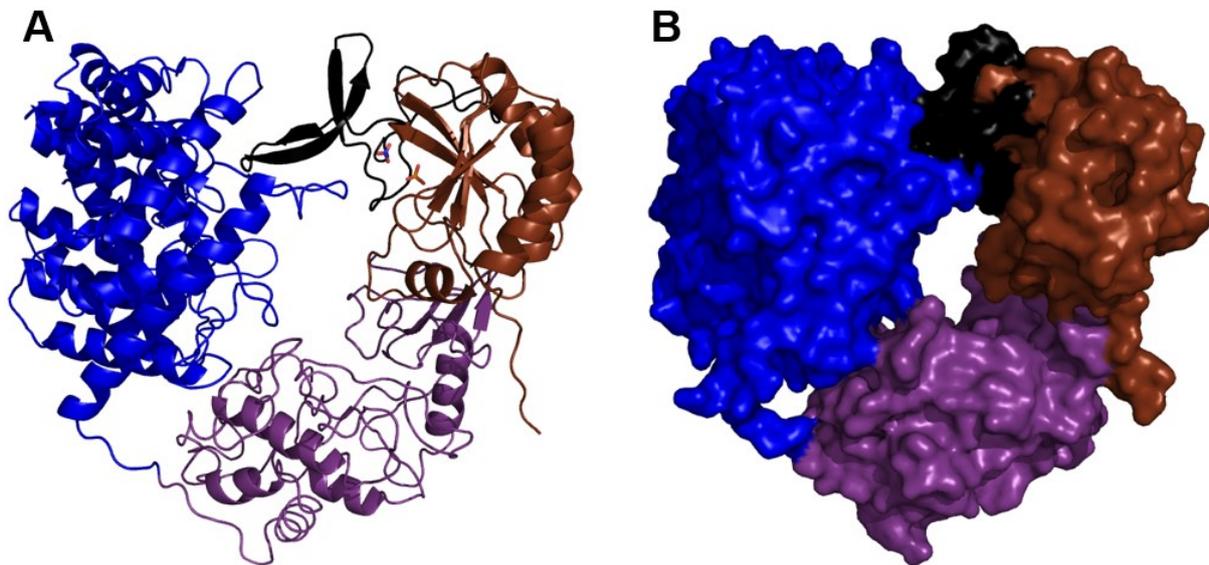


Abbildung 4.5 Kristallstruktur von CuvL.

(A) Darstellung der Sekundärstruktur. **(B)** Darstellung der Proteinoberfläche. Seitliche Ansicht der drei Domänen. In Blau ist die Cyclasedomäne dargestellt, die Kinasedomäne in Violett und die Lyasedomäne in Braun. Das β -turn- β -turn- β -Motiv der Lyasedomäne ist in Schwarz dargestellt.

Die Kristallstruktur zeigt eine Dreiecks-förmige Proteinstruktur mit je einer Domäne in den drei Eckpunkten. Im Übergang von der N-terminalen Lyasedomäne in die darauffolgende Kinasedomäne befindet sich ein distinktes β -turn- β -turn- β -Motiv, das eine Art Riegel-Funktion im nativen Protein einzunehmen scheint. Es fällt auf, dass das Motiv zwar in der Primärstruktur zwischen Lyase- und Kinasedomäne liegt, in der Tertiärstruktur jedoch einen flexiblen *linker* zwischen Lyase- und Cyclasedomäne bildet (Abb. 4.5). Innerhalb des Motivs liegen fast ausschließlich polare und geladene Aminosäuren vor, die bei Erkennung und Bindung des *leader*-Peptids eine Rolle spielen könnten. Vergleichbare putative Peptid-Bindemotive sind in CylM (*E. faecalis* Cytolysin Synthetase, PDB ID: 5DZT, s. 1.5.3, S. 18), NisB (*L. lactis* Nisin Dehydratase, PDB ID: 4WD9, s. 1.5.2, S.15) und LynD (*Lyngbya* sp. Cyanobactin Heterocyclase PDB ID: 4V1T) nachweisbar^{156,170,237}.

4.1.3.1 Lyasedomäne

Phosphothreonin-Lyasen wie OspF (PDB ID: 3I0U) und SpvC (PDB ID: 2Q8Y) katalysieren die β -Eliminierungsreaktion, welche die Phosphatgruppe von Phosphothreonin irreversibel

entfernt (Abb. 1.12). Dabei entsteht 2,3-Didehydrobutyrin (Dhb). Die Struktur der katalytischen Zentren beider Proteine weist große Ähnlichkeiten auf (Abb. 4.6 B,C). OspF aus *Shigella sp.* und SpvC aus *Salmonella sp.* zeigen eine hohe Homologie¹³⁵. Beide Proteine nehmen kompakte α/β -Strukturen ein. Das katalytische Zentrum ist durch ein siebensträngiges β -Faltblatt ($\beta 1$ - $\beta 7$) charakterisiert, das eine konkave Plattform für das Substrat bildet. Bei SpvC befinden sich an den Flanken und der Rückseite der β -Plattform neun α -Helices ($\alpha 1$ - $\alpha 9$). Die drei α -Helices an der Unterseite ($\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$) interagieren über hydrophobe Wechselwirkungen mit fünf der zentralen β -Stränge ($\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 4$) und stabilisieren so die Struktur. Die Seitenketten, die in die konkave Bindetaschen hineinreichen, sind weitestgehend positiv geladen und stellen somit ein optimales Milieu für die negativ geladenen Phosphatgruppen des Substrats dar (Abb. 4.6 C). Arginin- und Lysin-Seitenketten bilden Wasserstoffbrücken mit den Phosphatgruppen des Substrats und stabilisieren sie so während, und vermutlich nach, der enzymatischen Reaktion (Abb. 4.6 F).

Ein weiteres Lysin K136 erwies sich in Substitutions-Studien als essentiell für die Lyasefunktion²³⁸ (Abb. 4.6 F, Abb. A16). Mit einiger Wahrscheinlichkeit fungiert K136 als katalytische Base, die das α -Proton abstrahiert und ist somit äquivalent zu K80 bei VenL (Abb. 1.12). Durch *in silico* Modellierung der CuvL-Lyasedomäne auf Basis der SpvC-Struktur mit Hilfe des SWISS-MODEL Algorithmus²¹⁹ wurde für CuvL das äquivalente Lysin K79 identifiziert (Abb. A16). Tatsächlich konnte *in vitro* gezeigt werden, dass K79 bei CuvL ebenfalls essentiell für die Lyasefunktion ist (s. 4.2.3, S. 89, Abb. A1, A2).

OspF und SpvC unterscheiden sich in erster Linie in der Anzahl und relativen Lage der α -Helices, wobei der Vergleich der Strukturen von SpvC mit gebundenem Substrat und OspF in ungebundenem Zustand nur bedingt aussagekräftig ist²³⁸.

Die CuvL-Lyasedomäne ist wesentlich kleiner als OspF und SpvC. Im Kontext der Trifunktionalität von CuvL werden funktionelle Aufgaben der fehlenden Strukturen vermutlich von Bestandteilen der anderen Domänen übernommen. Die Struktur zeigt ein siebensträngiges β -Faltblatt ($\beta 1$ - $\beta 7$), das eine ähnliche β -Plattform wie bei OspF und SpvC bildet. Vier distinkte α -Helices liegen hinter und neben der konkaven Bindetasche zur Unterstützung der Stabilität (Abb. 4.6 A). Die Seitenketten, die in die Bindetasche hereinragen, sind in erster Linie basisch und könnten Wasserstoffbrücken oder Salzbrücken bilden.

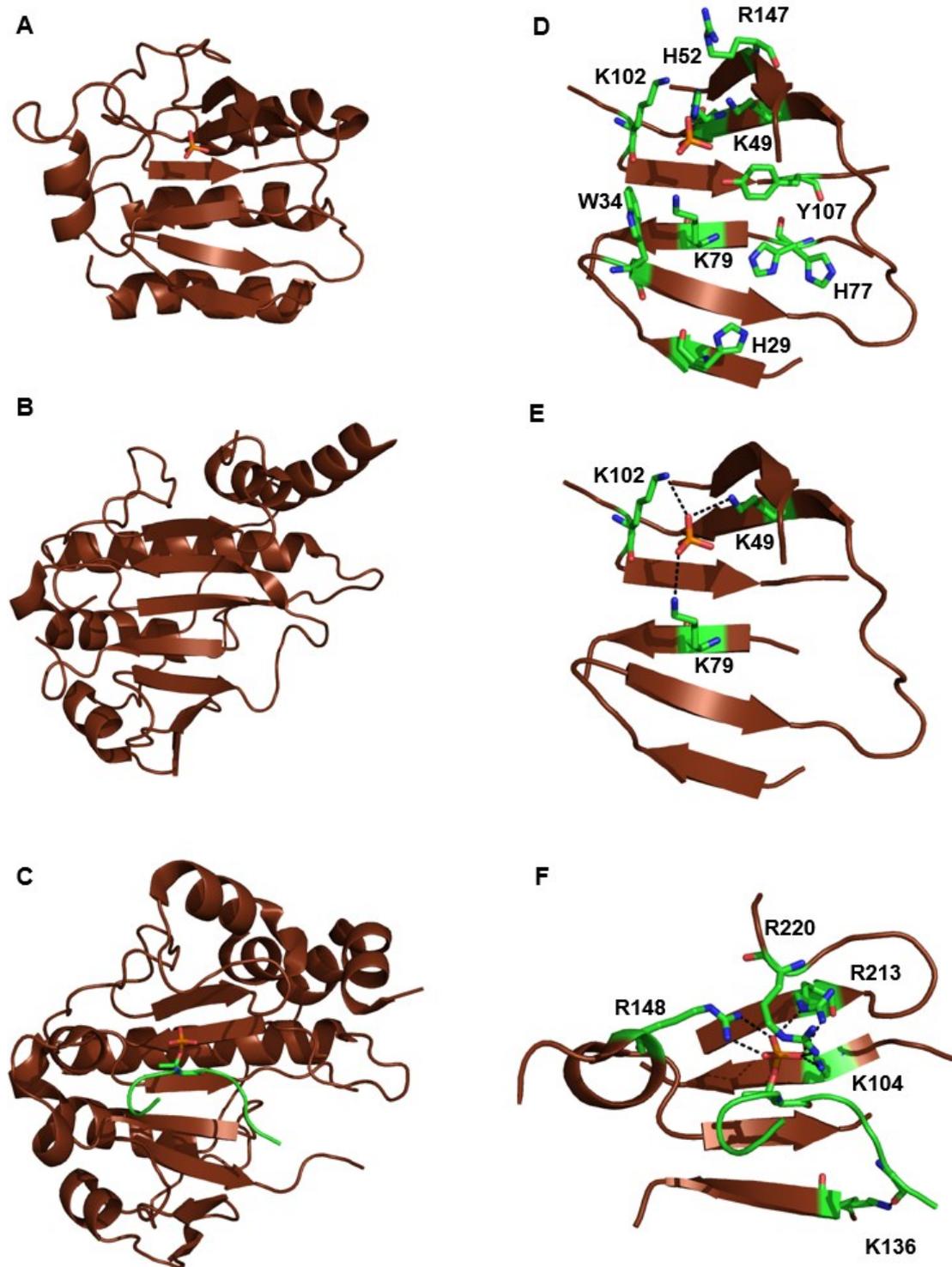


Abbildung 4.6 Vergleichende Betrachtung der Lyasedomäne verschiedener Proteine mit CuvL.

(A) CuvL-Lyasedomäne mit Phosphatgruppe (gelb-rotes Stabmodell in der Mitte) (B) Phosphothreonin-Lyase OspF (PDB ID: 3IOU) (C) Phosphothreonin-Lyase SpvC mit gebundenem Phosphopeptid-Substrat (PDB ID: 2Q8Y) (D) Peptid-Bindetasche der CuvL Lyasedomäne mit potentiell für die Bindung wichtigen Aminosäuren. Die Position von H77 ist in der Elektronendichtekarte nicht eindeutig definiert, daher sind hier zwei mögliche Positionen dargestellt. (E) Peptid-Bindetasche der CuvL-Lyasedomäne mit drei Lysin-Seitenketten, die möglicherweise die Phosphatgruppe koordinieren (F) SpvC Peptidbindetasche mit drei Arginin- und einer Lysin-Seitenkette, die die Phosphatgruppe des Phosphopeptid-Substrats koordinieren.

Einige aromatische Aminosäuren könnten über π - π -Wechselwirkung zu einer Bindung des Substrates beitragen (Abb. 4.6 D). Das Phosphat-Ion in der Bindetasche wird stabilisiert durch drei Lysine (K49, K79, K101), ähnlich wie in SpvC (Abb. 4.6 E,F).

4.1.3.2 Kinasedomäne

Von den drei Domänen ist die Elektronendichtekarte der Kinasedomäne am wenigsten definiert. Das führt dazu, dass ein Großteil der Domäne ungeordnet zu sein scheint. Das bei der Kristallisation zugegebene AMP-PNP ist nicht sichtbar. Die Nichtbindung des Cofaktors ist ein naheliegender Grund für die ungeordnete Struktur der Domäne. Womöglich ist der Grund für die Nichtbindung, dass der Kristallisationsbedingung keine zusätzlichen Magnesiumionen beigegeben wurden und dadurch in der Bindestelle nicht das erforderliche Milieu vorherrschte.

Trotzdem lassen sich im direkten Vergleich mit der gut untersuchten Ser/Thr-Proteinkinase (STPK) PknB (PDB ID: 1O6Y) aus *Mycobacterium tuberculosis* Gemeinsamkeiten erkennen (Abb. 4.7). PknB ist in zwei Regionen (*lobes*) geteilt^{204,205,239}. Während die C-terminale Region von einer Reihe von sieben α -Helices beherrscht wird, besteht die N-terminale Region aus einem fünfsträngigen β -Faltblatt, das von einer weiteren α -Helix (Helix C) stabilisiert wird. Helix C ist weiterhin als regulatorisches Element eingebunden in die Aktivierung und Inaktivierung der Kinaseaktivität²⁴⁰. Die katalytische Bindetasche für das Nukleotid befindet sich an der Grenzfläche der beiden Regionen (Abb. 4.7 A).

In der CuvL-Struktur sind in der N-terminalen Region drei β -Stränge mit der stabilisierenden Helix C definiert. Außerdem sind drei α -Helices in der C-terminalen Region definiert (Abb. 4.7 C). Bei näherer Betrachtung des katalytischen Zentrums zeigt sich die Bindung des Nukleotids bei PknB abhängig von den im Vorfeld beschriebenen Zentren (s. 1.5.4, S. 21). Die glycinreiche P-Schleife stabilisiert die Phosphat-Abgangsgruppe des Nukleotids, das DFG-Motiv unterstützt die Koordination der Mg^{2+} -Ionen und die katalytische Schleife mit je einem konservierten Asparagin und Aspartat befindet sich für die Reaktion in direkter Nähe^{204,205} (Abb. 4.7 B). Eine ähnliche räumliche Nähe lässt sich auch im vorliegenden CuvL-Modell zeigen (Abb. 4.7 D), trotz der ungeordneten Struktur in diesem Bereich. Die signifikante Ähnlichkeit in der Struktur der beiden Proteine lässt sich auch über Sequenzvergleiche mit der Klasse IV-Synthetase VenL und der Klasse III-Synthetase CurKC zeigen (Abb. A3).

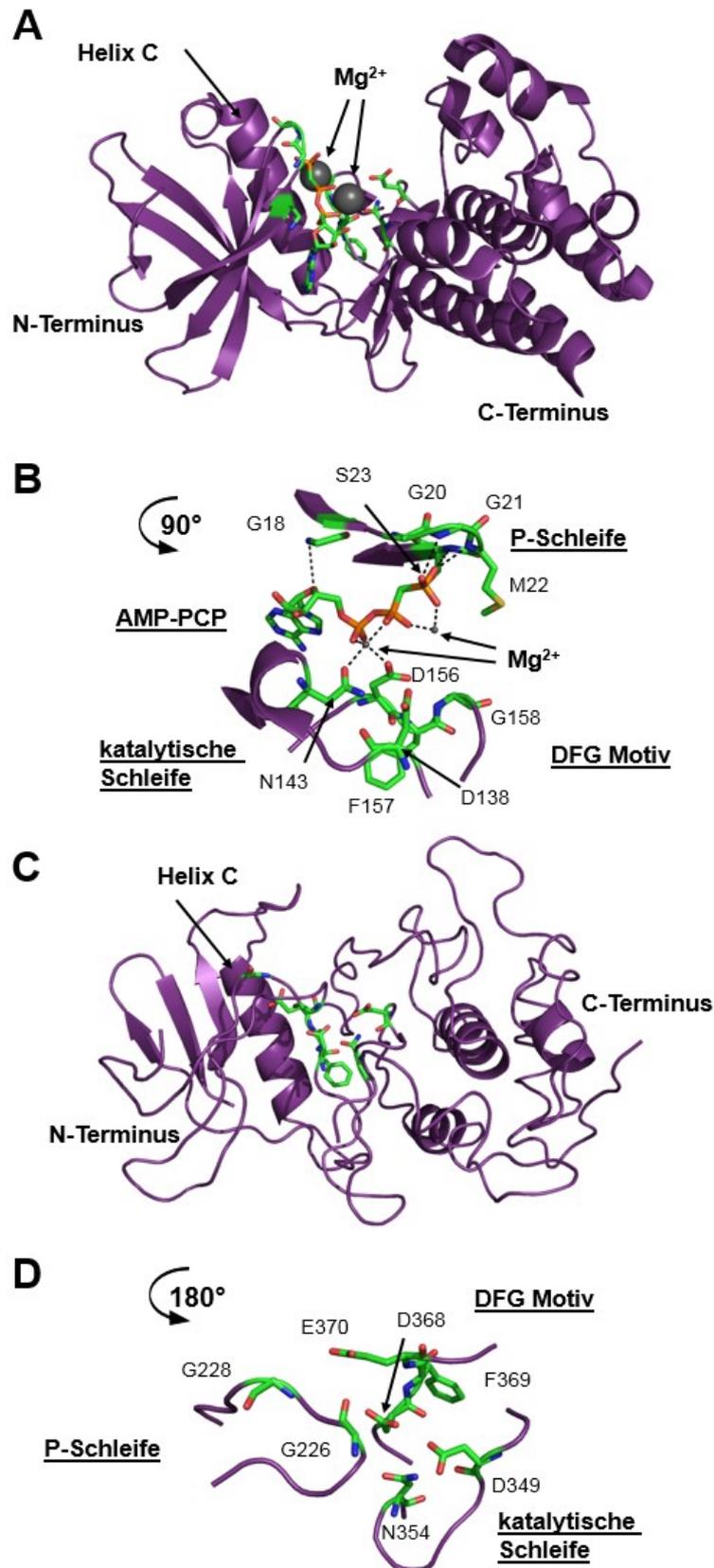


Abbildung 4.7 Vergleichende Betrachtung der Kinasedomäne.

(A) Struktur der Ser/Thr-Kinase PknB mit gebundenem Cofaktor AMP-PCP und zwei gebundenen Mg²⁺-Ionen (PDB ID: 1O6Y). **(B)** Organisation des katalytischen Zentrums von PknB, Detailansicht nach 90° Drehung der Struktur in (A). **(C)** Modell der CuvL-Kinasedomäne. **(D)** Potentielle Organisation im katalytischen Zentrum der CuvL-Kinasedomäne, Detailansicht nach 180° Drehung der Struktur in (C).

4.1.3.3 Cyclasedomäne

NisC-ähnliche Proteine bilden sogenannte α,α -Fass-Strukturen. Dabei sind eine Anzahl α -Helices so angeordnet, dass sie eine reifenartige Struktur bilden (Abb. 4.8 C). Bei NisC bilden sieben lange α -Helices den äußeren Ring. Sieben kleinere α -Helices liegen im Inneren der Struktur, während sieben distinkte Schleifen (*loops*) in den Kern des Fasses zeigen (PDB ID: 2G02).

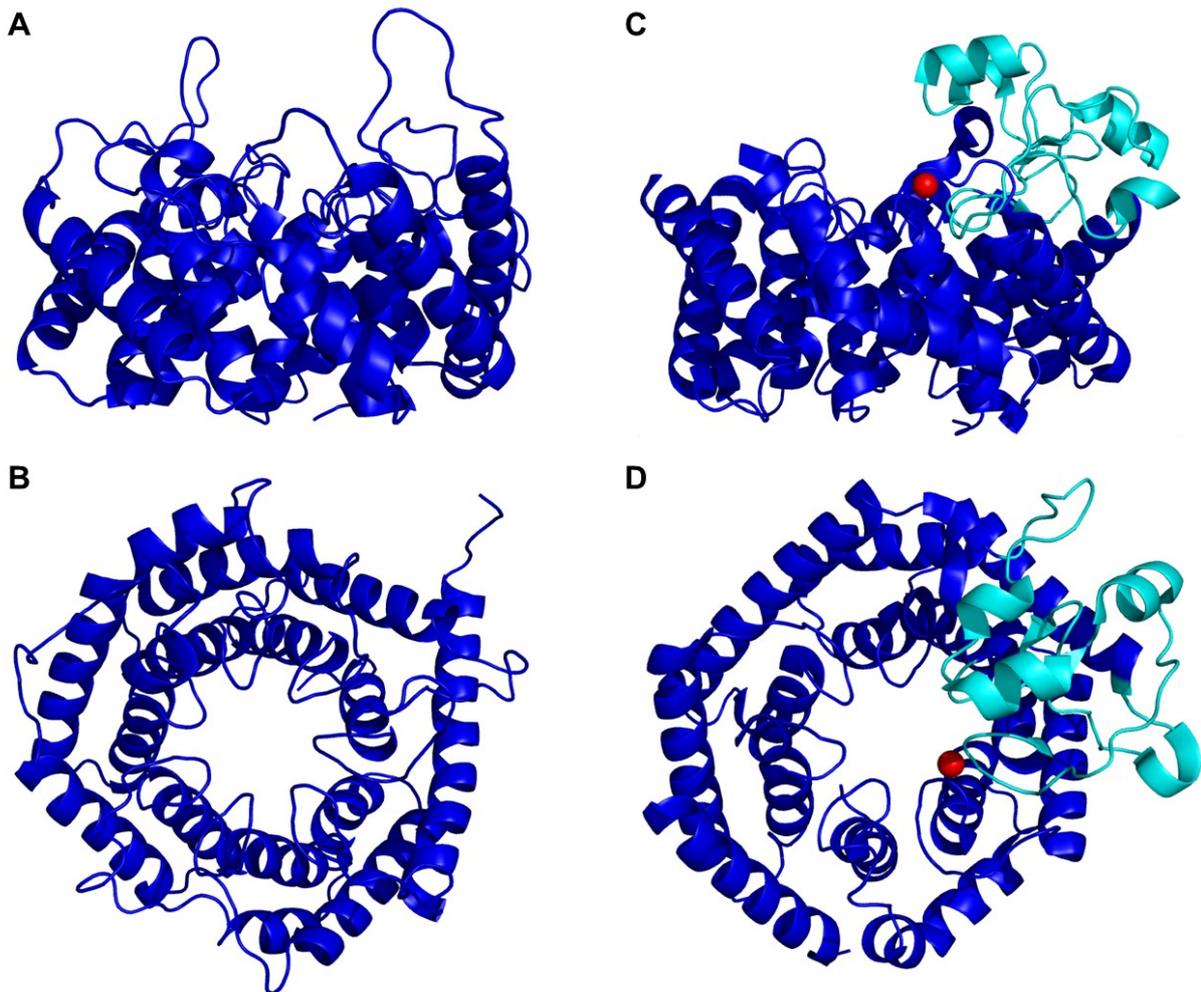


Abbildung 4.8 Vergleichende Betrachtung der Cyclasedomäne.

(A) Seitenansicht der CuvL-Cyclasedomäne (B) Aufsicht auf die Fassstruktur der CuvL-Cyclasedomäne (C) Seitenansicht von NisC mit der SH2-ähnlichen Domäne in Cyan und Zn²⁺-Ion in Rot (D) Aufsicht auf die Fassstruktur von NisC mit der SH2-ähnlichen Domäne in Cyan und Zn²⁺-Ion in Rot (PDB ID: 2G02).

Das charakteristische Zn²⁺-Ion wird koordiniert von zwei Aminosäuren in einer dieser Schleifen und einer Aminosäure in der benachbarten Schleife (Abb. 4.8 D). NisC als monofunktionales Protein verfügt oberhalb der katalytischen Tasche über ein internes SH2-ähnliches Motiv, das die Substratbindung vermittelt¹²⁹ (Abb. 4.8 C,D).

Die CuvL-Cyclasedomäne zeigt große Ähnlichkeit mit NisC. Ein SH2-ähnliches Motiv fehlt jedoch, vermutlich weil die Peptidbindung im trifunktionalen CuvL durch andere Mechanismen erfolgt. Weiterhin auffällig ist der größere Anteil ungeordneter Bereiche oberhalb der α,α -Fass-Struktur (Abb. 4.8 A,B). Dies können flexible Verbindungsstücke sein, die mit dem Substrat oder mit den übrigen Domänen während der Katalyse kommunizieren.

4.2 Charakterisierung der CuvL-Funktion *in vitro*

4.2.1 Isolierung von CuvA

In der Anfangsphase des Projektes war die Isolierung der, für *in vitro* Experimente benötigten Peptide als Kooperationsleistung geplant. Das Vorläufer-Peptid sollte durch SPPS von einem darin erfahrenen Chemiker der Arbeitsgruppe hergestellt werden. Die Klonierung und Isolierung der Synthetase, die Aufreinigung der SPPS-Peptide und die Durchführung und Auswertung der *in vitro*-Experimente oblag der Biologenabteilung der Arbeitsgruppe. In einer Reihe erfolgreicher Projekte wurde eine solche Kooperation bereits durchgeführt. Dafür synthetisierte Vorläufer-Peptide hatten eine Länge zwischen 36 und 50 Aminosäuren und zeigten nach Aufreinigung durch präparative HPLC eine ausreichend gute Reinheit^{141,192–195,198}.

Die chemische Synthese von CuvA Vorläufer-Peptiden war aufgrund verschiedener Probleme jedoch nicht zielführend. Zum einen war die Reinheit der Peptide nicht ausreichend für *in vitro* Experimente. Nach der präparativen HPLC-Reinigung der SPPS Peptide zeigten sich schon Nebenprodukte. Die Auswertung erster *in vitro* Experimente zeigte eine noch größere Anzahl an Nebenprodukten (Abb. A5). Ein Teil dieser Nebenprodukte sind vermutlich dem Umstand geschuldet, dass CuvA mit 51 Aminosäuren ein recht langes Peptid für SPPS ist. Bei der 50-stufigen Synthese können in jedem Schritt Fehler auftreten und eine Trennung kleinerer Peptidbruchstücke durch die präparative HPLC ist kaum möglich. Die Größe kann jedoch nicht als alleiniger Grund für das Scheitern gelten, da beispielsweise das 50 Aminosäuren große Stackeptin in der notwendigen Reinheit durch SPPS synthetisiert werden konnte¹⁴¹.

Ein wichtiger Unterschied jedoch liegt in der Anzahl enthaltener Aspartate und der darauf folgenden Aminosäuren. Stackeptine verfügen über zwei Aspartate, worauf jeweils ein Leucin folgt (N-[DL]-C)¹⁴¹. Bei den Labyrinthopeptinen kommen zwei Aspartate in LabA2 vor, auf die je in Valin bzw. ein Tryptophan folgen (N-[DV]-C, N-[DW]-C). In LabA1/A3 findet sich nur ein Aspartat, auf das ein Leucin folgt (N-[DL]-C)¹². Bei den Curvoeptinen kommen zwei Aspartate vor, auf die je ein Leucin und ein Lysin folgen (N-[DL]-C, N-[DK]-C)¹⁹⁸. Bei den Curvocidinen hingegen kommen vier Aspartate vor, von denen zwei im *leader*-Peptid liegen und auf die je ein Alanin folgt (N-[DA]-C) und zwei benachbarte Aspartate nahe des C-Terminus im *core*-Peptid, gefolgt von einem Pheylalanin (N-[DDF]-C). Studien zu Aspartamid-Bildung in

Fmoc-basierter SPPS haben gezeigt, dass besonders Glycine und Alanine, die auf Aspartat folgen, eine Aspartamidbildung fördern. An diesen Aspartamiden kann im nächsten Schritt eine Addition von Piperidin, dann auch Piperidid genannt erfolgen²⁴¹⁻²⁴⁴.

Mehr als die Hälfte der durch SPPS synthetisierten vollständigen CuvA Vorläufer-Peptide zeigen vermutlich aus diesen Gründen entweder eine oder zwei Piperidid-Bildungen (Abb. A5, Synthesen durch Eric van Herwerden, Bianca Schmid). Diese unerwünschte Nebenreaktion während der Synthese kann in der Folge zu einer Reihe weiterer Schwierigkeiten im weiteren Verlauf der SPPS führen.

Letztlich ließ sich das Problem von Seiten der Kooperationspartner auch nach einer ganzen Reihe von Strategien nicht lösen und die Alternativroute der heterologen Expression der Peptide wurde eingeschlagen. Hierfür wurde zunächst versucht, das *cuvA*-Gen in den Überexpressionsvektor pET28a(+)-TEV zu klonieren. Jedoch konnte auch durch zahlreiche Optimierungsbemühungen kein PCR-Amplicon isoliert werden. Das kann zum einen an dem relativ hohen GC-Gehalt liegen, der im Bereich der 5'- und 3'-Enden des Gens bei annähernd 70% liegt und dadurch die Bindung der Oligonukleotide deutlich erschwert und behindert. Zum anderen ist die Detektion des Amplicons mit etwa 150 nt auf einem Agarosegel problematisch, vor allem bei geringeren Konzentrationen.

Mithilfe eines synthetischen, für *E. coli* Codon-optimierten Gens ließ sich die Klonierung des Überexpressionsvektors schließlich bewerkstelligen. Bei der gezielten Expression von Peptiden (His₆-TEV-CuvA, 74 Aminosäuren, MW 7953,7) müssen Besonderheiten gegenüber einer Protein-Überexpression beachtet werden. Kurze rekombinante Peptide werden von ubiquitären, *E. coli*-produzierten proteolytischen Enzymen rasch hydrolysiert²⁴⁵. Alternativ werden sie in unlöslicher Form in kleine Membranvesikel, sogenannte *inclusion bodies*, eingeschlossen, was eine Art Selbstschutzmechanismus der Zelle gegenüber potentiell toxischer Überexpression darstellt. Solche *inclusion bodies* können aufgereinigt und mit einer hohen Konzentration an Denaturierungsmitteln, etwa 6 M Guanidinhydrochlorid oder 8 M Harnstoff aufgeschlossen werden, um ihren Inhalt freizusetzen. Durch ein stufenweises Herabsetzen der Denaturierungsmittel-Konzentration können die Peptide dann wieder korrekt zurückgefaltet werden²⁴⁶.

Die Strategie zur Reduktion der Proteolyseaktivität bei gleichzeitiger Maximierung der *inclusion body*-Produktion bestand in einer relativ starken Induktion des Expressionsvektors

mit bis zu 1 mM IPTG und einer kurzen Expressionsdauer von lediglich fünf Stunden im Temperaturoptimum von 37°C (im Gegensatz zur Proteinexpression, die für 18 Stunden bei 18°C durchgeführt wurde). Der Zellaufschluss erfolgte im Homogenisator, sodass die *inclusion bodies* freigesetzt wurden. Für die Denaturierung wurde eine gepufferte Lösung mit 6 M Guanidin verwendet. Die freigesetzten His₆-TEV-CuvA-Peptide wurden im Anschluss an eine NiNTA-Säule gebunden (IMAC). Durch Elution mit einem 4 M Guanidin enthaltenen Puffer wurde die Rückfaltung der Peptide initialisiert. Zur vollständigen Rückfaltung und zum Zweck der Umpufferung wurde das Eluat über eine C4-Säule einer präparativen HPLC weiter aufgereinigt (Abb. A6-A8). Die HPLC-Faktionen wurden in der Regel einzeln durch HPLC-ESI-MS auf ihre Reinheit überprüft und reinsten Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert (Abb. 4.9).

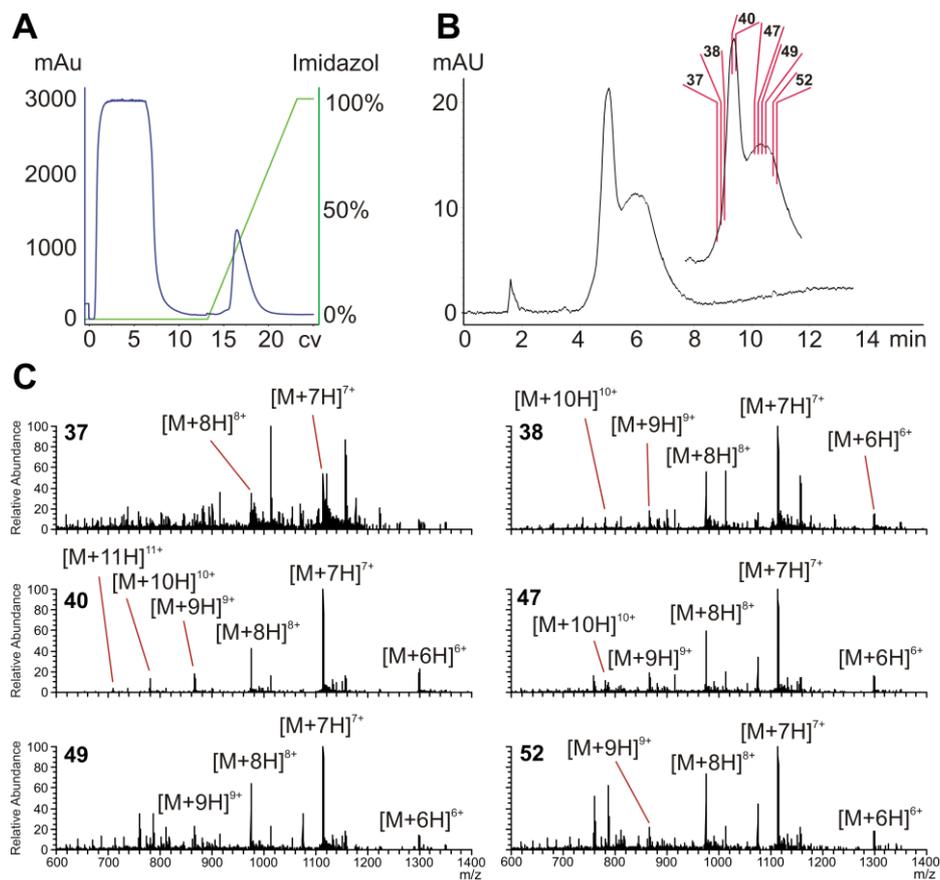


Abbildung 4.9 Exemplarische Darstellung der Aufreinigung des rekombinanten CuvA-T2A-Peptids. **(A)** FPLC-Chromatogramm der NiNTA IMAC von CuvA-T2A. **(B)** Präparatives HPLC-Chromatogramm, Signal bei $\lambda=215$ nm. Separat gekennzeichnet sind die Fraktionen der in (C) dargestellten HPLC-ESI-MS-Profilen. **(C)** Ausgewählte HPLC-ESI-MS Profile zur Reinheitsprüfung der Peptidprobe. Die Probe 40 weist eine ausreichende Reinheit für *in vitro* Experimente auf. Die Proben 41-47 zeigen eine ausreichende Reinheit und wurden für Vorversuche verwendet. Die Proben 37-39 und 48-52 weisen zu viele Verunreinigungen auf und wurden nicht verwendet.

4.2.2 Optimierung der *in vitro* Assay-Bedingungen

Initiale Experimente ergaben, dass CuvL unter den gegebenen Bedingungen bis zu vier Dehydratisierungen vornimmt (Abb. 4.10, A5). Im CuvA *core*-Peptid liegen vier Threonine und zwei Serine vor. Vorangegangene HPLC-ESI-MS/MS-Untersuchungen an dem *in vivo* detektierten Curvocidin hatten eindeutig gezeigt, dass neben den drei MeLan-Brücken keine weiteren Dehydroaminosäuren im nativen *core*-Peptid vorliegen. Bei anderen Lanthipeptiden, wie beispielsweise dem Klasse III-Vertreter Erythreapeptin finden sich im gereiften *core*-Peptid neben den Lanthionin- und Labioninbrücken sowohl dehydratisierte Serine (Dha) als auch dehydratisierte Threonine (Dhb)¹⁹⁷.

Bei Curvocidin bildet das Threonin an Position 11 (T11) gemeinsam mit dem Cystein an Position 6 (C6) die C-Ring-MeLan-Brücke und das Threonin an Position 19 (T19) bildet mit dem Cystein an Position 3 (C3) die A-Ring-MeLan-Brücke. Am N-Terminus des *core*-Peptids befinden sich zwei Threonine an den Positionen 2 (T2) und 4 (T4), wobei T4 dehydratisiert und mit dem Cystein an Position 14 (C14) Bestandteil der B-Ring-MeLan-Brücke wird, während T2 nicht dehydratisiert wird (Abb. 1.13, S.29).

Unter *in vitro*-Bedingungen allerdings scheint CuvL dennoch T2 zu einem gewissen Grad zu dehydratisieren. Auch die Dehydratisierung eines Serins wäre möglich. Die Venezuelin-Synthetase beispielsweise katalysiert sowohl Lan- als auch MeLan-Brücken^{134–136}. Demnach scheint es sich um ein Artefakt der gegebenen *in vitro*-Bedingungen zu handeln.

Um dies zu bestätigen wurde zunächst mit Iodacetamid (IAA) ein Cyclisierungstest durchgeführt. Iodacetamid bindet die Thiolseitenketten von Cystein²²³. Nach der Brückenbildung sind diese Thiole nicht mehr frei für eine Bindung. Der Cyclisierungstest zeigt, dass drei Brücken gebildet wurden (Abb. 4.10). Im nächsten Schritt wurde durch Punktmutation T2 gegen Alanin ausgetauscht (T2A) und die *in vitro* Modifikation wiederholt.

Durch diese Mutation kam eine vierte Dehydratisierung nicht mehr vor, während weiterhin drei Brücken gebildet wurden (Abb. A9). Anhand dieser Ergebnisse lässt sich ausschließen, dass eines der Serine anstelle von T2 dehydratisiert wird. Weiterhin lässt sich ausschließen, dass T2 essentiell für die Katalyse ist oder gar selbst an einer alternativen Brückenbildung beteiligt ist.

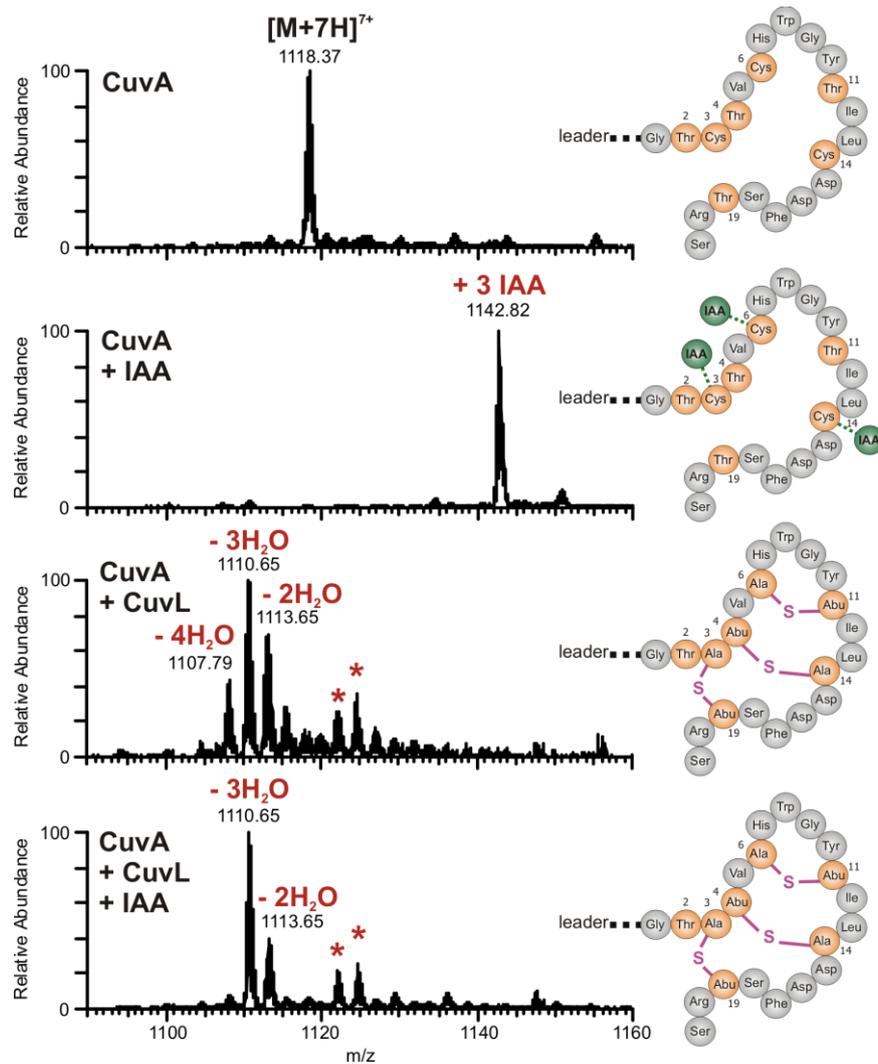


Abbildung 4.10 Aktivitäts- und Cyclisierungsassay.

Rekombinantes Vorläufer-Peptid His₆-TEV-CuvA nach Inkubation mit rekombinatem CuvL, dATP (Abb. 4.11) und Mg²⁺-Ionen, gefolgt von HPLC-ESI-MS. Dargestellt ist, neben dem Massenspektrum, ein Modell der in diesem Spektrum abundantesten Peptidspezies. IAA: Iodacetamid, Sternchen*: phosphorylierte Peptidspezies, Abu-S-Ala: MeLan-Brücke.

Um dieses Artefakt einer vierten Dehydratisierung zu vermeiden, wurden für alle weiteren *in vitro* Experimente ausschließlich Vorläufer-Peptide verwendet, bei denen die T2A-Mutation eingeführt wurde.

Weiterhin wurden immer wieder phosphorylierte Intermediat-Spezies detektiert. Auch hierbei scheint es sich um ein Artefakt der *in vitro*-Bedingungen zu handeln. Um dies zu bestätigen, wurde die Dehydratisierungsreaktion des Assays im Zeitverlauf verfolgt. Durch Stoppen einer Reaktion nach unterschiedlichen Zeitpunkten konnte deutlich gezeigt werden, dass sich die phosphorylierten Spezies akkumulieren, je länger die Reaktion andauert (Abb. A10).

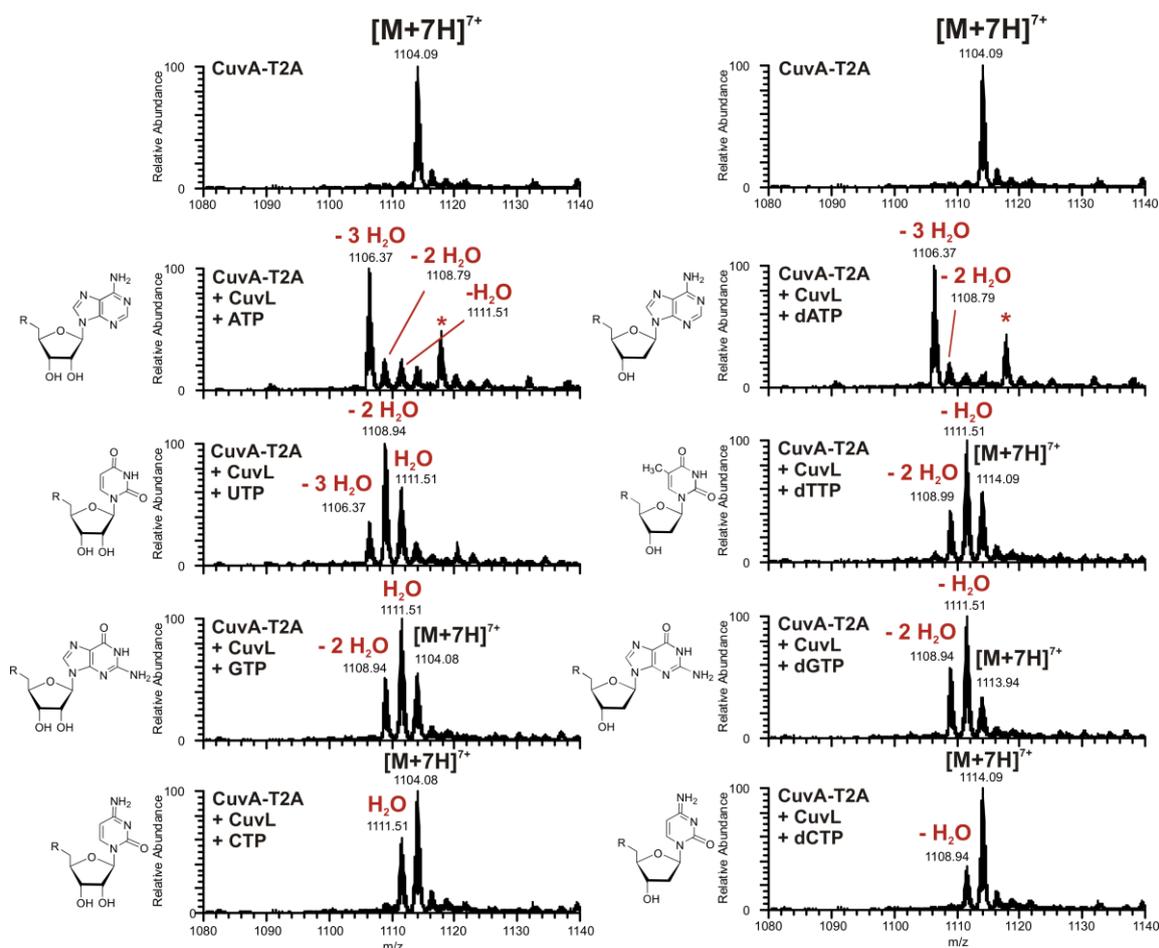


Abbildung 4.11 Curvolidin Aktivitätssassays mit verschiedenen Cofaktoren.

Rekombinantes Vorläufer-Peptid His₆-TEV-CuvA-T2A, inkubiert mit CuvL, Mg²⁺ und unterschiedlichen Nukleotid-Cofaktoren als Phosphatgruppendonator. Die Reaktionen wurden alle zum selben Zeitpunkt durch die Zugabe von MeCN (finale Konzentration 50% v/v) abgebrochen. Der unterschiedliche Grad der vollständigen Dehydratisierung (-3H₂O) zeigt die unterschiedliche Akzeptanz der Dehydratase für den jeweiligen Phosphatgruppendonator: (d)ATP zeigt das optimale Ergebnis, UTP ist weniger effektiv, zeigt aber auch noch drei Dehydratisierungen, dTTP und (d)GTP führt zu bereits stark eingeschränkter Aktivität, drei Dehydratisierungen kommen hier nicht mehr vor, (d)CTP zeigt nur noch residuale Aktivität. (Sternchen*: phosphorylierte Peptidspezies)

Unter den bisher untersuchten Klasse II-Lanthipeptiden verwenden alle Synthetasen für die Dehydratisierung ATP als Phosphat-Donor. Bei den Klasse III-Lanthipeptiden verhält es sich anders. Die Synthetasen AriKC und CurKC akzeptieren alle Nukleotide als Phosphat-Donoren, während StaKC alle akzeptiert, aber eine deutliche Präferenz für Purin-Nukleotide zeigt^{141,196,247}. Die Synthetase der Labyrinthopeptide LabKC auf der anderen Seite akzeptiert streng spezifisch nur dGTP und GTP¹⁹² und ist demnach mechanistisch, wenn auch nicht funktionell, als G-Protein einzustufen.

Ein solches Cofaktor-*screening* wurde auch für CuvL durchgeführt. Es zeigte sich eine gewisse Akzeptanz für alle getesteten Nukleotide mit einer deutlichen Präferenz für dATP und ATP. Auch wurde deutlich, dass dCTP und CTP nur sehr schlecht akzeptiert wurde (Abb. 4.11). Eine Präferenz anhand der Nukleotidstruktur, wie bei StaKC lässt sich daraus jedoch nicht ableiten. Für alle weiteren *in vitro* Experimente wurde (d)ATP als Cofaktor gewählt.

4.2.3 Modell des Biosynthesewegs

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass *in vitro*-Experimente einen guten Einblick in den enzymatischen Mechanismus von Lanthipeptid-Biosynthesen liefern können^{159,179,194,195}. Dieser Ansatz wurde daher auch im Rahmen dieser Arbeit verfolgt und darauf aufbauend wurde ein Modell des Biosynthesewegs für Curvolidin erstellt (Abb. 4.12).

Als erster Schritt unerlässlich ist die Bindung aller erforderlichen Cofaktoren an CuvL, zusätzlich zur Bindung des Substrates CuvA. Bei anderen Klasse IV-Synthetasen konnte gezeigt werden, dass Bereiche innerhalb des Substrat *leader*-Peptids initial von der Kinasedomäne gebunden werden¹³⁶.

Für den Biosyntheseweg der drei MeLan-Brücken stellt sich nun die zentrale Frage nach der Direktionalität. Verschiedene Studien an weitestgehend linearen Lanthipeptiden der Klassen I, II und III haben durch *in vitro*-Experimente bereits zeigen können, dass sowohl N->C- (Klassen I und II, s. 1.5.2, S. 15, s. 1.5.3, S. 18), als auch C->N- (Klasse III, Abschnitt 1.5.4) Direktionalitäten vorkommen^{159,179,194,195}. Für globuläre Lanthipeptide wie Cinnamycin, Venezuelin oder Curvolidin, bei denen die Verbrückungen überlappend hintereinander geschaltet sind, wurden solche Untersuchungen bisher noch nicht unternommen. Von N->C oder C->N kann hier nicht ausgegangen werden, da C-terminale Aminosäuren über eine Verbrückung mit N-terminalen Aminosäuren verbunden ist und alle weiteren Brücken innerhalb des so entstandenen Makrocyclus liegen.

Eine Reihe von *in vitro*-Experimenten mit mutierten Curvolidin Vorläufer-Peptiden lässt den Schluss zu, dass zuerst die mittlere MeLan-Brücke zwischen T4 und C14 gebildet wird, gefolgt von der A-Ring MeLan-Brücke zwischen T19 und C3. Als letztes wird die C-Ring MeLan-Brücke zwischen T11 und C6 gebildet (Abb. 4.13).

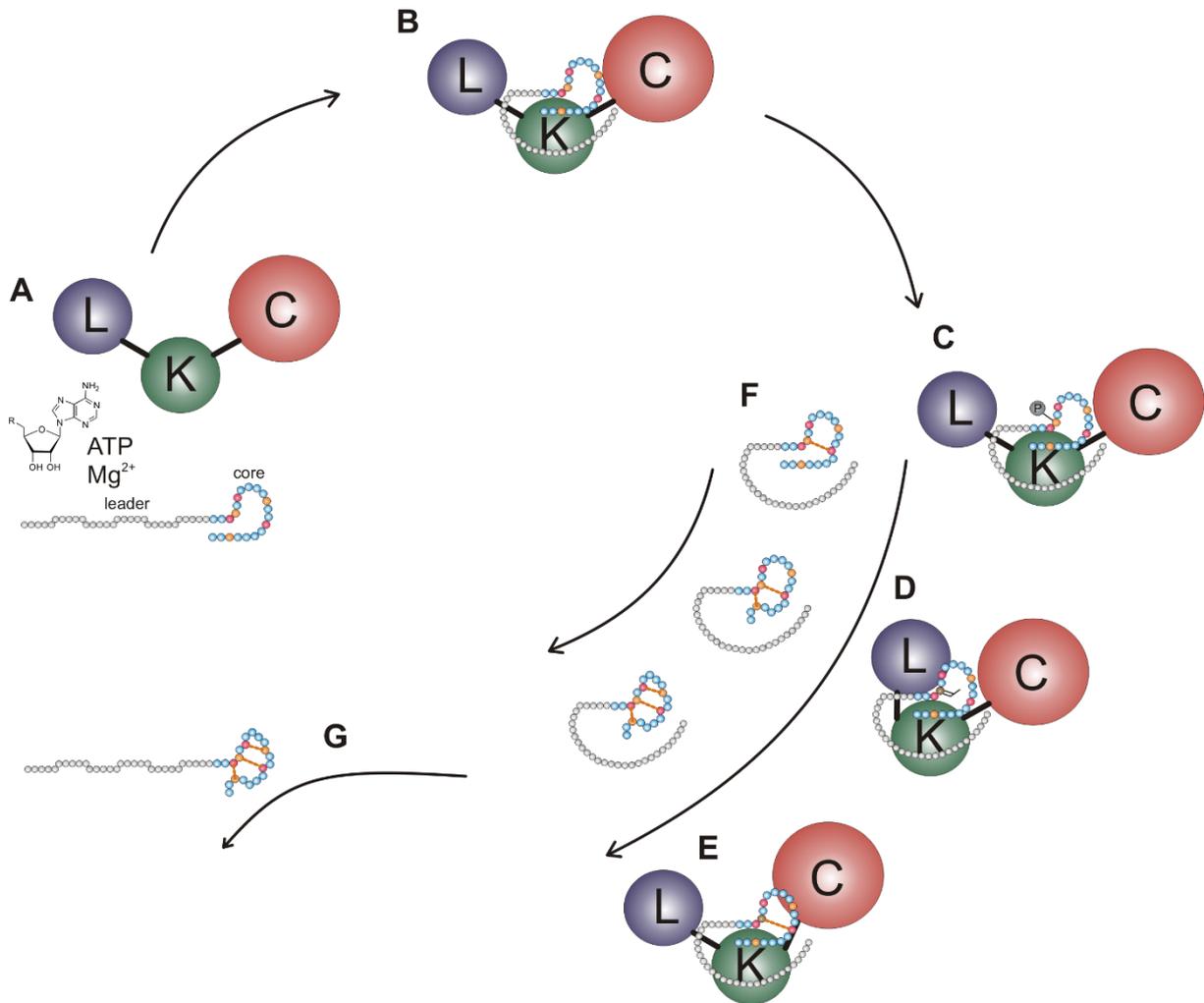


Abbildung 4.12 Biosynthesemodell für die Reifung von Curvolidin durch die CuvL-Synthetase.

Die CuvL-Domänen werden durch die Kugeln repräsentiert: (L) Lyasedomäne (K) Kinasedomäne (C) Cyclasedomäne. (A) CuvL bindet das Curvolidin Vorläufer-Peptid und die Cofaktoren ATP und Mg²⁺. (B) das *leader*-Peptid des Curvolidin Vorläufer-Peptids wird von der Kinasedomäne erkannt und gebunden. (C) Die Kinasedomäne phosphoryliert (P: Phosphatgruppe) das erste Threonin. (D) Die Lyasedomäne dehydratisiert die phosphorylierte Threonin-Seitenkette. (E) Die Cyclasedomäne vollendet die MeLan Brückenbildung durch eine Michael-Addition mit anschließender Protonierung. (F) Zuerst wird die T4C14-Brücke, dann die T19C3-Brücke und zuletzt die T11C6-Brücke synthetisiert. (G) Das modifizierte Curvolidin wird entlassen, die Abspaltung des *leader*-Peptids geschieht an anderer Stelle.

Durch zielgerichtete Mutagenese wurden Curvolidin Vorläufer-Peptide hergestellt und aufgereinigt, bei denen jeweils eines der an einer MeLan-Brücke beteiligten Threonine gegen Alanin ausgetauscht war. Diese Peptide wurden *in vitro* modifiziert, durch die native Synthetase CuvL und durch eine Variante von CuvL mit einer Punktmutation in der Lyasedomäne (CuvL-K79A), die nachweislich die Abspaltung der Phosphatgruppe verhindert (Abb. 4.13, A1, A2). Durch die Zugabe von Iodacetamid nach der Modifizierungsreaktion wurde die Bildung von MeLan-Brücken überprüft (Abb. 4.13). Aus dem direkten Vergleich der

Reaktionen lassen sich Prinzipien für die Beeinträchtigung der Syntheseleistung von CuvL ableiten.

Am wenigsten beeinträchtigt wird CuvL durch einen Austausch des C-Ring MeLan-Threonins T11. Die Massen zeigen, dass CuvL zwei Dehydratisierungen und zwei MeLan-Brückenbildungen synthetisiert hat. Durch Beeinträchtigung der Lyasedomäne-Funktion zeigen sich bis zu zwei Phosphorylierungen (Abb. 4.13 D, A1, A11).

Etwas stärker behindert wird die Syntheseleistung von CuvL durch den Austausch des A-Ring MeLan-Threonins T19. Auch in diesem Fall werden von CuvL zwei Dehydratisierungen vorgenommen, es kommt jedoch nur zu einer Brückenbildung. Durch Beeinträchtigung der Lyasedomänen-Funktion zeigen sich zwei Phosphorylierungen (Abb. 4.13 E, A3, A12).

Sehr stark beeinträchtigt ist die Syntheseleistung von CuvL durch den Austausch des B-Ring Threonins T4. Ein Drittel der Vorläufer-Peptide wird nicht dehydratisiert, ein Drittel wird einmal und ein weiteres Drittel zweimal dehydratisiert. Durch Beeinträchtigung der Lyasedomänen-Funktion zeigt sich, dass nur rund die Hälfte der Produkte teilweise phosphorylierte Spezies aufweist. Beim Test der Brückenbildung entstehen eine ganze Reihe verschiedener Nebenprodukte und ein Großteil der Spezies zeigt keinerlei Brückenbildung, während etwa ein Drittel eine Brückenbildung zeigt (Abb. 4.13 C, A13).

Die beschriebenen Ergebnisse lassen die folgenden Schlussfolgerungen zu: Es werden nicht, was auch möglich wäre, erst drei Dehydratisierungen von der Kinase- und Lyasedomäne vorgenommen und anschließend von der Cyclasedomäne die drei Michael-Additionen zur MeLan-Bildung vorgenommen. Vielmehr wird eine Brücke als Ganzes synthetisiert und dann weiter zu nächsten Brücke gewechselt (Abb. 4.12 F). Das zeigt die Tatsache, dass bei Beeinträchtigung einzelner MeLan-Brücken, die jeweils anderen Brücken gebildet werden.

Die B-Ring MeLan-Brücke zwischen T4 und C14 wird als erstes gebildet. Wenn das nicht möglich ist, wie das bei der T2AT4A-Mutante der Fall ist, sind die nachfolgenden Schritte nur sehr stark eingeschränkt möglich. Danach folgt die A-Ring MeLan-Brücke zwischen T19 und C3. Wenn dies nicht möglich ist, wie durch die T2AT19A-Mutante verdeutlicht, läuft die Synthese nicht weiter. Die erste Brücke, in diesem Szenario die B-Ring MeLan-Brücke, wird gebildet, aber es folgt nicht die Synthese der zweiten Brücke, in diesem Szenario die C-Ring MeLan-Brücke.

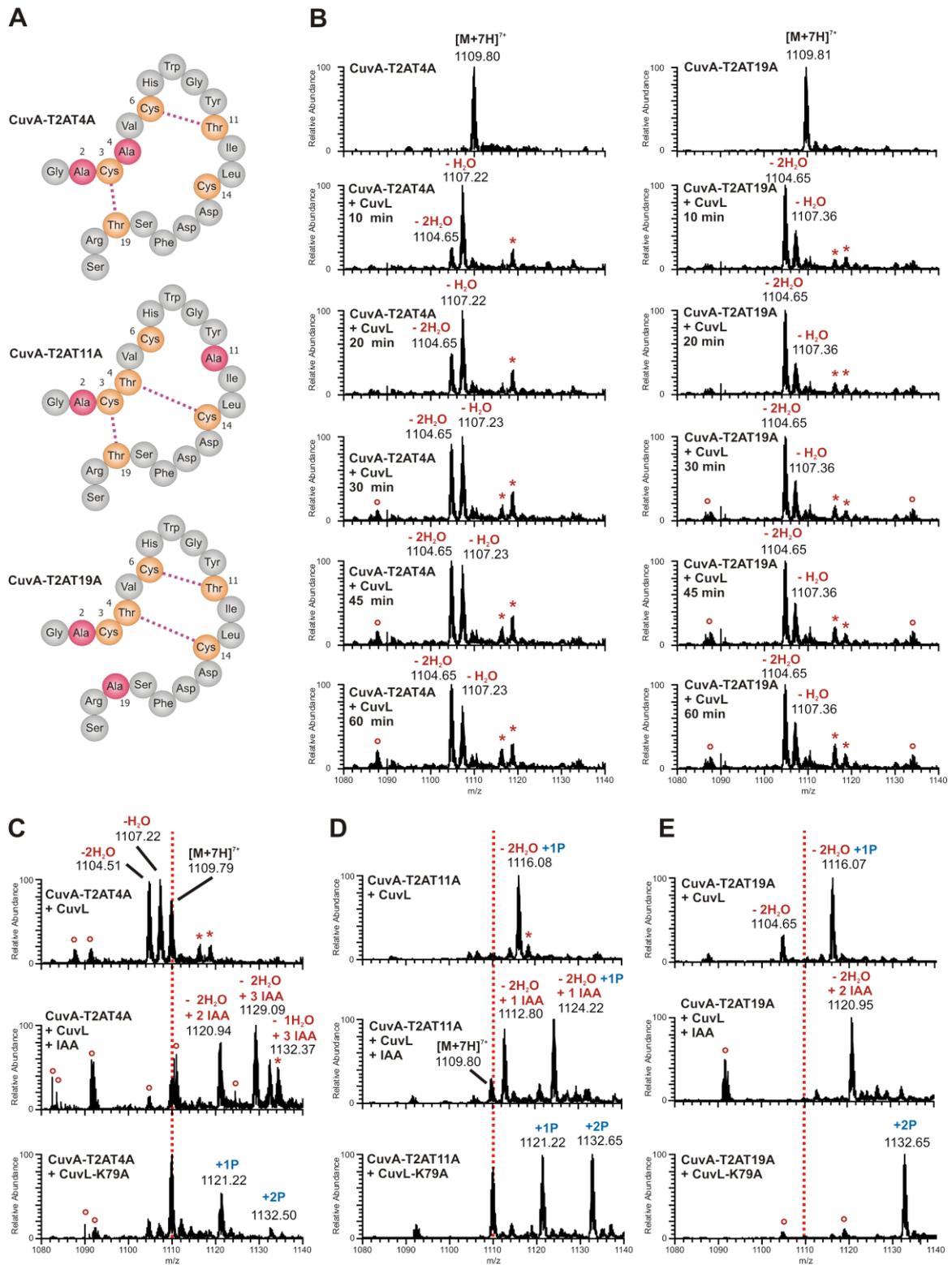


Abbildung 4.13 *In vitro* Analysen zum Mechanismus der MeLan-Brücken-Bildung.

(A) Modelle der verwendeten heterologen Substrat-Peptide (*tag* und *leader* nicht dargestellt). Mutierte Aminosäure in rot. Mögliche Brückenbildungen zwischen den entsprechenden Aminosäuren sind durch Linien dargestellt. (B) Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeit, der zeigt, dass die T19A-Mutante wesentlich schneller prozessiert wird, als die T4A-Mutante. (C) Rekombinantes CuvA-T2AT4A Peptid (D) Rekombinantes CuvA-T2AT11A Peptid (E) Rekombinantes CuvA-T2AT19A Peptid. Sternchen*: phosphorylierte Peptidspezies, Kreis°: Nebenprodukte der Peptidaufreinigung oder der *in vitro*-Bedingungen ,P: Phosphatgruppen-Addukte IAA: Iodacetamid.

Um diese Reihenfolge weiter zu validieren, wurde der Zeitverlauf der Dehydratisierungsreaktion mit exakt equimolaren Peptid- und Proteinkonzentrationen verfolgt, um nachvollziehen zu können, welche der Reaktionen schneller und problemloser abläuft (Abb. 4.13 B). Auch hier zeigt sich deutlich, dass T2AT19A-Mutanten weitaus schneller dehydratisiert werden können als T2AT4A-Mutanten, die für ein vergleichbares Level an dehydratisierten Spezies die mindestens sechsfache Zeit brauchen.

Als letztes wird schließlich die C-Ring MeLan-Brücke zwischen T11 und C6 synthetisiert. Wenn dies nicht möglich ist, werden die beiden vorangegangenen MeLan-Synthesen relativ problemlos durchgeführt (Abb. 4.13).

Eine weiterer *in vitro*-Test wurde schließlich mit einer CuvL-Mutante unternommen, bei der die, mutmaßlich für die Zn^{2+} -Bindung verantwortlichen, Cysteine durch Alanin ersetzt wurden (CuvL-C729A,C775A,C776A). Die Dehydratisierungsaktivität von CuvL wurde davon nicht beeinträchtigt. Der Cyclisierungstest zeigt jedoch eine starke Beeinträchtigung der Cyclaseaktivität. Bei manchen der detektierten Peptidspezies liegen dennoch nur zwei Iodacetamid-Addukte vor, was die Bildung einer der drei MeLan-Brücken anzeigt (Abb. A14). Es gibt also entweder einen intrinsischen Rettungsmechanismus, etwa die Bindung von Zn^{2+} -Ionen durch benachbarte Aminosäuren-Seitenketten, aber mit deutlich geringerer Affinität. Oder aber die Deprotonierung des Cystein-Thiolats kann zu einem gewissen Grad durch eine Alternative zu Zn^{2+} -Ionen durchgeführt werden, etwa durch eine benachbarte basische Seitenkette (Abb. 1.8 B). In jedem Fall zeigt das Experiment, dass die drei mutierten Aminosäuren essentiell für die Funktion der Cyclasedomäne sind.

Im Laufe der Optimierung der Assay-Bedingungen hatte sich die Hypothese entwickelt, dass CuvL womöglich spezifisch für Threonine sei und Serine nicht für eine eventuelle Dehydratisierung erkennt. Dies wäre eine interessante neue Eigenschaft für eine Lanthionin-Synthetase. Um die Validität der Hypothese zu testen, wurde eine CuvA-Mutante erstellt, bei der jedes Threonin durch Serin ersetzt wurde (CuvA-T2ST4ST11ST19S). Erstaunlicherweise zeigte das *in vitro*-Experiment bis zu drei Dehydratisierungen (Abb. A15). Eine strenge Spezifität liegt also nicht vor. Auffällig ist jedoch, dass trotz der sechs vorliegenden Serine nur maximal drei dehydratisiert wurden. Der Schluss liegt nahe, dass es sich dabei um S4, S11 und S19 handelt, also diejenigen Serine, die an der Position der

Threonine liegen, die im nativen Peptid die MeLan-Brücken bilden. Abschließend geklärt wurde diese Frage jedoch nicht.

5 Ausblick

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Mechanismus der Klasse IV-Lanthipeptid Synthese. Dabei war die Kristallisation einer trifunktionalen Synthetase, die sowohl für Klasse IV- aber auch für Klasse III-Lanthipeptide von Interesse sind, ein besonderes Anliegen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine Kristallstruktur einer solchen Synthetase präsentiert werden. Die postulierte Struktur ist aufgrund von unzureichender Cokristallisation nach wie vor unvollständig, da Mg^{2+} -Ionen, das Zn^{2+} -Ion, der Phosphat-Donor und das Peptid-Substrat in der Elektronendichtekarte nicht sichtbar sind.

Um das Projekt zu vervollständigen ist demnach die Auswertung weiterer Kristalle nötig. Bei der Kristallisation sollte darauf geachtet werden, für einen ausreichenden Mg^{2+} -Titer zu sorgen, um die Bindung in der Kinasedomäne zu gewährleisten. In der vorliegenden Arbeit wurden die nötigen Voraussetzungen für weitere Kristallisationen geschaffen. Die Expression von hochreinem CuvL wurde erfolgreich optimiert und erfolgversprechende, reproduzierbare Kristallisationsbedingungen konnten identifiziert werden. Durch die Kristallisation von SeMet-markiertem CuvL konnte das Phasenproblem gelöst werden, sodass künftige Kristall-Elektronendichtekarten in deutlich kürzerer Zeit mittels der Patterson-Methode (*molecular displacement*) modelliert werden können.

Sobald eine Struktur von CuvL mit gebundenem Peptid-Substrat, Cofaktor und den entsprechenden Ionen vorliegt, kann der Mechanismus der Synthese vollumfänglich beschrieben werden. Die Identifizierung der detaillierten Topologie der aktiven Zentren und der an Bindungen und Katalyse beteiligten Aminosäuren erlaubt die Herstellung weiterer CuvL-Mutanten. Mit deren Hilfe lässt sich die Relevanz einzelner Strukturmodule durch *in vitro* Analysen beurteilen.

Auch die Frage der *leader*-Peptid-Bindung in Klasse III- und Klasse IV-Lanthipeptiden wird in größerer Detailtiefe beschrieben werden können, insbesondere in Bezug auf das β -turn- β -turn- β -Motiv an der Grenzfläche zwischen Lyase- und Kinasedomäne. In mittel- bis längerfristiger Zukunft besteht die Möglichkeit von Kreuzversuchen von mutierten CuvL-Synthetasen mit anderen Substraten, um eine Manipulierbarkeit des Systems zu eruieren.

Die Herstellung und Isolierung größerer Mengen rekombinanter Curvocidine aus *Streptomyces* sp. Hochproduzenten ist bisher nicht gelungen. Für die Identifizierung der biologischen Funktion der Curvocidine ist dies jedoch eine zwingende Voraussetzung. Sowohl um Funktionalitäts-Tests zu unternehmen zu können, als auch um NMR-Analysen zur Strukturbestimmung der Curvocidine durchführen zu können, sind hohe Konzentrationen und Reinheiten erforderlich, die sich durch Expression in *E. coli* nicht erreichen lassen.

Weiterhin konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein neuartiger Mechanismus der Synthese globulärer Lanthipeptide beschrieben werden. Eine Direktionalität wie bei linearen Lanthipeptiden kann hier nicht vorliegen, da sich überlappende Thioetherbrücken eine strenge Direktionalität verhindern. Eine interessante Frage wäre, ob ein ähnlicher Mechanismus auch bei ähnlichen Lanthipeptiden wie den Cinnamycinen und Duramycinen vorkommt. Sollte sich dies bestätigen lassen, wäre ein phylogenetischer Vergleich entsprechend ähnlicher Lanthipeptide von Interesse, um die evolutionäre Entwicklungsgeschichte nachvollziehen zu können.

6 Appendix

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abu	2-Aminobutyrim
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
altgr.	altgriechisch
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AMP-PCP	Adenosin-5'-(β,γ -methylen)triphosphat
AMP-PNP	Adenosin-5'-(β,γ -imido)triphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AviCys	S-[(Z)-2-aminovinyl]-D-cystein
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3'-indolylphosphat
BESSY	Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung
CD	Circulardichroismus
CID	<i>collision induced dissociation</i>
cv	<i>column volumes</i>
ddH ₂ O	entionisiertes Wasser, Millipore
DEAE	Diethylaminoethyl (-cellulose)
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron
dH ₂ O	voll-entsalztes Wasser
Dha	2,3-Didehydroalanin
Dhb	2,3-Didehydrobutyrim
DMF	Dimethylformamid
DSM	Deutsche Sammlung Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	<i>electrospray ionisation</i>
EtOH	Ethanol
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
h	Stunde
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IAA	Iodacetamid
IEX	<i>ion exchange chromatography</i>

IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JCM	Japan Collection of Microorganisms
K	Kelvin
kbp	Kilobasenpaare (=1000 bp)
kDa	Kilodalton (= 1000 Da)
Kryo-EM	Kryo-Elektronenmikroskopie
mAU	<i>milli absorbance unit</i>
MeCN	Acetonitril
min	Minute(n)
MGFA	Dimethylguanidin-Fettsäure
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	<i>mass spectrometry</i>
NBT	Nitro-Blau Tetrazoliumchlorid
NiNTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NRPS	Nicht-ribosomale Peptidsynthese
nt	Nukleotide
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PKS	Polyketidsynthase
POP	Prolyl-Oligopeptidase
pSer	Phospho-Serin
pThr	Phospho-Threonin
PVDF	Polyvenylidenfluorid
R _{free}	<i>free reliability factor</i>
RP	reverse Phase, Umkehrphase
rpm	<i>revolutions per minute</i>
R _{work}	<i>reliability factor oder discrepancy index</i>
s	Sekunde
SAM	S-Adenosylmethionin
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
SeMet	Selenomethionin
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i>
STPK	Serin/Threonin-Peptid-Kinase
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
T _m	<i>melting temperature</i>
v/v	volume per volume
vol.	Volumenanteil
VRE	Vancomycin-resistente <i>Enterococcus</i> sp.
w/v	<i>weight per volume</i>

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Auswahl einiger exemplarischer Sekundärmetabolite	2
Abbildung 1.2 Schematischer Aufbau einer NRPS-Synthetase.	4
Abbildung 1.3 Schema aller beteiligten Komponenten der RiPP Biosynthese.	6
Abbildung 1.4 Schema zum Aufbau der RiPP Vorläufer-Peptide.....	7
Abbildung 1.5 Auswahl einiger exemplarischer RiPPs.	10
Abbildung 1.6 Klassifizierungssystem der Lanthipeptide.	13
Abbildung 1.7 Biosyntheseweg von (Methyl-)Lanthionin und (Methyl-)Labionin.....	15
Abbildung 1.8 Lanthipeptid Klasse I und deren Biosynthese.....	17
Abbildung 1.9 Lanthipeptid Klasse II und deren Biosynthese.....	21
Abbildung 1.10 Lanthipeptid Klasse III und deren Biosynthese.....	24
Abbildung 1.11 Lanthipeptide der Klasse IV.	27
Abbildung 1.12 Putativer Mechanismus der β -Eliminierungsreaktion der VenL-Lyasedomäne.	28
Abbildung 1.13 Schematische Darstellung des Curvocidin-Systems.	30
Abbildung 4.1 Expression von rekombinantem CuvL.	65
Abbildung 4.2 Aufreinigungskaskade von CuvL.	68
Abbildung 4.3 <i>Leader</i> Peptid Aufreinigung von SPPS synthetisiertem Peptid.....	70
Abbildung 4.4 CD-Spektroskopie.....	71
Abbildung 4.5 Kristallstruktur von CuvL.....	76
Abbildung 4.6 Vergleichende Betrachtung der Lyasedomäne verschiedener Proteine mit CuvL.	78
Abbildung 4.7 Vergleichende Betrachtung der Kinasedomäne.	80
Abbildung 4.8 Vergleichende Betrachtung der Cyclasedomäne.	81
Abbildung 4.9 Exemplarische Darstellung der Aufreinigung des rekombinanten CuvA-T2A- Peptids.....	85
Abbildung 4.10 Aktivitäts- und Cyclisierungsassay.	87
Abbildung 4.11 Curvocidin Aktivitätsassays mit verschiedenen Cofaktoren.	88
Abbildung 4.12 Biosynthesemodell für die Reifung von Curvocidin durch die CuvL-Synthetase.	90
Abbildung 4.13 <i>In vitro</i> Analysen zum Mechanismus der MeLan-Brücken-Bildung.....	92
Abbildung A1 Aktivitätsassay mit Wildtyp-CuvL und CuvL-K79A (T2A, T2AT4A).....	103
Abbildung A2 Aktivitätsassay mit Wildtyp-CuvL und CuvL-K79A (T2AT11A, T2AT19A)	104
Abbildung A3 Sequenzvergleich von Kinasedomänen	105
Abbildung A4 Exemplarische Plasmidkarten.....	106
Abbildung A5 SPPS-Curvocidin Aufreinigung und Aktivitätsassay.....	107
Abbildung A6 Aufreinigung heterolog exprimierter CuvA Derivate	108
Abbildung A7 Aufreinigung des heterologen Fusionspeptids CuvA-T2A (pSD024)	109
Abbildung A8 Aufreinigung des heterologen Fusionspeptids CuvA-T2AT19A (pSD027).....	110

Abbildung A9 Aktivitäts- und Cyclisierungsassay (T2A, CuvL).....	111
Abbildung A10 Phosphospezies Akkumulation bei Curvocidin <i>in vitro</i> Modifikationsassay über einen erweiterten Zeitaum	112
Abbildung A11 Aktivitäts- und Cyclisierungsassay (T2AT11A, CuvL)	113
Abbildung A12 Aktivitäts- und Cyclisierungsassay (T2AT19A, CuvL)	114
Abbildung A13 Aktivitäts- und Cyclisierungsassay (T2AT4A, CuvL)	115
Abbildung A14 Aktivitäts- und Cyclisierungsassay (T2A, CuvL-C729A;C775A;C776A).....	116
Abbildung A15 Aktivitätsassay (T2ST4ST11ST19S, CuvL)	117
Abbildung A16 Modellierung <i>in silico</i> der CuvL-Lyasedomäne auf Basis der SpvC-Struktur.	118

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1 Verwendete Geräte	33
Tabelle 3.2 Verwendete Säulen	34
Tabelle 3.3 Verwendete Software.....	35
Tabelle 3.4 Verwendete Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.....	36
Tabelle 3.5 Verwendete Kits und Kristallisation Screening-Lösungen.....	38
Tabelle 3.6 Verwendete Oligonukleotide	39
Tabelle 3.7 Verwendete Plasmide.....	41
Tabelle 3.8 Konstruierte Vektoren	42
Tabelle 3.9 Verwendete Mikroorganismen	43
Tabelle 3.10 Verwendete Kulturmedien	44
Tabelle 3.11 Verwendete Lösungen und Puffer.....	45
Tabelle 3.12 Verwendete Antibiotika	50
Tabelle 4.1 Zusammenfassung getesteter CuvL-Kristalle	72
Tabelle 4.2 Statistik der Beugungsdaten und Verfeinerung.	74
Tabelle A1 Daten der CD-Spektroskopie Schmelzkurve	102

6.4 Weitere Informationen zur Charakterisierung der CuvL *in vitro* Funktion

Tabelle A1 Daten der CD-Spektroskopie Schmelzkurve

	CuvL	CuvL + Peptid-Substrat + AMP-PNP
Range of denaturation	39,52 ± 80,54 °C	40,01 ± 82,04 °C
Fitting line of stable range	A: $Y = (0,061296) x + (-62,1756)$ B: $Y = (-0,0157178) x + (-4,21597)$	A: $Y = (0,0383996) x + (-59,8171)$ B: $Y = (0,0150508) x + (-6,71159)$
Residual of fitting curve	SIGMA: 1,1478	SIGMA: 0,590171
T_m	59,96 ± 0,082567 °C	60,81 ± 0,041664 °C
dH	413521 ± 18024,5 J/mol	437215 ± 9894,64 J/mol
dS	1241,4 ± 54,11 J/mol/K	1309,17 ± 29,628 J/mol/K

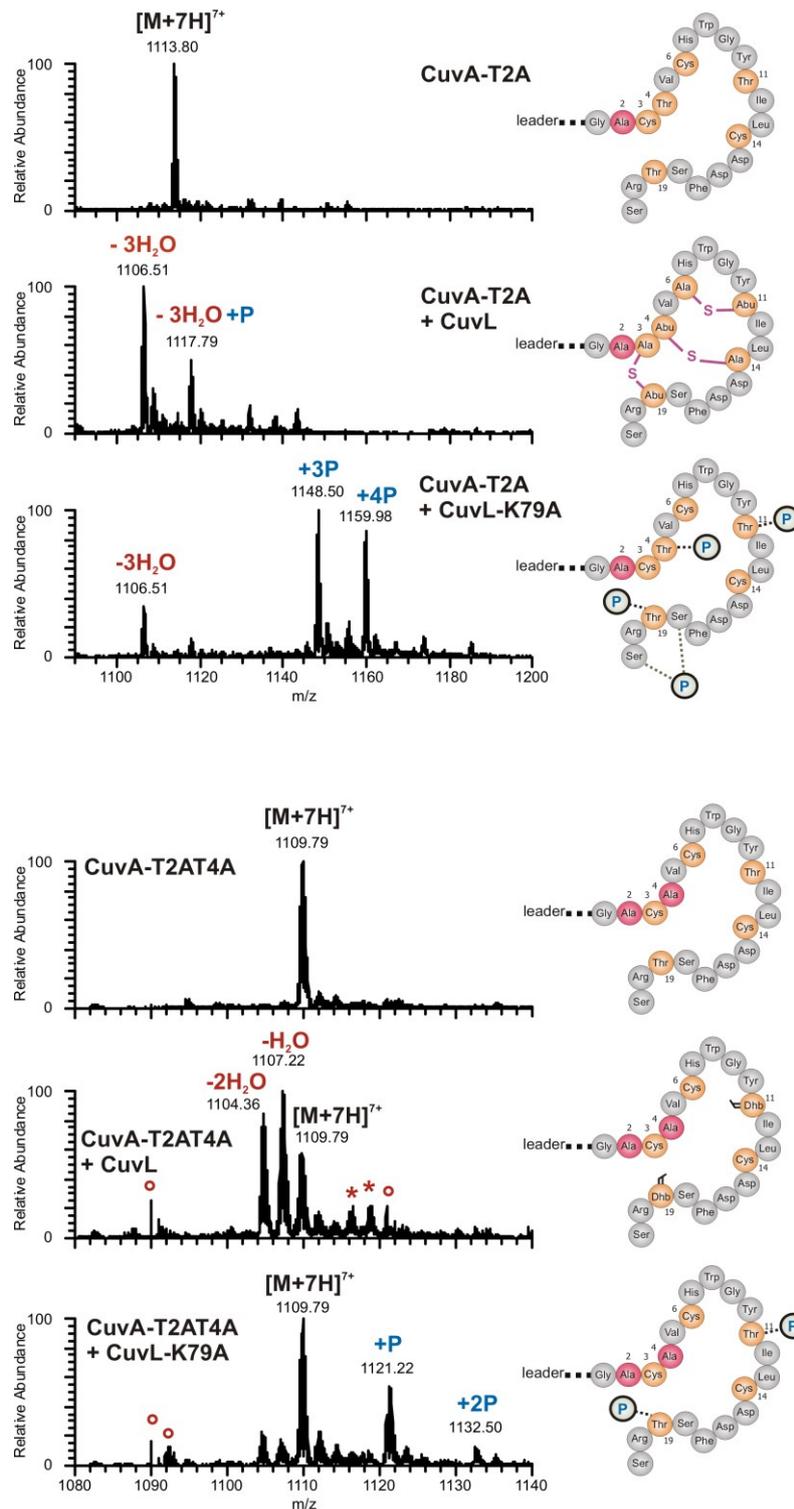


Abbildung A1 Aktivitätsassay mit Wildtyp-CuvL und CuvL-K79A (T2A, T2AT4A)

Rekombinante Vorläufer-Peptide His₆-TEV-CuvA-T2A bzw. His₆-TEV-CuvA-T2AT4A nach Inkubation mit rekombinantem CuvL und rekombinantem CuvL-K79A, dATP und Mg²⁺ Ionen, gefolgt von HPLC-ESI-MS. Dargestellt ist, neben dem Massenspektrum, ein Modell der in diesem Spektrum abundantesten Peptidspezies. Sternchen*: phosphorylierte Peptidspezies, Kreis°: Nebenprodukte der Peptidaufreinigung oder der *in vitro* Bedingungen. Abu-S-Ala: MeLan-Brücke, P: Phosphat-Addukt.

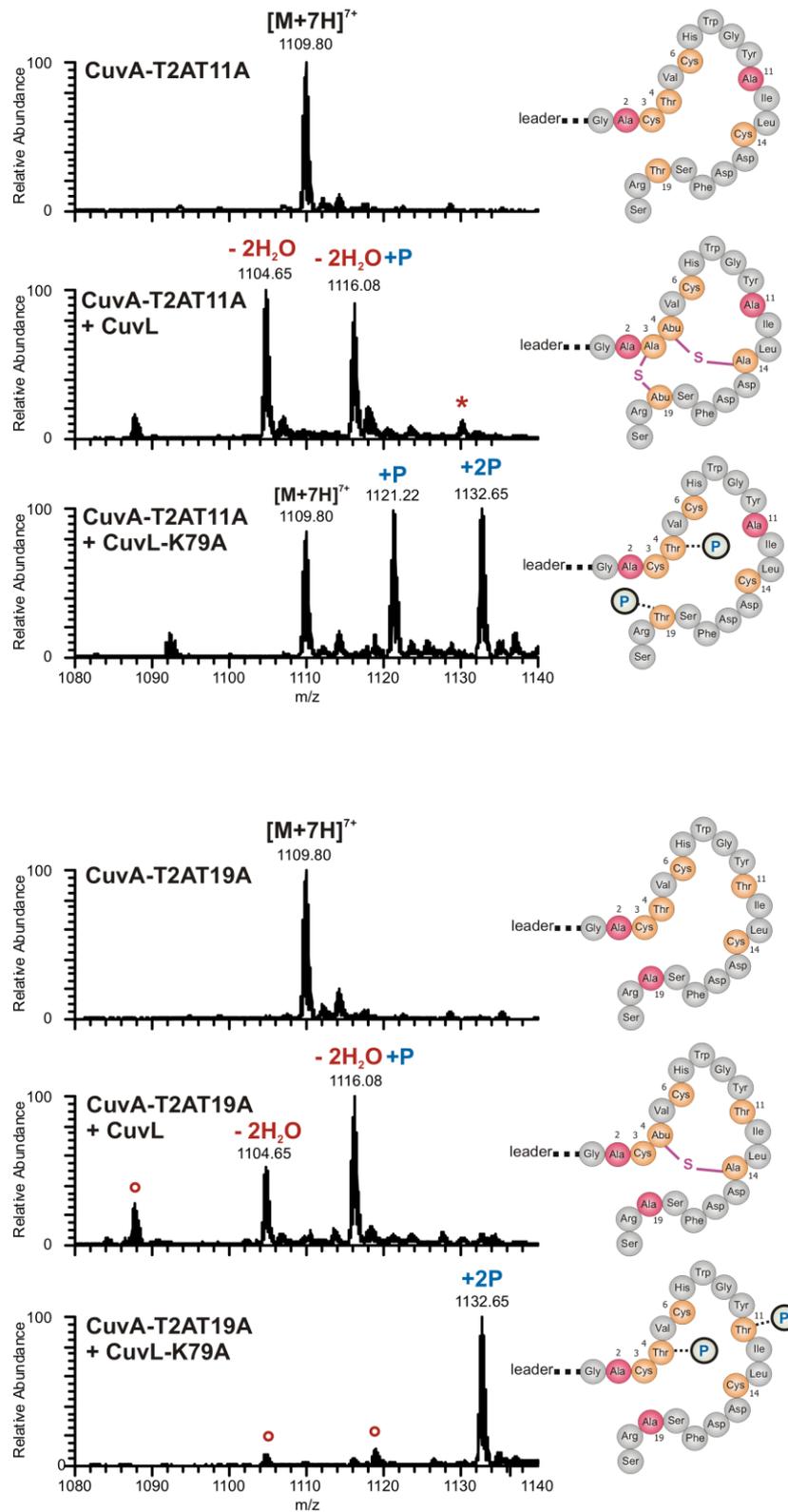


Abbildung A2 Aktivitätsassay mit Wildtyp-CuvL und CuvL-K79A (T2AT11A, T2AT19A)

Rekombinante Vorläufer-Peptide His₆-TEV-CuvA-T2AT11A bzw. His₆-TEV-CuvA-T2AT19A nach Inkubation mit rekombinantem CuvL und rekombinantem CuvL-K79A, dATP und Mg²⁺ Ionen, gefolgt von HPLC-ESI-MS. Dargestellt ist, neben dem Massenspektrum, ein Modell der in diesem Spektrum abundantesten Peptidspezies. Sternchen*: phosphorylierte Peptidspezies, Kreis°: Nebenprodukte der Peptidaufreinigung oder der *in vitro* Bedingungen. Abu-S-Ala: MeLan-Brücke, P: Phosphat-Addukt.

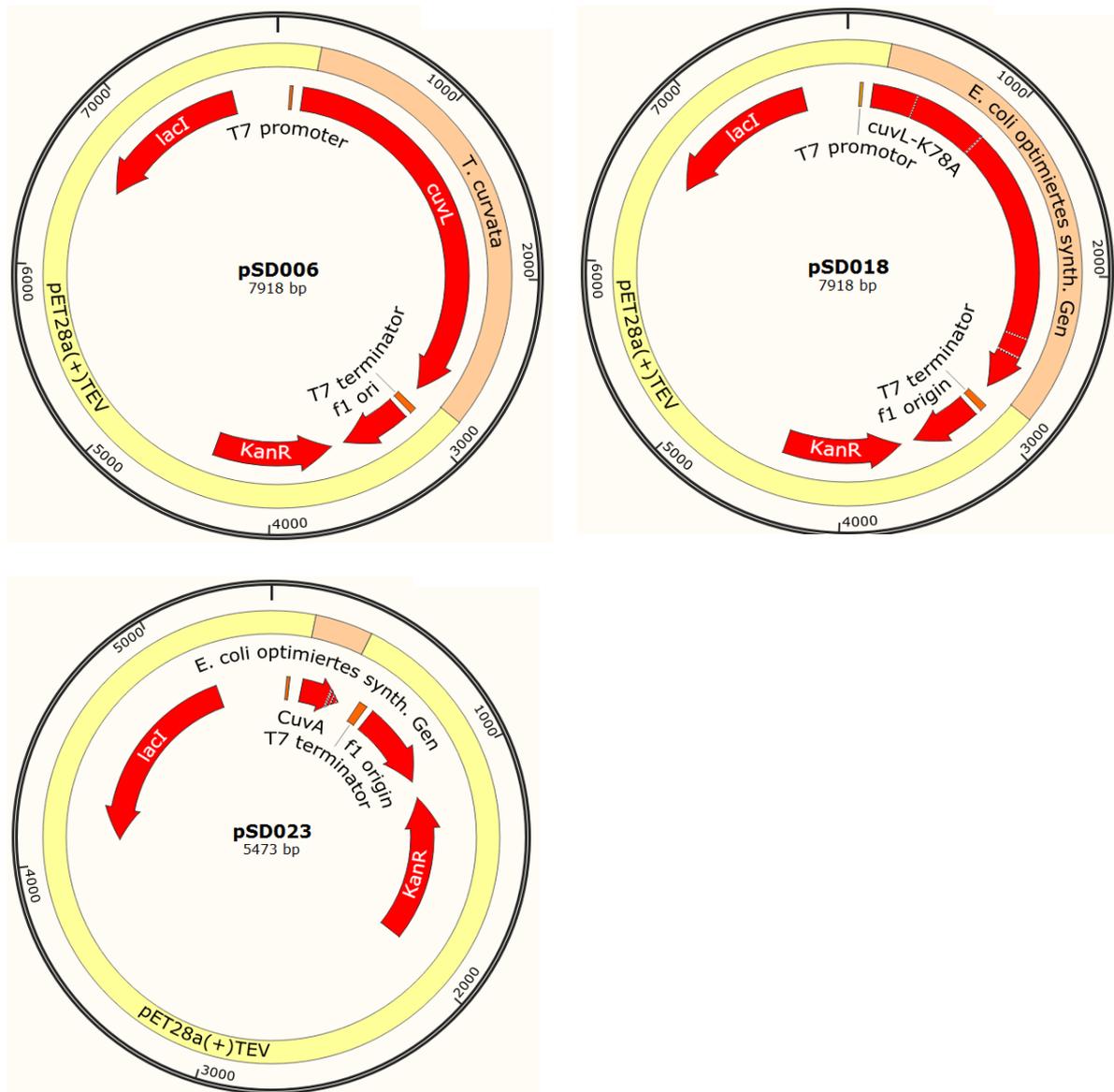


Abbildung A4 Exemplarische Plasmidkarten

Das Plasmid pSD006 trägt das native *cuvL*-Gen aus *T. curvata* fusioniert an eine TEV-Schnittstelle und ein His₆-tag unter Kontrolle des IPTG induzierbaren T7-Promotors. Das Plasmid pSD018 trägt das für *E. coli* Codon-optimierte synthetische Gen an Stelle des nativen Gens in pSD006. Alle weiteren Plasmide zur Expression von CuvL-Mutanten basieren auf pSD018 (Tab. 3.8). Das Plasmid pSD023 trägt das synthetische Gen des Peptids *cuvA* fusioniert an eine TEV-Schnittstelle und ein His₆-tag unter Kontrolle des IPTG induzierbaren T7-Promotors. Alle weiteren Plasmide zur Expression von CuvA-Mutanten basieren auf pSD023 (Tab. 3.8).

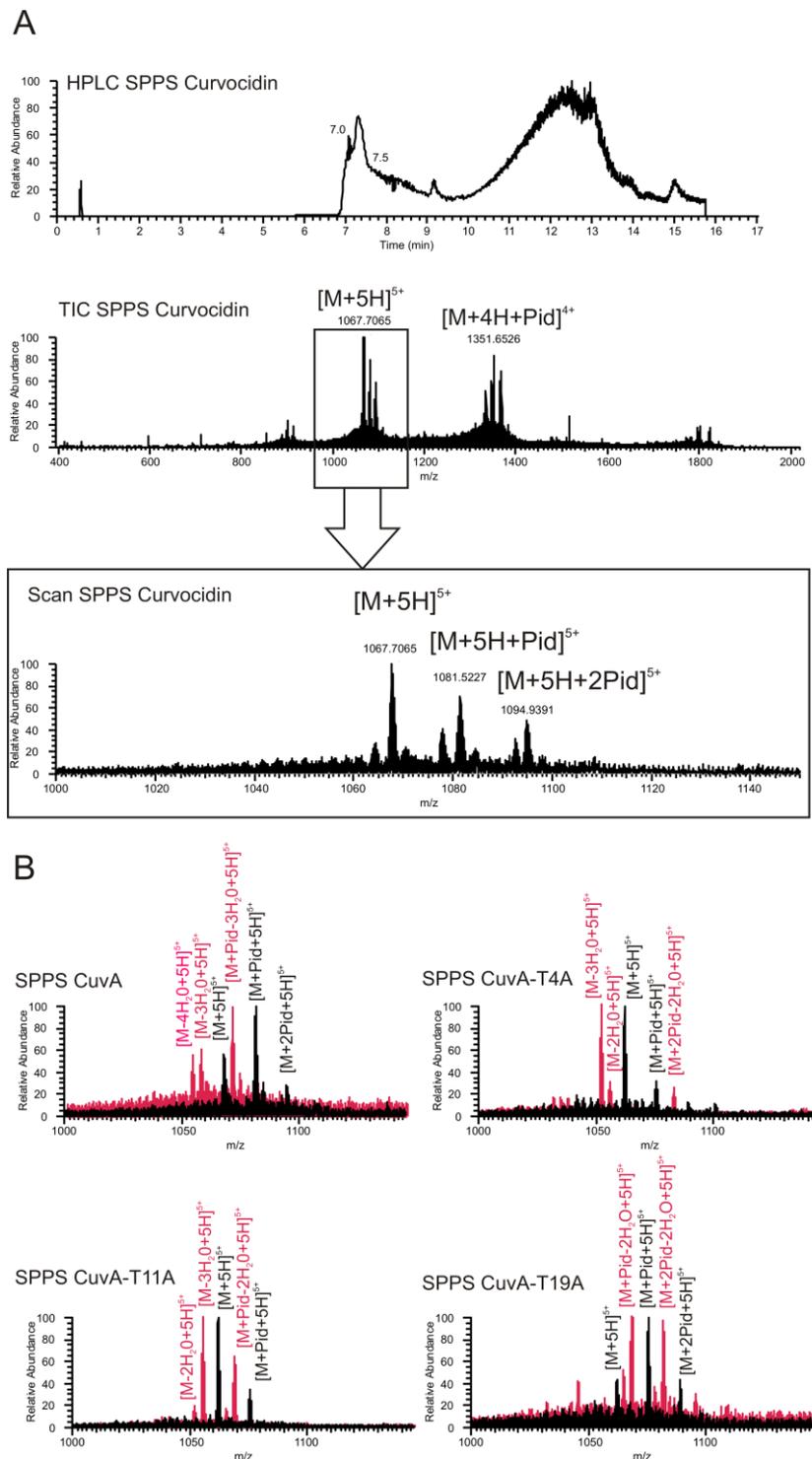


Abbildung A5 SPPS-Curvocidin Aufreinigung und Aktivitätsassay

(A) Die Aufreinigung von SPPS CuvA zeigt schwerwiegende Verunreinigungen durch Nebenprodukte (Die Peptide wurden von Eric van Herwerden und Bianca Schmid synthetisiert). Die Detailaufnahme von $[M+5H]^{5+}$ verdeutlicht die Verunreinigung mit Piperidid-Addukten (Pid). **(B)** *In vitro* Assays mit verschiedenen SPPS-Peptiden zeigen starke Hintergrundverunreinigungen und Verunreinigungen mit Piperidid-Addukten. Schwarz: SPPS Peptid (Kontrolle). Rot: SPPS-Peptid nach Inkubation mit rekombinantem CuvL, ATP und Mg^{2+} Ionen.

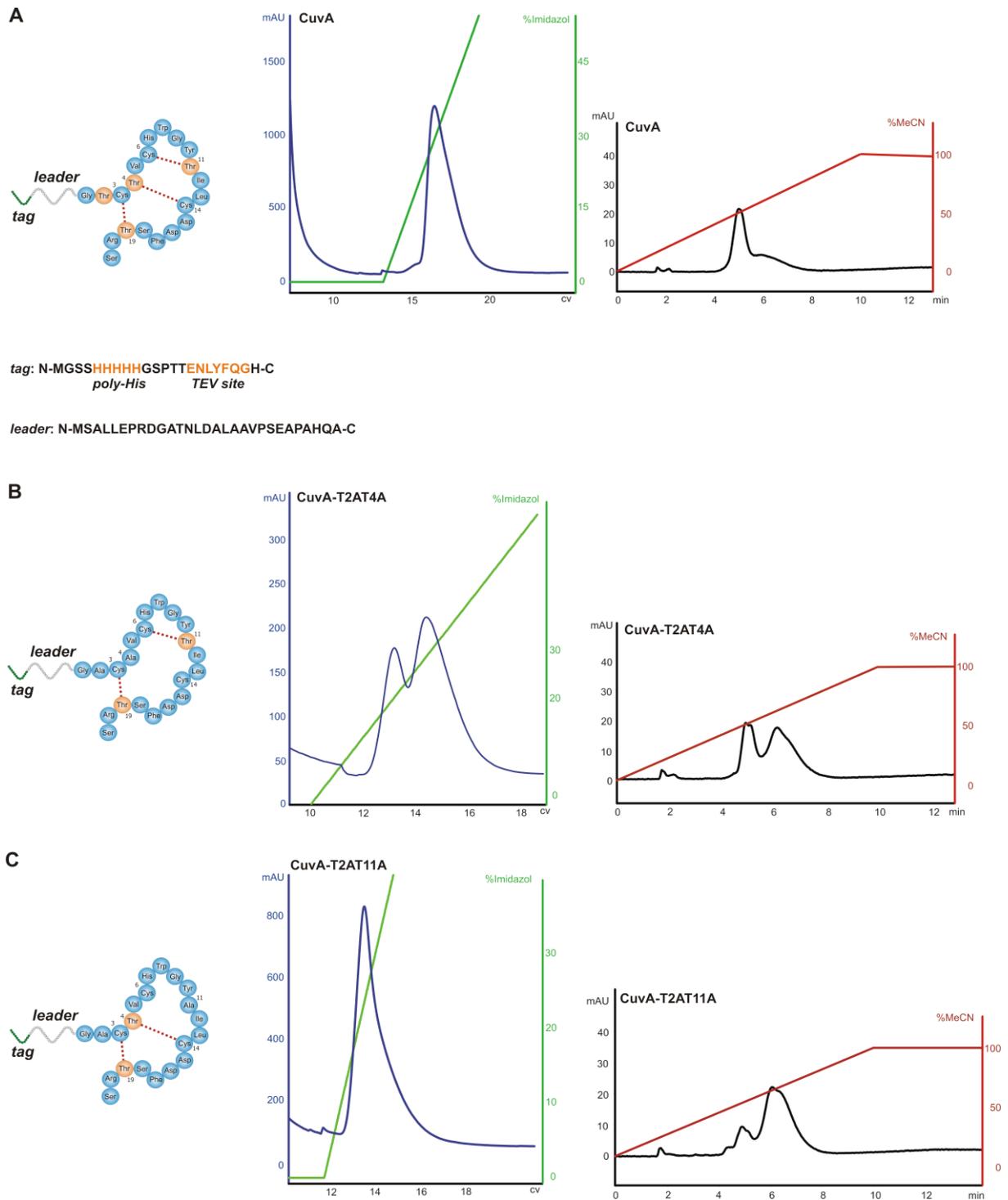


Abbildung A6 Aufreinigung heterolog exprimierter CuvA Derivate

(A) Modell des heterologen Fusionspeptids CuvA (pSD023), NiNTA IMAC FPLC-Chromatogramm, HPLC-Chromatogramm, Primärstrukturen von *tag* und *leader*-Peptid, die auch auf die Peptide in B und C zutreffen. **(B)** Modell des heterologen Fusionspeptids CuvA-T2AT4A (pSD025), NiNTA IMAC FPLC-Chromatogramm, HPLC-Chromatogramm **(C)** Modell des heterologen Fusionspeptids CuvA-T2AT11A (pSD026), NiNTA IMAC FPLC-Chromatogramm, HPLC-Chromatogramm

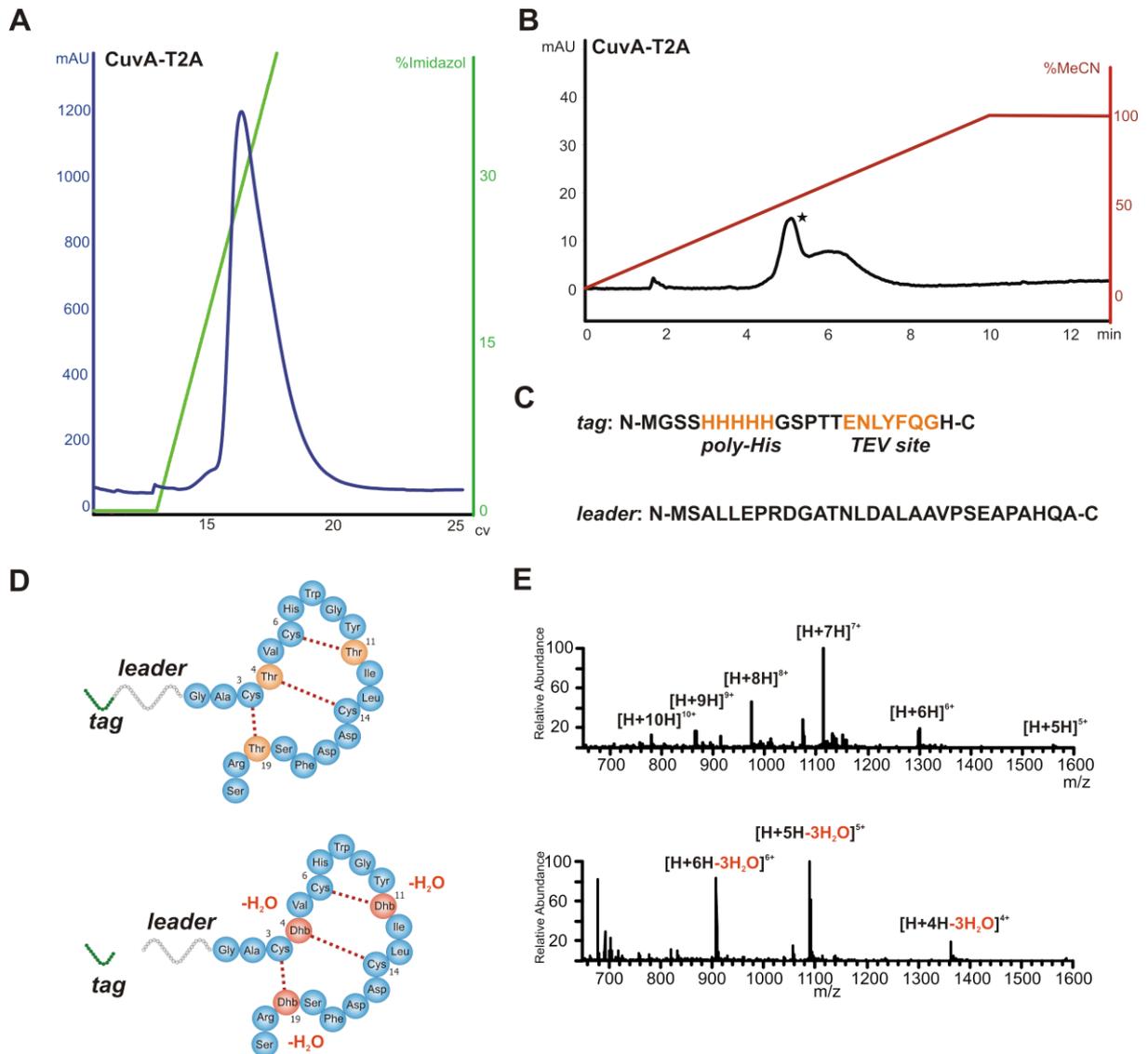


Abbildung A7 Aufreinigung des heterologen Fusionspeptids CuvA-T2A (pSD024)

(A) NiNTA IMAC FPLC-Chromatogramm, (B) HPLC-Chromatogramm, Stern: Fraktion mit dem reinsten Peptid (C) Primärstrukturen von *tag* und *leader*-Peptid (D) Modelle des heterologen Fusionspeptids vor (oben) und nach (unten) TEV-Proteaseverdau und *in vitro* Aktivitäts-Assay durch CuvL (E) HPLC-ESI-MS-Spektren oben: vor *in vitro* Assay, unten nach *in vitro* Assay. Die Assays belegen, dass die Aktivität der CuvL-Synthetase nach TEV-vermittelter *tag*-Abspaltung des rekombinanten Peptids weiterhin gegeben ist. Die Entfernung des *tag* ist nicht notwendig und wurde im weiteren Verlauf nicht mehr unternommen.

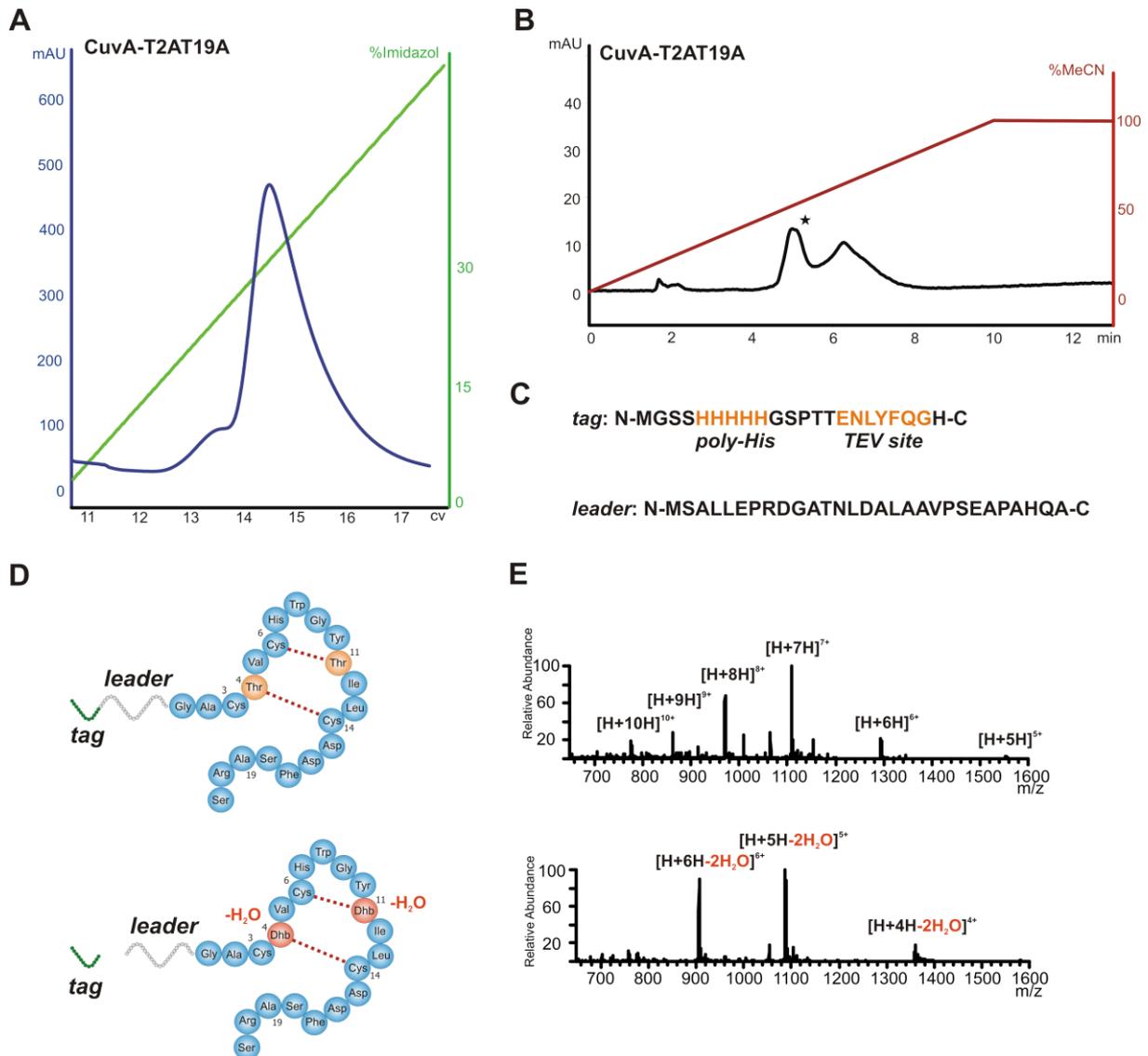


Abbildung A8 Aufreinigung des heterologen Fusionspeptids CuvA-T2AT19A (pSD027)

(A) NiNTA IMAC FPLC-Chromatogramm, (B) HPLC-Chromatogramm, Stern: Fraktion mit dem reinsten Peptid (C) Primärstrukturen von tag und leader-Peptid (D) Modelle des heterologen Fusionspeptids vor (oben) und nach (unten) TEV-Proteaseverdau und *in vitro* Aktivitäts-Assay durch CuvL (E) HPLC-ESI-MS-Spektren oben: vor *in vitro* Assay, unten nach *in vitro* Assay. Die Assays belegen, dass die Aktivität der CuvL-Synthetase nach TEV-vermittelter tag-Abspaltung des rekombinanten Peptids weiterhin gegeben ist. Die Entfernung des tag ist nicht notwendig und wurde im weiteren Verlauf nicht mehr unternommen.

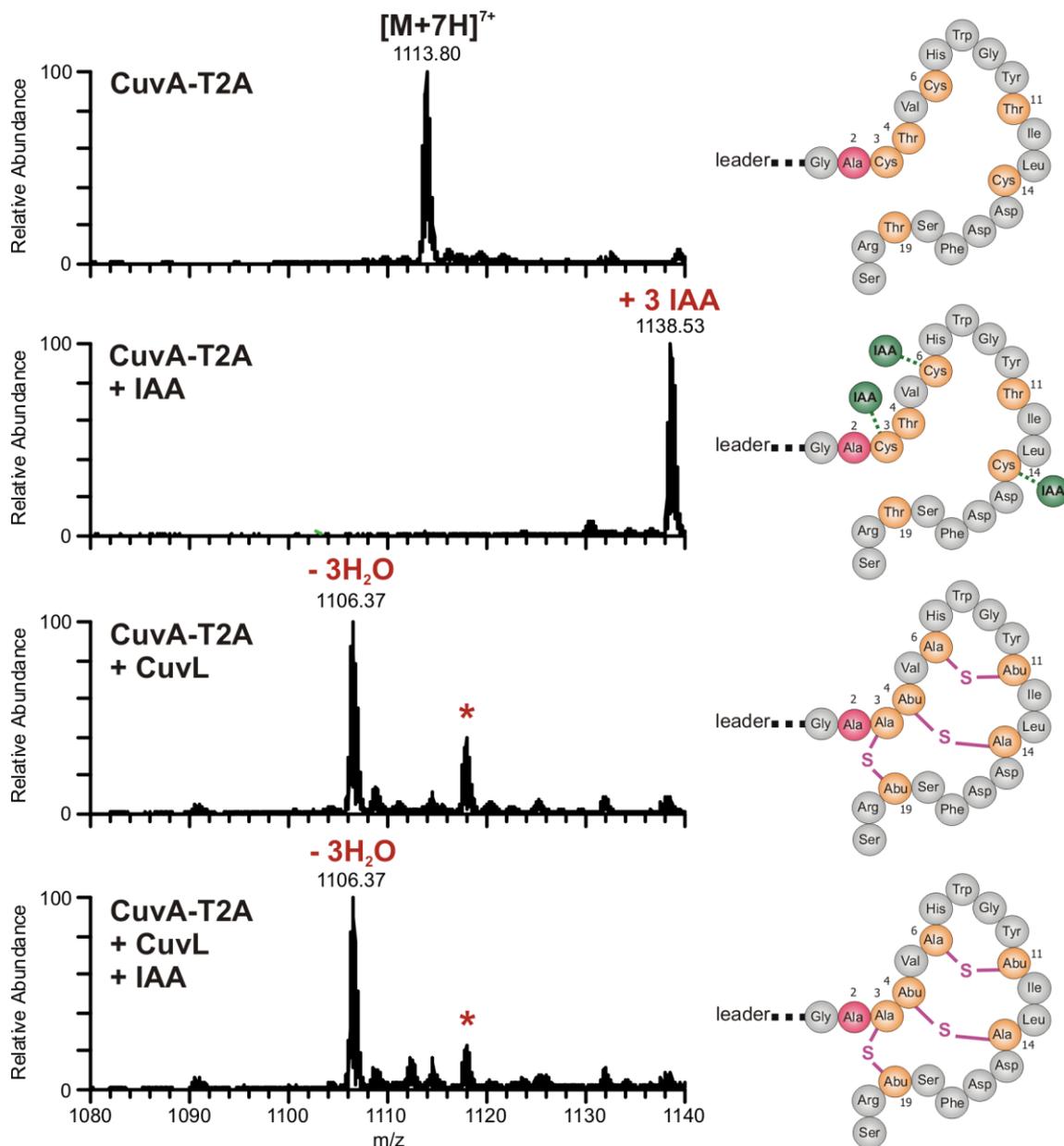


Abbildung A9 Aktivitäts- und Cyclisierungsassay (T2A, CuvL)

Rekombinantes Vorläufer-Peptid His₆-TEV-CuvA-T2A nach Inkubation mit rekombinatem CuvL, dATP und Mg²⁺ Ionen, gefolgt von HPLC-ESI-MS. Dargestellt ist, neben dem Massenspektrum, ein Modell der in diesem Spektrum abundantesten Peptidspezies. IAA: Iodacetamid, Sternchen*: phosphorylierte Peptidspezies, Abu-S-Ala: MeLan-Brücke.

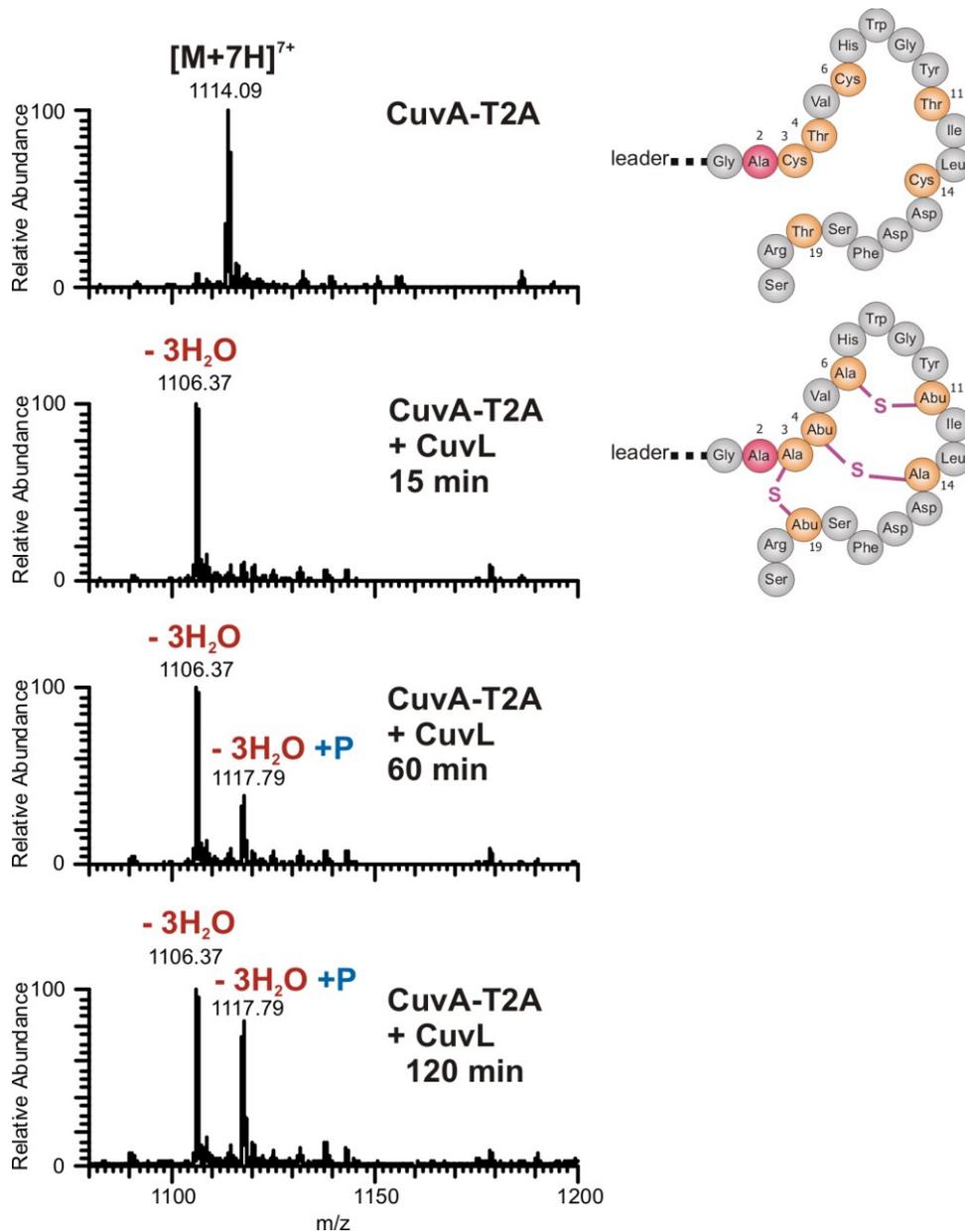


Abbildung A10 Phosphospezies Akkumulation bei Curvocidin *in vitro* Modifikationsassay über einen erweiterten Zeitraum

His₆-TEV-CuvA-T2A, inkubiert mit CuvL, Mg²⁺ und ATP. Modell zeigen das Fusionspeptid vor und nach dem *in vitro* Assay. Die jeweilige Reaktion wurde nach den Zeiten 15 min, 60 min und 120 min gestoppt. Die Menge der phosphorylierten Peptidspezies nimmt über die Zeit deutlich zu. Das Aufkommen dieser Spezies ist demnach ein Artefakt der Assaybedingungen. (Abu: 2-aminobutyryn, Abu-S-Ala: MeLan Brücke, +P: Phosphataddukt)

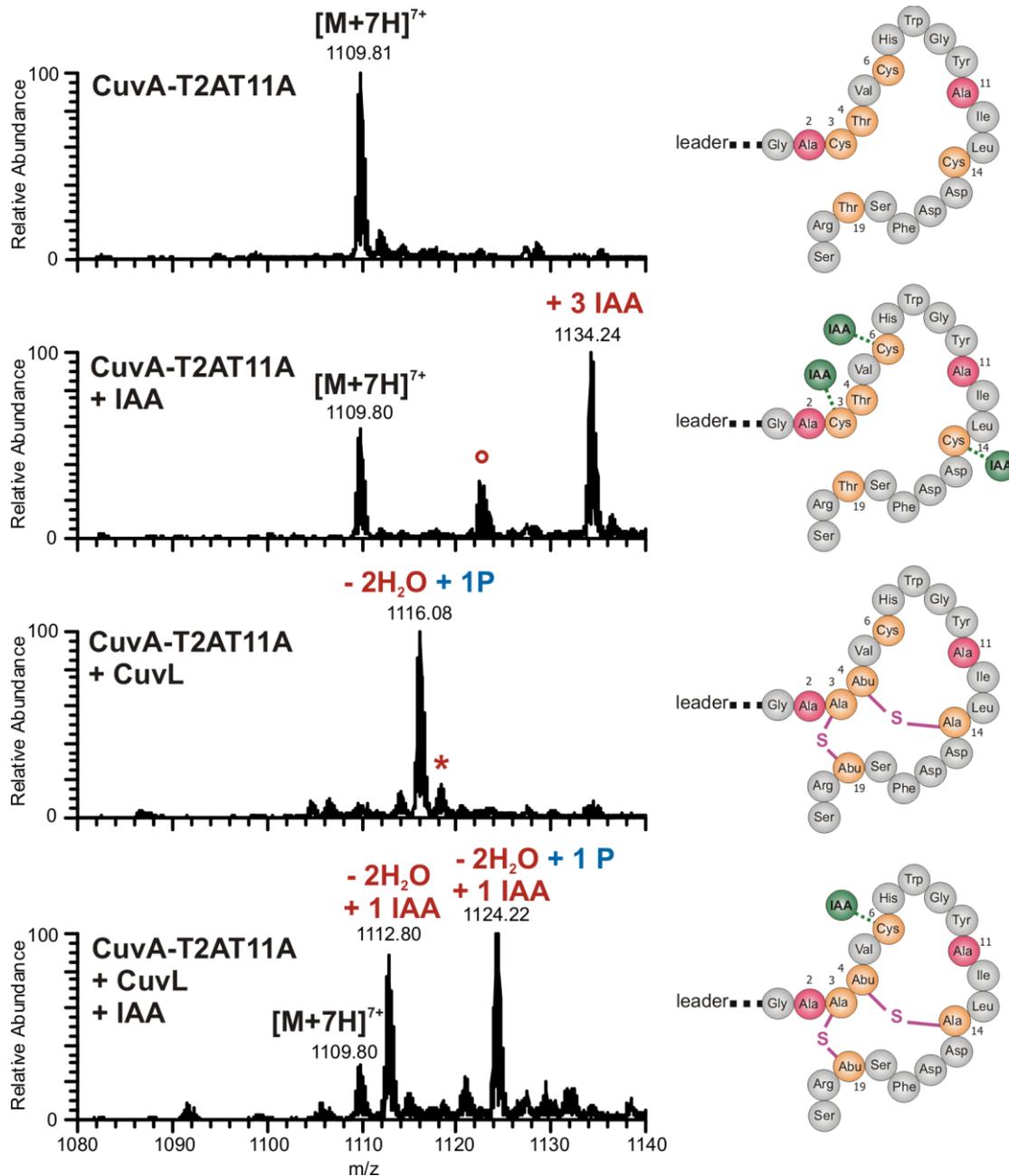


Abbildung A11 Aktivitäts- und Cyclisierungsassay (T2AT11A, CuvL)

Rekombinantes Vorläufer-Peptid His₆-TEV-CuvA-T2AT11A nach Inkubation mit rekombinantem CuvL, dATP und Mg²⁺ Ionen, gefolgt von HPLC-ESI-MS. Dargestellt ist, neben dem Massenspektrum, ein Modell der in diesem Spektrum abundantesten Peptidspezies. IAA: Iodacetamid, Sternchen*: phosphorylierte Peptidspezies, Kreis°: Nebenprodukte der Peptidaufreinigung oder der *in vitro* Bedingungen, Abu-S-Ala: MeLan-Brücke.

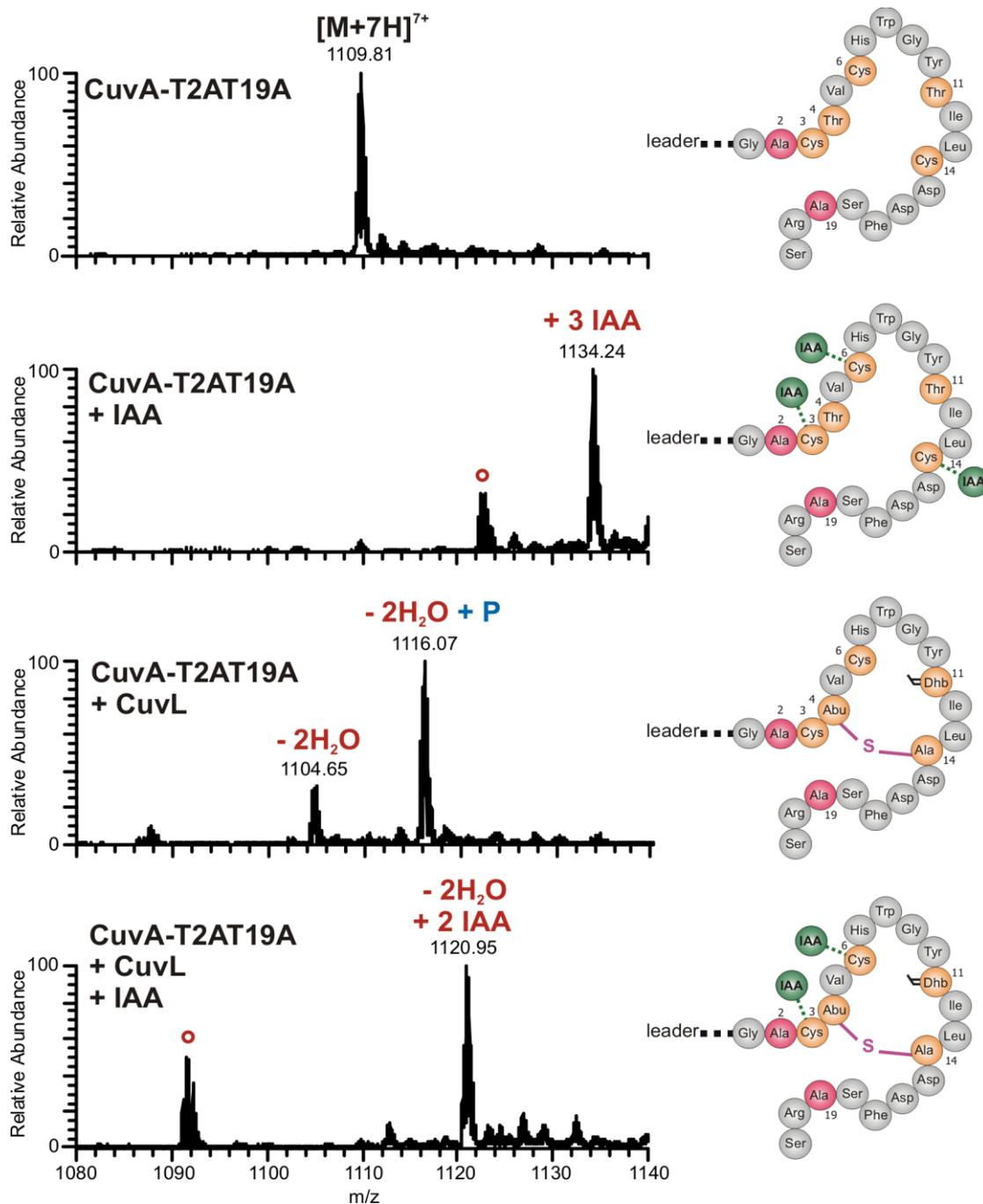


Abbildung A12 Aktivitäts- und Cyclisierungsassay (T2AT19A, CuvL)

Rekombinantes Vorläufer-Peptid His₆-TEV-CuvA-T2AT19A nach Inkubation mit rekombinatem CuvL, dATP und Mg²⁺ Ionen, gefolgt von HPLC-ESI-MS. Dargestellt ist, neben dem Massenspektrum, ein Modell der in diesem Spektrum abundantesten Peptidspezies. IAA: Iodacetamid, Sternchen*: phosphorylierte Peptidspezies, Kreis°: Nebenprodukte der Peptidaufreinigung oder der *in vitro* Bedingungen, Abu-S-Ala: MeLan-Brücke.

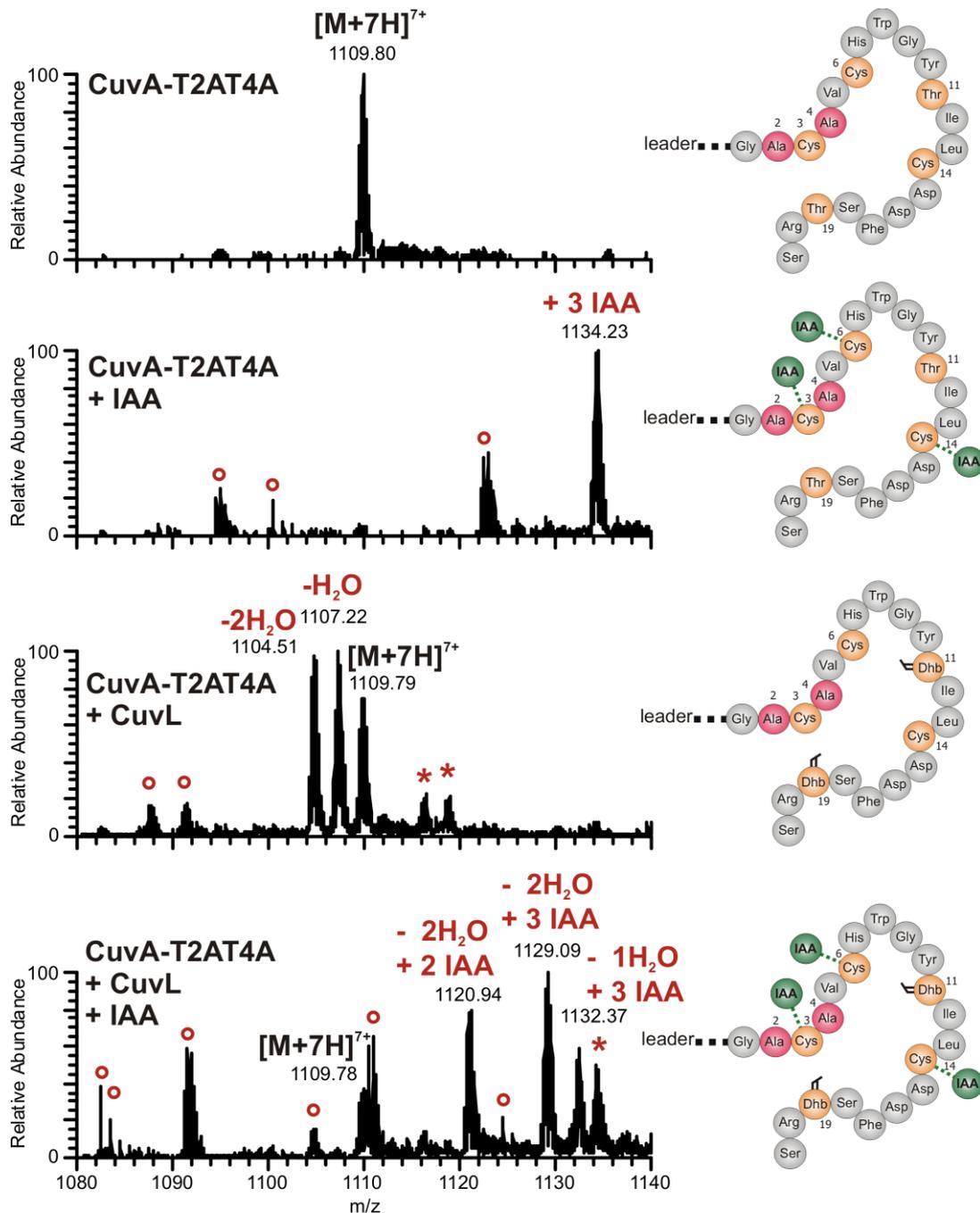


Abbildung A13 Aktivitäts- und Cyclisierungsassay (T2AT4A, CuvL)

Rekombinantes Vorläufer-Peptid His₆-TEV-CuvA-T2AT4A nach Inkubation mit rekombinantem CuvL, dATP und Mg²⁺ Ionen, gefolgt von HPLC-ESI-MS. Dargestellt ist, neben dem Massenspektrum, ein Modell der in diesem Spektrum abundantesten Peptidspezies. IAA: Iodacetamid, Sternchen*: phosphorylierte Peptidspezies, Kreis°: Nebenprodukte der Peptidaufreinigung oder der *in vitro* Bedingungen, Abu-S-Ala: MeLan-Brücke.

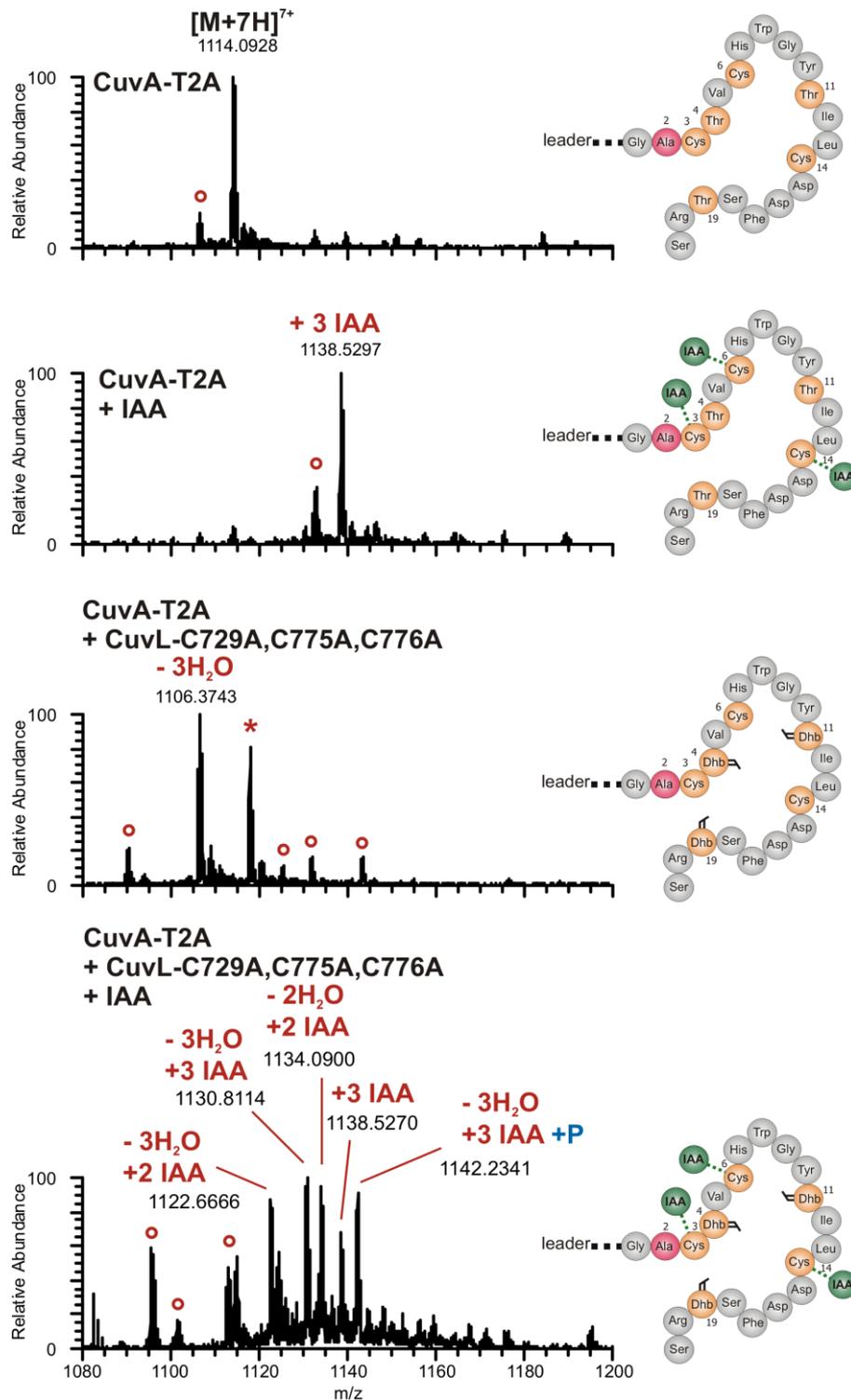


Abbildung A14 Aktivitäts- und Cyclisierungsassay (T2A, CuvL-C729A;C775A;C776A)

Rekombinantes Vorläufer-Peptid His₆-TEV-CuvA-T2A nach Inkubation mit rekombinantem CuvL-C729A,C775A,C776A, dATP und Mg²⁺ Ionen, gefolgt von HPLC-ESI-MS. Dargestellt ist, neben dem Massenspektrum, ein Modell der in diesem Spektrum abundantesten Peptidspezies. IAA: Iodacetamid, Sternchen*: phosphorylierte Peptidspezies, Kreis°: Nebenprodukte der Peptidaufreinigung oder der *in vitro* Bedingungen, Abu-S-Ala: MeLan-Brücke.

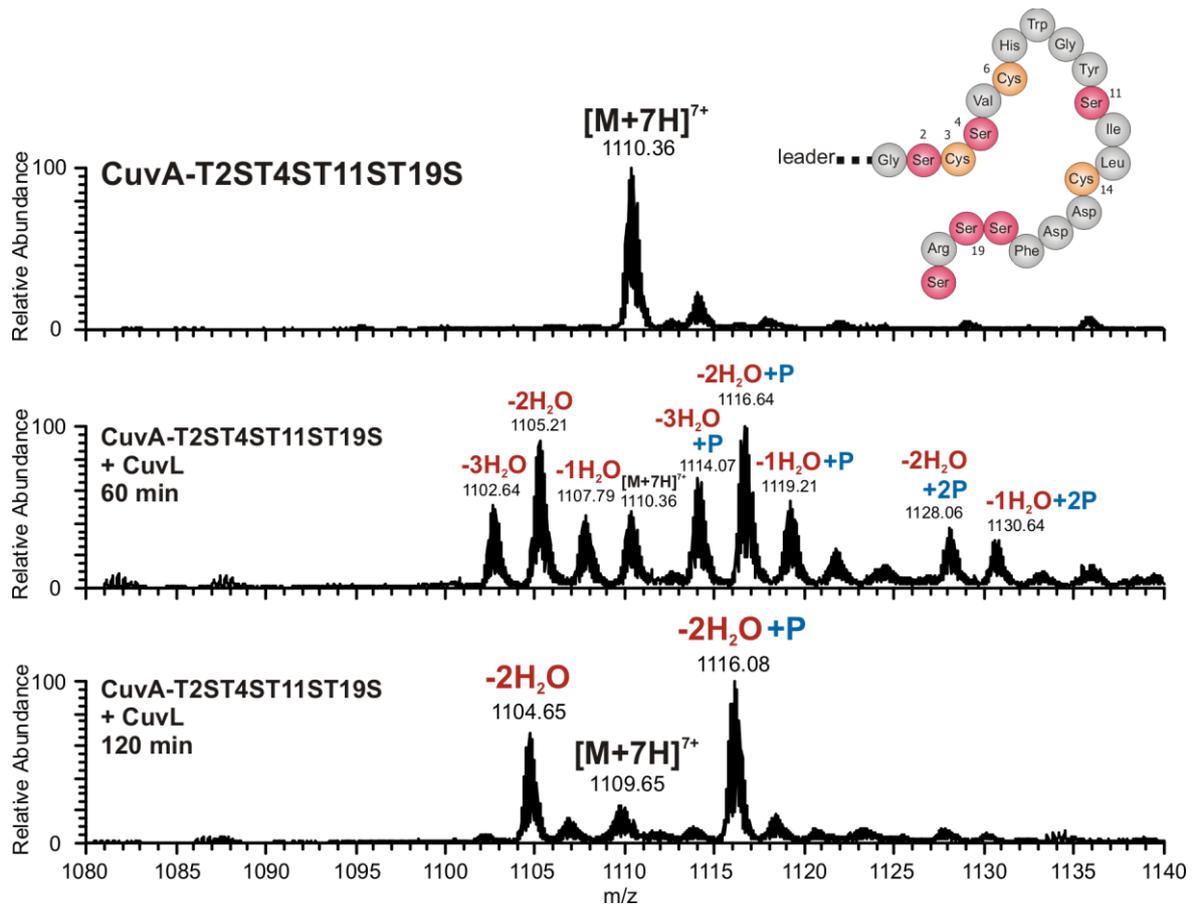


Abbildung A15 Aktivitätsassay (T2ST4ST11ST19S, CuvL)

Rekombinantes Vorläufer-Peptid His₆-TEV-CuvA-T2ST4ST11ST19S nach Inkubation mit rekombinantem CuvL, dATP und Mg²⁺ Ionen, gefolgt von HPLC-ESI-MS. Gemessen wurde neben der Kontrolle eine Probe nach 60 min Inkubation und eine Probe nach 120 min Inkubation. Dargestellt ist, neben den Massenspektren, ein Modell des Vorläufer-Peptids. P: Phosphat-Addukt.

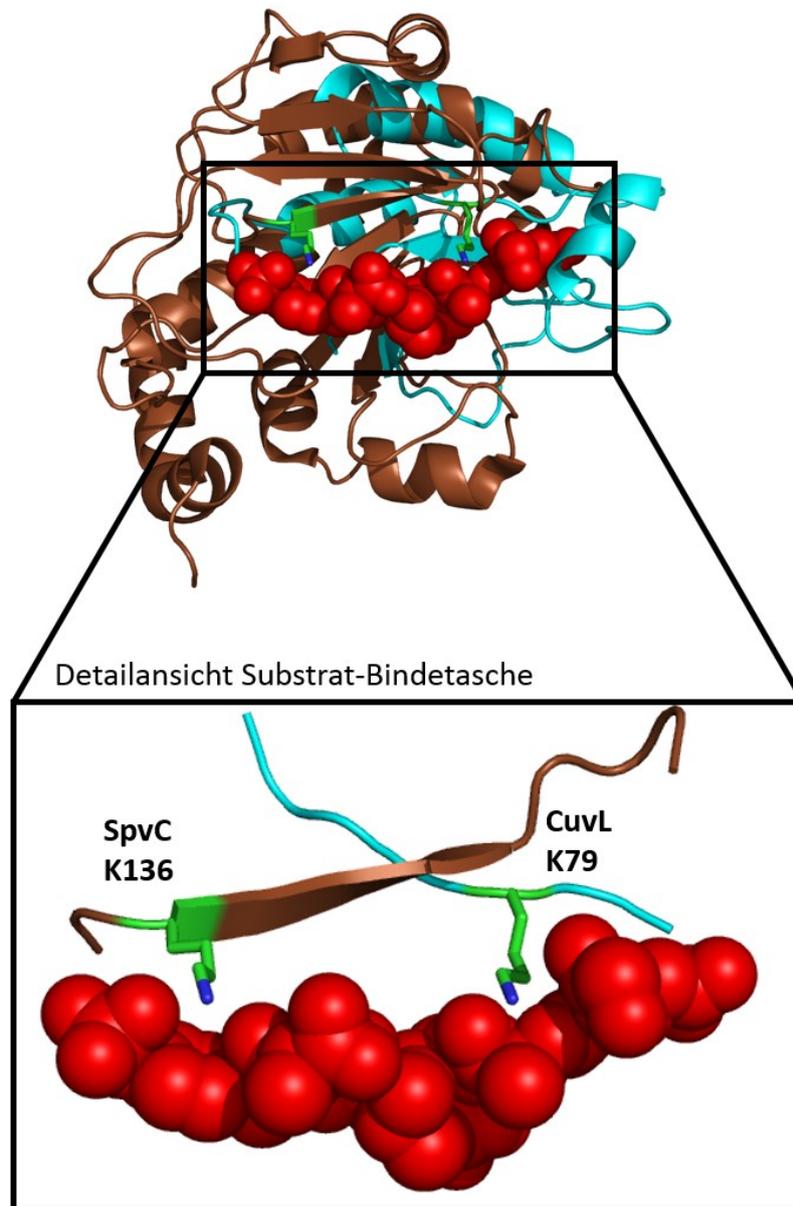


Abbildung A16 Modellierung *in silico* der CuvL-Lyasedomäne auf Basis der SpvC-Struktur

Mit Hilfe von SWISS-MODEL auf Basis der Struktur von SpvC (braun, PDB ID: 2Q8Y) modellierte Struktur der CuvL-Lyasedomäne (cyan). Die Modelle wurden in PyMol übereinandergelegt (*alignment*). Das an die Bindetasche von SpvC gebundene Peptidsubstrat in rot. Die Detailansicht zeigt K136 in SpvC, das für die Bindung des Substrat essentiell ist. Im CuvL-Modell ragt K79 in ähnlicher Form in die Bindetasche herein und begründete somit die Hypothese, für die CuvL-Lyasefunktion in ähnlicher Form essentiell zu sein.

6.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die meine Arbeit an dieser Dissertation ermöglicht und unterstützt haben. An erster Stelle bedanke ich mich bei Professor Roderich Süssmuth für die Aufnahme in seine interdisziplinäre Arbeitsgruppe und für die Vergabe dieses spannenden und anspruchsvollen Projektes. Besonders bedanken möchte ich mich auch für die stete Unterstützung, Förderung und Motivation während der recht langen Zeit, in der die ersten drei Projekte letztlich daran scheiterten, dass Experimente nicht funktionierten oder keine reproduzierbaren Daten liefern konnten.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Teilnahme an der wissenschaftlichen Aussprache möchte ich Professorin Elke Dittmann ganz herzlich danken.

Professor Reinhard Schomäcker möchte ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes und die damit verbundenen Verbindlichkeiten ganz herzlich danken.

Besonderer Dank gilt Dr. Andi Mainz und Dr. Agnes Mühlenweg für die ausgezeichnete Unterstützung während der schwierigsten Abschnitte im Projekt, für Diskussionen über Ideen und Strategien und darüber hinausgehende Hilfestellungen.

Professor Holger Dobbek möchte ich für die Möglichkeit danken, in seiner Arbeitsgruppe die Arbeiten zur Kristallisation von CuvL vornehmen zu können. Berta Martins und Friederike Klemke danke ich für das initiale Modellieren der Struktur, für die vielen Hilfestellungen mit dem Pipettierroboter HoneyBee, beim Ansetzen von Testierlösungen und für den stets freundlichen und humorvollen Umgang miteinander. Berta möchte ich außerdem ausdrücklich für die Hilfe mit dem Manuskript zur Kristallisation danken.

Für das ausgezeichnete, kollegiale Arbeitsklima, für gemeinsame Kaffee- und Treppenpausen, für fachliche und weniger fachliche Gespräche, Ermunterungen und die gelegentliche Korrektur möchte ich meinen Kollegen Sascha Ramm, Melanie Gonsior, Martin Jasyk, Simon Boecker, Maria Kunert, Natalia Jungmann, Manuela Hügelland, Eva Mösker, Anette Poch, Rashed Altoma, Marc Griffel, Dennis Kerwat und Patrick Durkins in besonderem Maße danken. Eric van Herwerden, Bianca Schmid und Romina Schnegotski danke ich für die Synthese der SPPS-Peptide.

Einen ausdrücklichen Dank möchte ich auch an Alex E. richten, deren mutiger und selbstloser Einsatz der Wissenschaft einen großartigen Dienst erwiesen hat.

Zu guter Letzt gilt meine größte Dankbarkeit meiner Freundin Martina, meinen Eltern Jutta und Georg, meinen Geschwistern Sarah und Denis und all meinen Freunden, die mich auf dem Weg zur Dissertation stets unterstützt und gestützt haben, wo immer das am nötigsten war. Thorsten Stehlik, Sunny Sharma und Jan Riedel danke ich für die gemeinsame Studienzeit in Marburg und Frankfurt/Main.

7 Literatur

- (1) Demain, A. L. Antibiotics: Natural Products Essential to Human Health. *Med. Res. Rev.* **2009**, *29* (6), 821–842.
- (2) Sparks, T. C.; Crouse, G. D.; Durst, G. Natural Products as Insecticides: The Biology, Biochemistry and Quantitative Structure-Activity Relationships of Spinosyns and Spinosoids. *Pest Manag. Sci.* **2001**, *57* (10), 896–905.
- (3) Vengurlekar, S.; Sharma, R.; Trivedi, P. Efficacy of Some Natural Compounds as Antifungal Agents. *Pharmacogn. Rev.* **2012**, *6* (12), 91–99.
- (4) Cantrell, C. L.; Dayan, F. E.; Duke, S. O. Natural Products As Sources for New Pesticides. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75* (6), 1231–1242.
- (5) Dayan, F. E.; Duke, S. O. Natural Compounds as Next-Generation Herbicides. *Plant Physiol.* **2014**, *166* (3), 1090–1105.
- (6) Miller, L. H.; Su, X. Artemisinin: Discovery from the Chinese Herbal Garden. *Cell* **2011**, *146* (6), 855–858.
- (7) Sasaki, T.; Takagi, M.; Yaguchi, T.; Miyadoh, S.; Okada, T.; Koyama, M. A New Anthelmintic Cyclopeptide, PF1022A. *J. Antibiot.* **1992**, *45* (5), 692–697.
- (8) Férir, G.; Petrova, M. I.; Andrei, G.; Huskens, D.; Hoorelbeke, B.; Snoeck, R.; Vanderleyden, J.; Balzarini, J.; Bartoschek, S.; Brönstrup, M.; Süßmuth, R. D.; Schols, D. The Lantibiotic Peptide Labyrinthopeptin A1 Demonstrates Broad Anti-HIV and Anti-HSV Activity with Potential for Microbicidal Applications. *PLoS One* **2013**, *8* (5), e64010.
- (9) McKee, T. C.; Bokesch, H. R.; McCormick, J. L.; Rashid, M. A.; Spielvogel, D.; Gustafson, K. R.; Alavanja, M. M.; Cardellina, J. H.; Boyd, M. R. Isolation and Characterization of New Anti-HIV and Cytotoxic Leads from Plants, Marine, and Microbial Organisms. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60* (5), 431–438.
- (10) Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. Plant Antitumor Agents. VI. Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93* (9), 2325–2327.
- (11) Mayer, A. M. S.; Glaser, K. B.; Cuevas, C.; Jacobs, R. S.; Kem, W.; Little, R. D.; McIntosh, J. M.; Newman, D. J.; Potts, B. C.; Shuster, D. E. The Odyssey of Marine Pharmaceuticals: A Current Pipeline Perspective. *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, *31* (6), 255–265.
- (12) Meindl, K.; Schmiederer, T.; Schneider, K.; Reicke, A.; Butz, D.; Keller, S.; Gühring, H.; Vértesy, L.; Wink, J.; Hoffmann, H.; Brönstrup, M.; Sheldrick, G. M.; Süßmuth, R. D. Labyrinthopeptins: A New Class of Carbacyclic Lantibiotics. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (6), 1151–1154.
- (13) Borel, J. F.; Feurer, C.; Gubler, H. U.; Stahelin, H. Biological Effects of Cyclosporin A: A New Antilymphocytic Agent. *Agents Actions* **1976**, *6* (4), 468–475.
- (14) Jaeger, P.; Ferguson, R. K.; Brunner, H. R.; Kirchertz, E. J.; Gavras, H. Mechanism of Blood Pressure Reduction by Teprotide (SQ 20881) in Rats. *Kidney Int.* **1978**, *13* (4), 289–296.
- (15) Alberts, A. W.; Chen, J.; Kuron, G.; Hunt, V.; Huff, J.; Hoffman, C.; Rothrock, J.; Lopez, M.; Joshua, H.; Harris, E.; Patchett, A.; Monaghan, R.; Currie, S.; Stapley, E.; Albers-Schonberg, G.; Hensens, O.; Hirshfield, J.; Hoogsteen, K.; Liesch, J.; Springer, J. Mevinolin: A Highly Potent

- Competitive Inhibitor of Hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A Reductase and a Cholesterol-Lowering Agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77* (7), 3957–3961.
- (16) Staunton, J.; Weissman, K. J. Polyketide Biosynthesis: A Millennium Review. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18* (4), 380–416.
- (17) Blundell, T.; Dodson, G.; Hodgekin, D.; Mercola, D. Insulin: The Structure In The Crystal And Its Reflection In Chemistry And Biology. *Adv. Protein Chem.* **1972**, *26*, 279–402.
- (18) Kojima, M.; Hosoda, H.; Date, Y.; Nakazato, M.; Matsuo, H.; Kangawa, K. Ghrelin Is a Growth-Hormone-Releasing Acylated Peptide from Stomach. *Nature* **1999**, *402* (6762), 656–660.
- (19) Hughes, J.; Smith, T.; Morgan, B.; Fothergill, L. Purification and Properties of Enkephalin - The Possible Endogenous Ligand of the Morphine Receptor. *Life Sci.* **1975**, *16* (20), 1753–1758.
- (20) Lembeck, F. The Archeology of Substance P. *Neuropeptides* **2008**, *42* (4), 444–453.
- (21) Yang, D.; Biragyn, A.; Kwak, L. W.; Oppenheim, J. J. Mammalian Defensins in Immunity: More than Just Microbicidal. *Trends Immunol.* **2002**, *23* (6), 291–296.
- (22) García-Olmedo, F.; Molina, A.; Alamillo, J. M.; Rodríguez-Palenzuela, P. Plant Defense Peptides. *Biopolymers* **1998**, *47* (6), 479–491.
- (23) Mor, A.; Hani, K.; Nicolas, P. The Vertebrate Peptide Antibiotics Dermaseptins Have Overlapping Structural Features But Target Specific Microorganisms. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (50), 31635–31641.
- (24) Strydom, D. J. Snake Venom Toxins. Purification and Properties of Low-Molecular-Weight Polypeptides of *Dendroaspis Polylepis Polylepis* (Black Mamba) Venom. *Eur. J. Biochem.* **1976**, *69* (1), 169–176.
- (25) Mach, B.; Reich, E.; Tatum, E. L. Separation of the Biosynthesis of the Antibiotic Polypeptide Tyrcidine from Protein Biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1963**, *50*, 175–181.
- (26) Gevers, W.; Kleinkauf, H.; Lipmann, F. Peptidyl Transfers In Gramicidin S Biosynthesis From Enzyme-Bound Thioester Intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1969**, *63*, 1335–1342.
- (27) McIntosh, J. A.; Donia, M. S.; Schmidt, E. W. Ribosomal Peptide Natural Products: Bridging the Ribosomal and Nonribosomal Worlds. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26* (4), 537.
- (28) Süßmuth, R. D.; Mainz, A. Nicht-ribosomale Peptidsynthese - Prinzipien und Perspektiven. *Angew. Chem.* **2017**, *129* (14), 3824–3878.
- (29) Richardt, A.; Kemme, T.; Wagner, S.; Schwarzer, D.; Marahiel, M. A.; Hovemann, B. T. Ebony, A Novel Nonribosomal Peptide Synthetase for β -Alanine Conjugation with Biogenic Amines in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (42), 41160–41166.
- (30) Shou, Q.; Feng, L.; Long, Y.; Han, J.; Nunnery, J. K.; Powell, D. H.; Butcher, R. A. A Hybrid Polyketide–Nonribosomal Peptide in Nematodes That Promotes Larval Survival. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12* (10), 770–772.
- (31) Walsh, C. T.; Chen, H.; Keating, T. A.; Hubbard, B. K.; Losey, H. C.; Luo, L.; Marshall, C. G.; Miller, D. A.; Patel, H. M. Tailoring Enzymes That Modify Nonribosomal Peptides during and after Chain Elongation on NRPS Assembly Lines. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5* (5), 525–534.
- (32) Stein, T.; Kluge, B.; Vater, J.; Franke, P.; Otto, A.; Wittmann-Liebold, B. Gramicidin S Synthetase 1 (Phenylalanine Racemase), a Prototype of Amino Acid Racemases Containing the Cofactor 4'-Phosphopantetheine. *Biochemistry* **1995**, *34*, 4633–4642.
- (33) Chhabra, A.; Haque, A. S.; Pal, R. K.; Goyal, A.; Rai, R.; Joshi, S.; Panjekar, S.; Pasha, S.; Sankaranarayanan, R.; Gokhale, R. S. Nonprocessive [2+2]E⁻ off-Loading Reductase Domains from Mycobacterial Nonribosomal Peptide Synthetases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109* (15), 5681–5686.
- (34) Perlova, O.; Fu, J.; Kuhlmann, S.; Krug, D.; Stewart, A. F.; Zhang, Y.; Muller, R. Reconstitution of the Myxothiazol Biosynthetic Gene Cluster by Red/ET Recombination and Heterologous Expression in *Myxococcus Xanthus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72* (12), 7485–7494.
- (35) Schoenafinger, G.; Schracke, N.; Linne, U.; Marahiel, M. A. Formylation Domain: An Essential Modifying Enzyme for the Nonribosomal Biosynthesis of Linear Gramicidin. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (23), 7406–7407.

- (36) Labby, K. J.; Watsula, S. G.; Garneau-Tsodikova, S. Interrupted Adenylation Domains: Unique Bifunctional Enzymes Involved in Nonribosomal Peptide Biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32* (5), 641–653.
- (37) Finking, R.; Marahiel, M. A. Biosynthesis of Nonribosomal Peptides. *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, *58* (1), 453–488.
- (38) Wang, H.; Fewer, D. P.; Holm, L.; Rouhiainen, L.; Sivonen, K. Atlas of Nonribosomal Peptide and Polyketide Biosynthetic Pathways Reveals Common Occurrence of Nonmodular Enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111* (25), 9259–9264.
- (39) Carpaneto, A.; Dalla Serra, M.; Menestrina, G.; Fogliano, V.; Gambale, F. The Phytotoxic Lipodepsipeptide Syringopeptin 25A from *Pseudomonas Syringae* pv. *Syringae* Forms Ion Channels in Sugar Beet Vacuoles. *J. Membrane Biol.* **2002**, *188* (3), 237–248.
- (40) Grabowska, A.; Nowicki, M.; Kwinta, J. Glutamate Dehydrogenase of the Germinating Triticale Seeds: Gene Expression, Activity Distribution and Kinetic Characteristics. *Acta Physiol. Plant* **2011**, *33* (5), 1981–1990.
- (41) de Koning, T. J.; Snell, K.; Duran, M.; Berger, R.; Poll-The, B.-T.; Surtees, R. L-Serine in Disease and Development. *Biochem. J.* **2003**, *371* (3), 653–661.
- (42) Mirande, M. Aminoacyl-tRNA Synthetase Family from Prokaryotes and Eukaryotes: Structural Domains and Their Implications. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*; Elsevier, 1991; Vol. 40, pp 95–142.
- (43) Ben-Shem, A.; de Loubresse, N. G.; Melnikov, S.; Jenner, L.; Yusupova, G.; Yusupov, M. The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0 Å Resolution. *Science* **2011**, *334*, 6.
- (44) Arnison, P. G.; Bibb, M. J.; Bierbaum, G.; Bowers, A. A.; Bugni, T. S.; Bulaj, G.; Camarero, J. A.; Campopiano, D. J.; Challis, G. L.; Clardy, J.; Cotter, P. D.; Craik, D. J.; Dawson, M.; Dittmann, E.; Donadio, S.; Dorrestein, P. C.; Entian, K.-D.; Fischbach, M. A.; Garavelli, J. S.; Göransson, U.; Gruber, C. W.; Haft, D. H.; Hemscheidt, T. K.; Hertweck, C.; Hill, C.; Horswill, A. R.; Jaspars, M.; Kelly, W. L.; Klinman, J. P.; Kuipers, O. P.; Link, A. J.; Liu, W.; Marahiel, M. A.; Mitchell, D. A.; Moll, G. N.; Moore, B. S.; Müller, R.; Nair, S. K.; Nes, I. F.; Norris, G. E.; Olivera, B. M.; Onaka, H.; Patchett, M. L.; Piel, J.; Reaney, M. J. T.; Rebuffat, S.; Ross, R. P.; Sahl, H.-G.; Schmidt, E. W.; Selsted, M. E.; Severinov, K.; Shen, B.; Sivonen, K.; Smith, L.; Stein, T.; Süßmuth, R. D.; Tagg, J. R.; Tang, G.-L.; Truman, A. W.; Vederas, J. C.; Walsh, C. T.; Walton, J. D.; Wenzel, S. C.; Willey, J. M.; van der Donk, W. A. Ribosomally Synthesized and Post-Translationally Modified Peptide Natural Products: Overview and Recommendations for a Universal Nomenclature. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30* (1), 108–160.
- (45) Rubin, G. M.; Ding, Y. Recent Advances in the Biosynthesis of RiPPs from Multicore-Containing Precursor Peptides. *J. Ind. Microb. Biotech.* **2020**, *47* (9–10), 659–674..
- (46) Martin-Visscher, L. A.; van Belkum, M. J.; Vederas, J. C. Class IIc or Circular Bacteriocins. In *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*; Drider, D., Rebuffat, S., Eds.; Springer New York: New York, NY, 2011; pp 213–236.
- (47) Tan, N.-H.; Zhou, J. Plant Cyclopeptides. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (3), 840–895.
- (48) Craik, D. J.; Daly, N. L.; Bond, T.; Waite, C. Plant Cyclotides: A Unique Family of Cyclic and Knotted Proteins That Defines the Cyclic Cysteine Knot Structural Motif. *J. Mol. Biol.* **1999**, *294* (5), 1327–1336.
- (49) Kawulka, K.; Sprules, T.; McKay, R. T.; Mercier, P.; Diaper, C. M.; Zuber, P.; Vederas, J. C. Structure of Subtilosin A, an Antimicrobial Peptide from *Bacillus Subtilis* with Unusual Posttranslational Modifications Linking Cysteine Sulfurs to α -Carbons of Phenylalanine and Threonine. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (16), 4726–4727.
- (50) Walton, J. D.; Hallen-Adams, H. E.; Luo, H. Ribosomal Biosynthesis of the Cyclic Peptide Toxins of *Amanita* Mushrooms. *Biopolymers* **2010**, *94* (5), 659–664.
- (51) Buczek, O.; Bulaj, G.; Olivera, B. M. Conotoxins and the Posttranslational Modification of Secreted Gene Products. *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62* (24), 3067–3079.

- (52) Freeman, M. F.; Gurgui, C.; Helf, M. J.; Morinaka, B. I.; Uria, A. R.; Oldham, N. J.; Sahl, H.-G.; Matsunaga, S.; Piel, J. Metagenome Mining Reveals Polytheonamides as Posttranslationally Modified Ribosomal Peptides. *Science* **2012**, *338* (6105), 387–390.
- (53) Hamada, T.; Sugawara, T.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. Polytheonamides, Unprecedented Highly Cytotoxic Polypeptides from the Marine Sponge *Theonella Swinhoei*. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35* (5), 719–720.
- (54) Hamada, T.; Matsunaga, S.; Fujiwara, M.; Fujita, K.; Hirota, H.; Schmucki, R.; Güntert, P.; Fusetani, N. Solution Structure of Polytheonamide B, a Highly Cytotoxic Nonribosomal Polypeptide from Marine Sponge. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (37), 12941–12945.
- (55) Huo, L.; Rachid, S.; Stadler, M.; Wenzel, S. C.; Müller, R. Synthetic Biotechnology to Study and Engineer Ribosomal Botromycin Biosynthesis. *Chem. Biol.* **2012**, *19* (10), 1278–1287.
- (56) Crone, W. J. K.; Leeper, F. J.; Truman, A. W. Identification and Characterisation of the Gene Cluster for the Anti-MRSA Antibiotic Botromycin: Expanding the Biosynthetic Diversity of Ribosomal Peptides. *Chem. Sci.* **2012**, *3* (12), 3516.
- (57) Gomez-Escribano, J. P.; Song, L.; Bibb, M. J.; Challis, G. L. Posttranslational β -Methylation and Macrolactamidation in the Biosynthesis of the Botromycin Complex of Ribosomal Peptide Antibiotics. *Chem. Sci.* **2012**, *3* (12), 3522.
- (58) Gillor, O.; Kirkup, B. C.; Riley, M. A. Colicins and Microcins: The Next Generation Antimicrobials. In *Advances in Applied Microbiology*; Elsevier, 2004; Vol. 54, pp 129–146.
- (59) Bayer, A.; Freund, S.; Nicholson, G.; Jung, G. Posttranslational Backbone Modifications in the Ribosomal Biosynthesis of the Glycine-Rich Antibiotic Microcin B17. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32* (9), 1336–1339.
- (60) Rebuffat, S.; Blond, A.; Destoumieux-Garzon, D.; Goulard, C.; Peduzzi, J. Microcin J25, from the Macrocyclic to the Lasso Structure: Implications for Biosynthetic, Evolutionary and Biotechnological Perspectives. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2004**, *5* (5), 383–391.
- (61) Guijarro, J. I.; González-Pastor, J. E.; Baleux, F.; Millán, J. L. S.; Castilla, M. A.; Rico, M.; Moreno, F.; Delepierre, M. Chemical Structure and Translation Inhibition Studies of the Antibiotic Microcin C7. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (40), 23520–23532.
- (62) Ishitsuka, M. O.; Kusumi, T.; Kakisawa, H.; Kaya, K.; Watanabe, M. M. Microviridin. A Novel Tricyclic Depsipeptide from the Toxic Cyanobacterium *Mirocystis Viridis*. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (2), 8180–8182.
- (63) Weiz, A. R.; Ishida, K.; Makower, K.; Ziemert, N.; Hertweck, C.; Dittmann, E. Leader Peptide and a Membrane Protein Scaffold Guide the Biosynthesis of the Tricyclic Peptide Microviridin. *Chem. Biol.* **2011**, *18* (11), 1413–1421.
- (64) Murakami, M.; Sun, Q.; Ishida, K.; Matsuda, H.; Okino, T.; Yamaguchi, K. Microviridins, Elastase Inhibitors from the Cyanobacterium *Nostoc Minutum* (NIES-26). *Phytochemistry* **1997**, *45* (6), 1197–1202.
- (65) Rohrlack, T.; Christoffersen, K.; Kaebernick, M.; Neilan, B. A. Cyanobacterial Protease Inhibitor Microviridin J Causes a Lethal Molting Disruption in *Daphnia Pulicaria*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70* (8), 5047–5050.
- (66) Shin, H. J.; Murakami, M.; Matsuda, H.; Yamaguchi, K. Microviridins D-F, Serine Protease Inhibitors from the Cyanobacterium *Oscillatoria Agardhii* (NIES-204). *Tetrahedron* **1996**, *52* (24), 8159–8168.
- (67) Unno, K.; Kodani, S. Heterologous Expression of Cryptic Biosynthetic Gene Cluster from *Streptomyces prunicolor* Yields Novel Bicyclic Peptide Prunipeptin. *Microbiol Res* **2021**, *244*, 126669.
- (68) Lee, H.; Choi, M.; Park, J.-U.; Roh, H.; Kim, S. Genome Mining Reveals High Topological Diversity of ω -Ester-Containing Peptides and Divergent Evolution of ATP-Grasp Macrocyclases. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (6), 3013–3023.
- (69) Fawaz, M. V.; Topper, M. E.; Firestine, S. M. The ATP-Grasp Enzymes. *Bioorg. Chem.* **2011**, *39* (5–6), 185–191.

- (70) Li, Y.-M.; Milne, J. C.; Madison, L. L.; Kolter, R.; Walsh, C. T. From Peptide Precursors to Oxazole and Thiazole-Containing Peptide Antibiotics: Microcin Bi 7 Synthase. *Science* **1996**, *274*, 1188–1193.
- (71) Lee, S. W.; Mitchell, D. A.; Markley, A. L.; Hensler, M. E.; Gonzalez, D.; Wohlrab, A.; Dorrestein, P. C.; Nizet, V.; Dixon, J. E. Discovery of a Widely Distributed Toxin Biosynthetic Gene Cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105* (15), 5879–5884.
- (72) Onaka, H.; Nakaho, M.; Hayashi, K.; Igarashi, Y.; Furumai, T. Cloning and Characterization of the Goadsporin Biosynthetic Gene Cluster from *Streptomyces* sp. TP-A0584. *Microbiology* **2005**, *151* (12), 3923–3933.
- (73) Melby, J. O.; Nard, N. J.; Mitchell, D. A. Thiazole/Oxazole-Modified Microcins: Complex Natural Products from Ribosomal Templates. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15* (3), 369–378.
- (74) Scholz, R.; Molohon, K. J.; Nachtigall, J.; Vater, J.; Markley, A. L.; Sussmuth, R. D.; Mitchell, D. A.; Borriss, R. Plantazolicin, a Novel Microcin B17/Streptolysin S-Like Natural Product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Bacteriol.* **2011**, *193* (1), 215–224.
- (75) Molohon, K. J.; Melby, J. O.; Lee, J.; Evans, B. S.; Dunbar, K. L.; Bumpus, S. B.; Kelleher, N. L.; Mitchell, D. A. Structure Determination and Interception of Biosynthetic Intermediates for the Plantazolicin Class of Highly Discriminating Antibiotics. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6* (12), 1307–1313.
- (76) Lee, J.; McIntosh, J.; Hathaway, B. J.; Schmidt, E. W. Using Marine Natural Products to Discover a Protease That Catalyzes Peptide Macrocyclization of Diverse Substrates. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (6), 2122–2124.
- (77) McIntosh, J. A.; Schmidt, E. W. Marine Molecular Machines: Heterocyclization in Cyanobactin Biosynthesis. *ChemBioChem* **2010**, *11* (10), 1413–1421.
- (78) McIntosh, J. A.; Donia, M. S.; Nair, S. K.; Schmidt, E. W. Enzymatic Basis of Ribosomal Peptide Prenylation in Cyanobacteria. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (34), 13698–13705.
- (79) Sivonen, K.; Leikoski, N.; Fewer, D. P.; Jokela, J. Cyanobactins—Ribosomal Cyclic Peptides Produced by Cyanobacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86* (5), 1213–1225.
- (80) Donia, M. S.; Ravel, J.; Schmidt, E. W. A Global Assembly Line for Cyanobactins. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4* (6), 341–343.
- (81) Houssen, W. E.; Jaspars, M. Azole-Based Cyclic Peptides from the Sea Squirt *Lissoclinum patella*: Old Scaffolds, New Avenues. *ChemBioChem* **2010**, *11* (13), 1803–1815.
- (82) Carroll, A. R.; Coll, J. C.; Bourne, D. J.; Macleod, J. K.; Zabriskie, T. M.; Ireland, C. M.; Bowden, B. F. Patellins 1-6 and Trunkamide A: Novel Cyclic Hexa-, Hepta- and Octa-Peptides From Colonial Ascidians, *Lissoclinum* sp. *Aust. J. Chem.* **1996**, *49* (6), 659–667.
- (83) Wipf, P.; Venkatraman, S.; Miller, C. P.; Geib, S. J. Metallkomplexe mariner Peptidmetaboliten: ein neuartiger Ag4-Cluster. *Angew. Chem.* **1994**, *106* (14), 1554–1556.
- (84) Bertram, A.; Pattenden, G. Marine Metabolites: Metal Binding and Metal Complexes of Azole-Based Cyclic Peptides of Marine Origin. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24* (1), 18.
- (85) Williams, D. E.; Moore, R. E.; Paul, V. J. The Structure of Ulithiacyclamide B. Antitumor Evaluation of Cyclic Peptides and Macrolides from *Lissoclinum Patella*. *J. Nat. Prod.* **1989**, *52* (4), 732–739.
- (86) Mikolajka, A.; Liu, H.; Chen, Y.; Starosta, A. L.; Márquez, V.; Ivanova, M.; Cooperman, B. S.; Wilson, D. N. Differential Effects of Thiopeptide and Orthosomycin Antibiotics on Translational GTPases. *Chem. Biol.* **2011**, *18* (5), 589–600.
- (87) Hegde, N. S.; Sanders, D. A.; Rodriguez, R.; Balasubramanian, S. The Transcription Factor FOXM1 Is a Cellular Target of the Natural Product Thiostrepton. *Nature Chem.* **2011**, *3* (9), 725–731.
- (88) Hensens, O. D.; Albers-Schönberg, G. The Total Structure of the Highly Modified Peptide Antibiotic Components of Thiopeptin. *J. Antibiot.* **1983**, *36* (7), 814–831.
- (89) Anderson, B.; Hodgekin, D. C.; Viswamitra, M. A. The Structure of Thiostrepton. *Nature* **1970**, *225* (5229), 233–235.

- (90) Bagley, M. C.; Merritt, E. A. The Stereochemistry of Micrococcin P1 Reinvestigated. *J. Antibiot.* **2004**, *57* (12), 829–831.
- (91) Maksimov, M. O.; Pan, S. J.; James Link, A. Lasso Peptides: Structure, Function, Biosynthesis, and Engineering. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29* (9), 996.
- (92) Levengood, M. R.; Knerr, P. J.; Oman, T. J.; van der Donk, W. A. In Vitro Mutasynthesis of Lantibiotic Analogues Containing Nonproteinogenic Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (34), 12024–12025.
- (93) Yano, K.; Toki, S.; Nakanishi, S.; Ochiai, K.; Ando, K.; Yoshida, M.; Matsuda, Y.; Yamasaki, M. MS-271, A Novel Inhibitor of Calmodulin-Activated Myosin Light Chain Kinase from *Streptomyces* sp. I. Isolation, Structural Determination and Biological Properties of MS-27. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4* (1), 115–120.
- (94) Knappe, T. A.; Linne, U.; Xie, X.; Marahiel, M. A. The Glucagon Receptor Antagonist BI-32169 Constitutes a New Class of Lasso Peptides. *FEBS Lett.* **2010**, *584* (4), 785–789.
- (95) Helynck, G.; Dubertret, C.; Mayaux, J.-F.; Leboul, J. Isolation of RP 71955, a New Anti-HIV-1 Peptide Secondary Metabolite. *J. Antibiot.* **1993**, *46* (11), 1756–1757.
- (96) Tsunakawa, M.; Hu, S.-L.; Hoshino, Y.; Detlefsen, D. J.; Hill, S. E.; Furumai, T.; White, R. J. Siamycins I and II, New Anti-HIV Peptides. I. Fermentation, Isolation, Biological Activity and Initial Characterization. *J. Antibiot.* **1995**, *48* (5), 433–434.
- (97) Knappe, T. A.; Linne, U.; Robbel, L.; Marahiel, M. A. Insights into the Biosynthesis and Stability of the Lasso Peptide Capistrucin. *Chem. Biol.* **2009**, *16* (12), 1290–1298.
- (98) Sterner, O.; Etzel, W.; Mayer, A.; Anke, H. Omphalotin, A New Cyclic Peptide with Potent Nematicidal Activity from *Omphalotus olearius* II. Isolation and Structure Determination. *Nat. Prod. Lett.* **1997**, *10* (1), 33–38.
- (99) Büchel, E.; Martini, U.; Mayer, A.; Anke, H.; Sterner, O. Omphalotins B, C and D, Nematicidal Cyclopeptides from *Omphalotus olearius*. Absolute Configuration of Omphalotin A. *Tetrahedron* **1998**, *54* (20), 5345–5352.
- (100) Liermann, J. C.; Opatz, T.; Kolshorn, H.; Antelo, L.; Hof, C.; Anke, H. Omphalotins E-I, Five Oxidatively Modified Nematicidal Cyclopeptides from *Omphalotus olearius*. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, *2009* (8), 1256–1262.
- (101) Mayer, A.; Anke, H.; Sterner, O. Omphalotin, A New Cyclic Peptide with Potent Nematicidal Activity from *Omphalotus olearius* I. Fermentation and Biological Activity. *Natural Product Letters* **1997**, *10* (1), 25–32.
- (102) Scherer, G.; Kramer, M. L.; Schutkowski, M.; Reimer, U.; Fischer, G. Barriers to Rotation of Secondary Amide Peptide Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (22), 5568–5574.
- (103) Dreyfuss, M.; Härrli, E.; Hofmann, H.; Kobel, H.; Pache, W.; Tschertter, H. Cyclosporin A and C: New Metabolites From *Trichoderma Polysporum*. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **1976**, *3* (2), 125–133.
- (104) Hollstein, U. Actinomycin. Chemistry and Mechanism of Action. *Chem. Rev.* **1974**, *74* (6), 625–652.
- (105) Ramm, S.; Krawczyk, B.; Mühlenweg, A.; Poch, A.; Mösker, E.; Süßmuth, R. D. A Self-Sacrificing N-Methyltransferase Is the Precursor of the Fungal Natural Product Omphalotin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (33), 9994–9997.
- (106) van der Velden, N. S.; Kälin, N.; Helf, M. J.; Piel, J.; Freeman, M. F.; Künzler, M. Autocatalytic Backbone N-Methylation in a Family of Ribosomal Peptide Natural Products. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13* (8), 833–835.
- (107) Ding, W.; Liu, W.-Q.; Jia, Y.; Li, Y.; van der Donk, W. A.; Zhang, Q. Biosynthetic Investigation of Phomopsins Reveals a Widespread Pathway for Ribosomal Natural Products in Ascomycetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2016**, *113* (13), 3521–3526.
- (108) Kersten, R. D.; Weng, J.-K. Gene-Guided Discovery and Engineering of Branched Cyclic Peptides in Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2018**, *115* (46).
- (109) Eyles, T. H.; Vior, N. M.; Lacret, R.; Truman, A. W. Understanding Thioamide Biosynthesis Using Pathway Engineering and Untargeted Metabolomics. *Chem. Sci.* **2021**, *12* (20), 7138–7150.

- (110) Schnell, N.; Entian, K.-D.; Schneider, U.; Götz, F.; Zähner, H.; Kellner, R.; Jung, G. Prepeptide Sequence of Epidermin, a Ribosomally Synthesized Antibiotic with Four Sulphide-Rings. *Nature* **1988**, *333* (6170), 276–278.
- (111) Rogers, L. A. The Inhibiting Effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.* **1928**, *16* (5), 321–325.
- (112) Fleming, A. On The Antibacterial Action Of Cultures Of A Penicillium, With Special Reference To Their Use In The Isolation Of *B. Influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10* (3), 226–236.
- (113) Gross, E.; Morell, J. L. Structure of Nisin. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93* (18), 4634–4635.
- (114) Bodanszky, M.; Perlman, D. Are Peptide Antibiotics Small Proteins? *Nature* **1964**, *204* (4961), 840–844.
- (115) Ingram, L. A Ribosomal Mechanism for Synthesis of Peptides Related to Nisin. *Biochim. Biophys. Acta* **1970**, *224* (1), 263–265.
- (116) Banerjee, S.; Hansen, J. N. Structure and Expression of a Gene Encoding the Precursor of Subtilin, a Small Protein Antibiotic. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263* (19), 9508–9514.
- (117) Buchman, G. W.; Banerjee, S.; Hansen, J. N. Structure, Expression, and Evolution of a Gene Encoding the Precursor of Nisin, a Small Protein Antibiotic. *J. Biol. Chem.* **263** (31), 16260–16266.
- (118) Kaletta, C.; Entian, K. D. Nisin, a Peptide Antibiotic: Cloning and Sequencing of the NisA Gene and Posttranslational Processing of Its Peptide Product. *J. Bacteriol.* **1989**, *171* (3), 1597–1601.
- (119) Kaletta, C.; Entian, K.-D.; Kellner, R.; Jung, G.; Reis, M.; Sahl, H.-G. Pep5, a New Lantibiotic: Structural Gene Isolation and Prepeptide Sequence. *Arch. Microbiol.* **1989**, *152* (1), 16–19.
- (120) Jung, G. Lantibiotics—Ribosomally Synthesized Biologically Active Polypeptides Containing Sulfide Bridges and α,β -Didehydroamino Acids. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30* (9), 1051–1068.
- (121) Pag, U.; Sahl, H.-G. Multiple Activities in Lantibiotics - Models for the Design of Novel Antibiotics? *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8* (9), 815–833.
- (122) Bierbaum, G.; Sahl, H.-G. Lantibiotics: Mode of Action, Biosynthesis and Bioengineering. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2009**, *10* (1), 2–18.
- (123) Knerr, P. J.; van der Donk, W. A. Discovery, Biosynthesis, and Engineering of Lantipeptides. *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, *81* (1), 479–505.
- (124) Karakas Sen, A.; Narbad, A.; Horn, N.; Dodd, H. M.; Parr, A. J.; Colquhoun, I.; Gasson, M. J. Post-Translational Modification of Nisin. The Involvement of NisB in the Dehydration Process. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *261* (2), 524–532.
- (125) Koponen, O.; Tolonen, M.; Qiao, M.; Wahlström, G.; Helin, J.; Saris, P. E. J. NisB Is Required for the Dehydration and NisC for the Lanthionine Formation in the Post-Translational Modification of Nisin. *Microbiology* **2002**, *148* (Pt 11), 3561–3568.
- (126) Kluskens, L. D.; Kuipers, A.; Rink, R.; de Boef, E.; Fekken, S.; Driessen, A. J. M.; Kuipers, O. P.; Moll, G. N. Post-Translational Modification of Therapeutic Peptides by NisB, the Dehydratase of the Lantibiotic Nisin. *Biochemistry* **2005**, *44* (38), 12827–12834.
- (127) Weil, H. P.; Beck-Sickinger, A. G.; Metzger, J.; Stevanovic, S.; Jung, G.; Josten, M.; Sahl, H. G. Biosynthesis of the Lantibiotic Pep5. Isolation and Characterization of a Prepeptide Containing Dehydroamino Acids. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *194* (1), 217–223.
- (128) Meyer, C.; Bierbaum, G.; Heidrich, C.; Reis, M.; Süling, J.; Iglesias-Wind, M. I.; Kempter, C.; Molitor, E.; Sahl, H. G. 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.* **1995**, *232* (2), 478–489.
- (129) Li, B.; Yu, J. P. J.; Brunzelle, J. S.; Moll, G. N.; van der Donk, W. A.; Nair, S. K. Structure and Mechanism of the Lantibiotic Cyclase Involved in Nisin Biosynthesis. *Science* **2006**, *311* (5766), 1464–1467.

- (130) Helfrich, M.; Entian, K.-D.; Stein, T. Structure-Function Relationships of the Lanthionine Cyclase SpaC Involved in Biosynthesis of the *Bacillus subtilis* Peptide Antibiotic Subtilin. *Biochemistry* **2007**, *46* (11), 3224–3233.
- (131) Siegers, K.; Heinzmann, S.; Entian, K.-D. Biosynthesis of Lantibiotic Nisin: Posttranslational Modification of Its Prepeptide Occurs at a Multimeric Membrane-Associated Lanthionine Synthetase Complex. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (21), 12294–12301.
- (132) Siezen, R. J.; Kuipers, O. P.; de Vos, W. M. Comparison of Lantibiotic Gene Clusters and Encoded Proteins. *Antonie van Leeuwenhoek* **1996**, *69* (2), 171–184.
- (133) Xie, L.; Miller, L. M.; Averin, O.; Chatterjee, C.; Kelleher, N. L.; van der Donk, W. A. Lacticin 481: In Vitro Reconstitution of Lantibiotic Synthetase Activity. *Science* **2004**, *303* (5658), 679–681.
- (134) Goto, Y.; Li, B.; Claesen, J.; Shi, Y.; Bibb, M. J.; van der Donk, W. A. Discovery of Unique Lanthionine Synthetases Reveals New Mechanistic and Evolutionary Insights. *PLoS Biol.* **2010**, *8* (3), e1000339.
- (135) Goto, Y.; Ökesli, A.; van der Donk, W. A. Mechanistic Studies of Ser/Thr Dehydration Catalyzed by a Member of the LanL Lanthionine Synthetase Family. *Biochemistry* **2011**, *50* (5), 891–898.
- (136) Hegemann, J. D.; van der Donk, W. A. Investigation of Substrate Recognition and Biosynthesis in Class IV Lanthipeptide Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (17), 5743–5754.
- (137) Kodani, S.; Hudson, M. E.; Durrant, M. C.; Buttner, M. J.; Nodwell, J. R.; Willey, J. M. The SapB Morphogen Is a Lantibiotic-like Peptide Derived from the Product of the Developmental Gene RamS in *Streptomyces coelicolor*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101* (31), 11448–11453.
- (138) Okeley, N. M.; Paul, M.; Stasser, J. P.; Blackburn, N.; van der Donk, W. A. SpaC and NisC, the Cyclases Involved in Subtilin and Nisin Biosynthesis, Are Zinc Proteins. *Biochemistry* **2003**, *42* (46), 13613–13624.
- (139) Zhang, Q.; Yu, Y.; Velasquez, J. E.; van der Donk, W. A. Evolution of Lanthipeptide Synthetases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109* (45), 18361–18366.
- (140) Iorio, M.; Sasso, O.; Maffioli, S. I.; Bertorelli, R.; Monciardini, P.; Sosio, M.; Bonezzi, F.; Summa, M.; Brunati, C.; Bordoni, R.; Corti, G.; Tarozzo, G.; Piomelli, D.; Reggiani, A.; Donadio, S. A Glycosylated, Labionin-Containing Lanthipeptide with Marked Antinociceptive Activity. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (2), 398–404.
- (141) Jungmann, N. A.; van Herwerden, E. F.; Hügelland, M.; Süßmuth, R. D. The Supersized Class III Lanthipeptide Stackepeptin Displays Motif Multiplication in the Core Peptide. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11* (1), 69–76.
- (142) Minami, Y.; Yoshida, K.-I.; Azuma, R.; Urakawa, A.; Kawauchi, T.; Otani, T.; Komiyama, K.; Omura, S. Structure of Cypemycin, a New Peptide Antibiotic. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35* (43), 8001–8004.
- (143) Claesen, J.; Bibb, M. Genome Mining and Genetic Analysis of Cypemycin Biosynthesis Reveal an Unusual Class of Posttranslationally Modified Peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107* (37), 16297–16302.
- (144) Claesen, J.; Bibb, M. J. Biosynthesis and Regulation of Grisemycin, a New Member of the Linaridin Family of Ribosomally Synthesized Peptides Produced by *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.* **2011**, *193* (10), 2510–2516.
- (145) Rateb, M. E.; Zhai, Y.; Ehrner, E.; Rath, C. M.; Wang, X.; Tabudravu, J.; Ebel, R.; Bibb, M.; Kyeremeh, K.; Dorrestein, P. C.; Hong, K.; Jaspars, M.; Deng, H. Legonaridin, a New Member of Linaridin RiPP from a Ghanaian *Streptomyces* Isolate. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (37), 9585–9592.
- (146) Mo, T.; Liu, W.-Q.; Ji, W.; Zhao, J.; Chen, T.; Ding, W.; Yu, S.; Zhang, Q. Biosynthetic Insights into Linaridin Natural Products from Genome Mining and Precursor Peptide Mutagenesis. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12* (6), 1484–1488.

- (147) Ortiz-López, F. J.; Carretero-Molina, D.; Sánchez-Hidalgo, M.; Martín, J.; González, I.; Román-Hurtado, F.; Cruz, M.; García-Fernández, S.; Reyes, F.; Deisinger, J. P.; Müller, A.; Schneider, T.; Genilloud, O. Cacaoidin, First Member of the New Lanthidin RiPP Family. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (31), 12654–12658.
- (148) Xu, M.; Zhang, F.; Cheng, Z.; Bashiri, G.; Wang, J.; Hong, J.; Wang, Y.; Xu, L.; Chen, X.; Huang, S.; Lin, S.; Deng, Z.; Tao, M. Functional Genome Mining Reveals a Class V Lanthipeptide Containing a D-Amino Acid Introduced by an F420H2-Dependent Reductase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59* (41), 18029–18035.
- (149) Wiebach, V.; Mainz, A.; Siegert, M.-A. J.; Jungmann, N. A.; Lesquame, G.; Tirat, S.; Dreux-Zigha, A.; Aszodi, J.; Le Beller, D.; Süßmuth, R. D. The Anti-Staphylococcal Lipolanthines Are Ribosomally Synthesized Lipopeptides. *Nat. Chem. Biol.* **2018**, *14* (7), 652–654.
- (150) Wiebach, V.; Mainz, A.; Schnegotzki, R.; Siegert, M.-A. J.; Hügelland, M.; Pliszka, N.; Süßmuth, R. An Amphipathic Alpha-helix Guides Maturation of the Ribosomally-synthesized Lipolanthines. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 10.1002/anie.202003804.
- (151) Velkov, T.; Thompson, P. E.; Nation, R. L.; Li, J. Structure–Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (5), 1898–1916.
- (152) Acedo, J. Z.; Chiorean, S.; Vederas, J. C.; van Belkum, M. J. The Expanding Structural Variety among Bacteriocins from Gram-Positive Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2018**, *42* (6), 805–828.
- (153) Chatterjee, C.; Paul, M.; Xie, L.; van der Donk, W. A. Biosynthesis and Mode of Action of Lantibiotics. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (2), 633–684.
- (154) Gharsallaoui, A.; Oulahal, N.; Joly, C.; Degraeve, P. Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2016**, *56* (8), 1262–1274.
- (155) van der Meer, J. R.; Rollema, H. S.; Siezen, R. J.; Beerthuyzen, M. M.; Kuipers, O. P.; de Vos, W. M. Influence of Amino Acid Substitutions in the Nisin Leader Peptide on Biosynthesis and Secretion of Nisin by *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (5), 3555–3562.
- (156) Ortega, M. A.; Hao, Y.; Zhang, Q.; Walker, M. C.; van der Donk, W. A.; Nair, S. K. Structure and Mechanism of the tRNA-Dependent Lantibiotic Dehydratase NisB. *Nature* **2015**, *517* (7535), 509–512.
- (157) Ortega, M. A.; Hao, Y.; Walker, M. C.; Donadio, S.; Sosio, M.; Nair, S. K.; van der Donk, W. A. Structure and tRNA Specificity of MibB, a Lantibiotic Dehydratase from Actinobacteria Involved in NAI-107 Biosynthesis. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23* (3), 370–380.
- (158) Repka, L. M.; Chekan, J. R.; Nair, S. K.; van der Donk, W. A. Mechanistic Understanding of Lanthipeptide Biosynthetic Enzymes. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (8), 5457–5520.
- (159) Lubelski, J.; Khusainov, R.; Kuipers, O. P. Directionality and Coordination of Dehydration and Ring Formation during Biosynthesis of the Lantibiotic Nisin. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284* (38), 25962–25972.
- (160) van der Meer, J. R.; Polman, J.; Beerthuyzen, M. M.; Siezen, R. J.; Kuipers, O. P.; De Vos, W. M. 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.* **1993**, *175* (9), 2578–2588.
- (161) Siezen, R. J.; Rollema, H. S.; Kuipers, O. P.; de Vos, W. M. Homology Modelling of the *Lactococcus lactis* Leader Peptidase NisP and Its Interaction with the Precursor of the Lantibiotic Nisin. *Protein Eng.* **1995**, *8* (2), 117–125.
- (162) Ortega, M. A.; Velásquez, J. E.; Garg, N.; Zhang, Q.; Joyce, R. E.; Nair, S. K.; van der Donk, W. A. Substrate Specificity of the Lanthipeptide Peptidase ElxP and the Oxidoreductase ElxO. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (8), 1718–1725.
- (163) Velásquez, J. E.; Zhang, X.; van der Donk, W. A. Biosynthesis of the Antimicrobial Peptide Epilancin 15X and Its N-Terminal Lactate. *Chem. Biol.* **2011**, *18* (7), 857–867.
- (164) Heidrich, C.; Pag, U.; Josten, M.; Metzger, J. R.; Jack, R. W.; Bierbaum, G.; Jung, G. N.; Sahl, H.-G. Isolation, Characterization, and Heterologous Expression of the Novel Lantibiotic

- Epicidin 280 and Analysis of Its Biosynthetic Gene Cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64* (9), 3140–3146.
- (165) Foulston, L. C.; Bibb, M. J. Microbisporicin Gene Cluster Reveals Unusual Features of Lantibiotic Biosynthesis in Actinomycetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107* (30), 13461–13466.
- (166) Blaesse, M.; Kupke, T.; Huber, R.; Steinbacher, S. Crystal Structure of the Peptidyl-Cysteine Decarboxylase EpiD Complexed with a Pentapeptide Substrate. *EMBO J.* **2000**, *19* (23), 6299–6310.
- (167) Ortega, M. A.; Cogan, D. P.; Mukherjee, S.; Garg, N.; Li, B.; Thibodeaux, G. N.; Maffioli, S. I.; Donadio, S.; Sosio, M.; Escano, J.; Smith, L.; Nair, S. K.; van der Donk, W. A. Two Flavoenzymes Catalyze the Post-Translational Generation of 5-Chlorotryptophan and 2-Aminovinyl-Cysteine during NAI-107 Biosynthesis. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12* (2), 548–557.
- (168) Gilmore, M. S.; Segarra, R. A.; Hall, L. R.; Clewell, D. B. Genetic Structure of the *Enterococcus faecalis* Plasmid PADi- Encoded Cytolytic Toxin System and Its Relationship to Lantibiotic Determinants. *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 10.
- (169) Cox, C.; Coburn, P.; Gilmore, M. Enterococcal Cytolysin: A Novel Two Component Peptide System That Serves as a Bacterial Defense Against Eukaryotic and Prokaryotic Cells. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2005**, *6* (1), 77–84.
- (170) Dong, S.-H.; Tang, W.; Lukk, T.; Yu, Y.; Nair, S. K.; van der Donk, W. A. The Enterococcal Cytolysin Synthetase Has an Unanticipated Lipid Kinase Fold. *eLife* **2015**, *4*, e07607.
- (171) Booth, M. C.; Bogie, C. P.; Sahl, H.-G.; Siezen, R. J.; Hatter, K. L.; Gilmore, M. S. Structural Analysis and Proteolytic Activation of *Enterococcus faecalis* Cytolysin, a Novel Lantibiotic. *Mol. Microbiol.* **1996**, *21* (6), 1175–1184.
- (172) Thibodeaux, C. J.; Ha, T.; van der Donk, W. A. A Price To Pay for Relaxed Substrate Specificity: A Comparative Kinetic Analysis of the Class II Lanthipeptide Synthetases ProcM and HalM2. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (50), 17513–17529.
- (173) Chatterjee, C.; Miller, L. M.; Leung, Y. L.; Xie, L.; Yi, M.; Kelleher, N. L.; van der Donk, W. A. Lacticin 481 Synthetase Phosphorylates Its Substrate during Lantibiotic Production. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (44), 15332–15333.
- (174) Holo, H.; Jeknic, Z.; Stevanovic, S.; Daeschel, M.; Nes, I. F. Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* Belongs to a New Family of Two-Peptide Lantibiotics. *Microbiology* **2001**, *147* (3), 643–651.
- (175) Cooper, L. E.; McClarren, A. L.; Chary, A.; van der Donk, W. A. Structure-Activity Relationship Studies of the Two-Component Lantibiotic Haloduracin. *Chem. Biol.* **2008**, *15* (10), 1035–1045.
- (176) Caetano, T.; Krawczyk, J. M.; Mösker, E.; Süßmuth, R. D.; Mendo, S. Heterologous Expression, Biosynthesis, and Mutagenesis of Type II Lantibiotics from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*. *Chem. Biol.* **2011**, *18* (1), 90–100.
- (177) Furgerson Ihnken, L. A.; Chatterjee, C.; van der Donk, W. A. In Vitro Reconstitution and Substrate Specificity of a Lantibiotic Protease. *Biochemistry* **2008**, *47* (28), 7352–7363.
- (178) Nishie, M.; Shioya, K.; Nagao, J.; Jikuya, H.; Sonomoto, K. ATP-Dependent Leader Peptide Cleavage by NukT, a Bifunctional ABC Transporter, during Lantibiotic Biosynthesis. *J. Biosci. Bioeng.* **2009**, *108* (6), 460–464.
- (179) Lee, M. V.; Ihnken, L. A. F.; You, Y. O.; McClarren, A. L.; Donk, W. A. van der; Kelleher, N. L. Distributive and Directional Behavior of Lantibiotic Synthetases Revealed by High-Resolution Tandem Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (34), 12258–12264.
- (180) Lohans, C. T.; Li, J. L.; Vederas, J. C. Structure and Biosynthesis of Carnolysin, a Homologue of Enterococcal Cytolysin with D -Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (38), 13150–13153.
- (181) Lu, J.; Li, Y.; Bai, Z.; Lv, H.; Wang, H. Enzymatic Macrocyclization of Ribosomally Synthesized and Posttranslational Modified Peptides via C–S and C–C Bond Formation. *Nat. Prod. Rep.* **2021**, *38* (5), 981–992.

- (182) An, L.; Cogan, D. P.; Navo, C. D.; Jiménez-Osés, G.; Nair, S. K.; van der Donk, W. A. Substrate-Assisted Enzymatic Formation of Lysinoalanine in Duramycin. *Nat Chem Biol* **2018**, *14* (10), 928–933. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0122-4>.
- (183) O'Rourke, S.; Widdick, D.; Bibb, M. A Novel Mechanism of Immunity Controls the Onset of Cinnamycin Biosynthesis in *Streptomyces cinnamoneus* DSM 40646. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2017**, *44* (4–5), 563–572.
- (184) Widdick, D. A.; Dodd, H. M.; Barraille, P.; White, J.; Stein, T. H.; Chater, K. F.; Gasson, M. J.; Bibb, M. J. Cloning and Engineering of the Cinnamycin Biosynthetic Gene Cluster from *Streptomyces cinnamoneus* DSM 40005. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100* (7), 4316–4321.
- (185) Boakes, S.; Cortés, J.; Appleyard, A. N.; Rudd, B. A. M.; Dawson, M. J. Organization of the Genes Encoding the Biosynthesis of Actagardine and Engineering of a Variant Generation System. *Mol. Microbiol.* **2009**, *72* (5), 1126–1136.
- (186) Shi, Y.; Bueno, A.; van der Donk, W. A. Heterologous Production of the Lantibiotic Ala(0)Actagardine in *Escherichia coli*. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (89), 10966–10968.
- (187) Guijarro, J.; Santamaria, R.; Schauer, A.; Losick, R. Promoter Determining the Timing and Spatial Localization of Transcription of a Cloned *Streptomyces coelicolor* Gene Encoding a Spore-Associated Polypeptide. *J. Bacteriol.* **1988**, *170* (4), 1895–1901.
- (188) Willey, J.; Santamaria, R.; Guijarro, J.; Geistlich, M.; Losick, R. Extracellular Complementation of a Developmental Mutation Implicates a Small Sporulation Protein in Aerial Mycelium Formation by *S. coelicolor*. *Cell* **1991**, *65* (4), 641–650.
- (189) Capstick, D. S.; Willey, J. M.; Buttner, M. J.; Elliot, M. A. SapB and the Chaplins: Connections between Morphogenetic Proteins in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **2007**, *64* (3), 602–613.
- (190) Ueda, K.; Oinuma, K.-I.; Ikeda, G.; Hosono, K.; Ohnishi, Y.; Horinouchi, S.; Beppu, T. AmfS, an Extracellular Peptidic Morphogen in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **2002**, *184* (5), 1488–1492.
- (191) Kodani, S.; Lodato, M. A.; Durrant, M. C.; Picart, F.; Willey, J. M. SapT, a Lanthionine-Containing Peptide Involved in Aerial Hyphae Formation in the Streptomycetes: Streptomycete Lanthionine-Containing Peptide. *Mol. Microbiol.* **2005**, *58* (5), 1368–1380.
- (192) Müller, W. M.; Schmiederer, T.; Ensle, P.; Süßmuth, R. D. 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.* **2010**, *49* (13), 2436–2440.
- (193) Müller, W. M.; Ensle, P.; Krawczyk, B.; Süßmuth, R. D. Leader Peptide-Directed Processing of Labyrinthopeptin A2 Precursor Peptide by the Modifying Enzyme LabKC. *Biochemistry* **2011**, *50* (39), 8362–8373.
- (194) Krawczyk, B.; Ensle, P.; Müller, W. M.; Süßmuth, R. D. Deuterium Labeled Peptides Give Insights into the Directionality of Class III Lantibiotic Synthetase LabKC. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (24), 9922–9925.
- (195) Jungmann, N. A.; Krawczyk, B.; Tietzmann, M.; Ensle, P.; Süßmuth, R. D. Dissecting Reactions of Nonlinear Precursor Peptide Processing of the Class III Lanthipeptide Curvopeptin. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (43), 15222–15228. <https://doi.org/10.1021/ja5062054>.
- (196) Wang, H.; van der Donk, W. A. Biosynthesis of the Class III Lantipeptide Catenulepeptin. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7* (9), 1529–1535.
- (197) Völler, G. H.; Krawczyk, J. M.; Pesic, A.; Krawczyk, B.; Nachtigall, J.; Süßmuth, R. D. Characterization of New Class III Lantibiotics-Erythraepeptin, Avermipeptin and Griseopeptin from *Saccharopolyspora erythraea*, *Streptomyces avermitilis* and *Streptomyces griseus* Demonstrates Stepwise N-Terminal Leader Processing. *ChemBioChem* **2012**, *13* (8), 1174–1183.
- (198) Krawczyk, B.; Völler, G. H.; Völler, J.; Ensle, P.; Süßmuth, R. D. Curvopeptin: A New Lanthionine-Containing Class III Lantibiotic and Its Co-Substrate Promiscuous Synthetase. *ChemBioChem* **2012**, *13* (14), 2065–2071.

- (199) Völler, G. H.; Krawczyk, B.; Ensle, P.; Süßmuth, R. D. Involvement and Unusual Substrate Specificity of a Prolyl Oligopeptidase in Class III Lanthipeptide Maturation. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (20), 7426–7429.
- (200) Mohimani, H.; Kersten, R. D.; Liu, W.-T.; Wang, M.; Purvine, S. O.; Wu, S.; Brewer, H. M.; Pasa-Tolic, L.; Bandeira, N.; Moore, B. S.; Pevzner, P. A.; Dorrestein, P. C. Automated Genome Mining of Ribosomal Peptide Natural Products. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (7), 1545–1551.
- (201) Nguyen, K. T.; Willey, J. M.; Nguyen, L. D.; Nguyen, L. T.; Viollier, P. H.; Thompson, C. J. A Central Regulator of Morphological Differentiation in the Multicellular Bacterium *Streptomyces coelicolor*: A Central Regulator of *S. coelicolor* Differentiation. *Mol. Microbiol.* **2002**, *46* (5), 1223–1238.
- (202) McClarren, A. L.; Cooper, L. E.; Quan, C.; Thomas, P. M.; Kelleher, N. L.; van der Donk, W. A. Discovery and in Vitro Biosynthesis of Haloduracin, a Two-Component Lantibiotic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103* (46), 17243–17248.
- (203) Liu, G.; Zhong, J.; Ni, J.; Chen, M.; Xiao, H.; Huan, L. Characteristics of the Bovicin HJ50 Gene Cluster in *Streptococcus bovis* HJ50. *Microbiology* **2009**, *155* (2), 584–593.
- (204) Young, T. A.; Delagoutte, B.; Endrizzi, J. A.; Falick, A. M.; Alber, T. Structure of *Mycobacterium tuberculosis* PknB Supports a Universal Activation Mechanism for Ser/Thr Protein Kinases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2003**, *10* (3), 168–174.
- (205) Ortiz-Lombardía, M.; Pompeo, F.; Boitel, B.; Alzari, P. M. Crystal Structure of the Catalytic Domain of the PknB Serine/Threonine Kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (15), 13094–13100.
- (206) Chen, L.; Wang, H.; Zhang, J.; Gu, L.; Huang, N.; Zhou, J.-M.; Chai, J. Structural Basis for the Catalytic Mechanism of Phosphothreonine Lyase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15* (1), 101–102.
- (207) Chen, S.; Xu, B.; Chen, E.; Wang, J.; Lu, J.; Donadio, S.; Ge, H.; Wang, H. Zn-Dependent Bifunctional Proteases Are Responsible for Leader Peptide Processing of Class III Lanthipeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116* (7), 2533–2538.
- (208) Iftime, D.; Jasyk, M.; Kulik, A.; Imhoff, J. F.; Stegmann, E.; Wohlleben, W.; Süßmuth, R. D.; Weber, T. Streptocollin, a Type IV Lanthipeptide Produced by *Streptomyces collinus* Tü 365. *ChemBioChem* **2015**, *16* (18), 2615–2623.
- (209) Zhang, Q.; Doroghazi, J. R.; Zhao, X.; Walker, M. C.; van der Donk, W. A. Expanded Natural Product Diversity Revealed by Analysis of Lanthipeptide-Like Gene Clusters in Actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81* (13), 4339–4350.
- (210) de Jong, A.; van Heel, A. J.; Kok, J.; Kuipers, O. P. BAGEL2: Mining for Bacteriocins in Genomic Data. *Nucl. Acids Res.* **2010**, *38*, W647–651.
- (211) Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215* (3), 403–410.
- (212) Chertkov, O.; Sikorski, J.; Nolan, M.; Lapidus, A.; Lucas, S.; Liolios, K.; Ivanova, N.; Mavromatis, K.; Mikhailova, N.; Ovchinnikova, G.; Pati, A.; Chen, A.; Palaniappan, K.; Ngatchou, O. D.; Land, M.; Hauser, L.; Chang, Y.-J.; Jeffries, C. D.; Han, C.; Detter, J. C.; Rohde, M.; Göker, M.; Woyke, T.; Bristow, J.; Eisen, J. A.; Markowitz, V.; Hugenholtz, P.; Kyrpides, N. C. *Thermomonospora curvata* Type Strain (B9T). *Stand. Genomic Sci.* **2011**, *4*, 13–22.
- (213) Zimmermann, N.; Freund, S.; Fredenhagen, A.; Jung, G. Solution Structures of the Lantibiotics Duramycin B and C. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *216* (2), 419–428.
- (214) Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G. Clustal W and Clustal X Version 2.0. *Bioinformatics* **2007**, *23* (21), 2947–2948.
- (215) Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Soding, J.; Thompson, J. D.; Higgins, D. G. Fast, Scalable Generation of High-Quality Protein Multiple Sequence Alignments Using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **2014**, *7* (1), 539–539.

- (216) Robert, X.; Gouet, P. Deciphering Key Features in Protein Structures with the New ENDscript Server. *Nucl. Acids Res.* **2014**, *42* (W1), W320–W324.
- (217) Kibbe, W. A. OligoCalc: An Online Oligonucleotide Properties Calculator. *Nucl. Acids Res.* **2007**, *35*, W43–W46.
- (218) Vaudel, M.; Burkhart, J. M.; Zahedi, R. P.; Oveland, E.; Berven, F. S.; Sickmann, A.; Martens, L.; Barsnes, H. PeptideShaker Enables Reanalysis of MS-Derived Proteomics Data Sets. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33* (1), 22–24.
- (219) Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M. R.; Appel, R. D.; Bairoch, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook*; Walker, J. M., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2005; pp 571–607.
- (220) Hanahan, D. Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol.* **1983**, *166* (4), 557–580.
- (221) Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227* (5259), 680–685.
- (222) Shevchenko, A.; Tomas, H.; Havli, J.; Olsen, J. V.; Mann, M. In-Gel Digestion for Mass Spectrometric Characterization of Proteins and Proteomes. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (6), 2856–2860.
- (223) Winther, J. R.; Thorpe, C. Quantification of Thiols and Disulfides. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840* (2), 838–846.
- (224) Birnboim, H. C.; Doly, J. A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **1979**, *7* (6), 1513–1523.
- (225) Edelheit, O.; Hanukoglu, A.; Hanukoglu, I. Simple and Efficient Site-Directed Mutagenesis Using Two Single-Primer Reactions in Parallel to Generate Mutants for Protein Structure-Function Studies. *BMC Biotechnol.* **2009**, *9* (1), 61.
- (226) Rong, M.; He, B.; McAllister, W. T.; Durbin, R. K. Promoter Specificity Determinants of T7 RNA Polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95* (2), 515–519.
- (227) Rath, A.; Glibowicka, M.; Nadeau, V. G.; Chen, G.; Deber, C. M. Detergent Binding Explains Anomalous SDS-PAGE Migration of Membrane Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106* (6), 1760–1765.
- (228) Cooper, S. J.; Leonard, G. A.; McSweeney, S. M.; Thompson, A. W.; Naismith, J. H.; Qamar, S.; Plater, A.; Berry, A.; Hunter, W. N. The Crystal Structure of a Class II Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase Shows a Novel Binuclear Metal-Binding Active Site Embedded in a Familiar Fold. *Structure* **1996**, *4* (11), 1303–1315.
- (229) Calloni, G.; Chen, T.; Schermann, S. M.; Chang, H.; Genevoux, P.; Agostini, F.; Tartaglia, G. G.; Hayer-Hartl, M.; Hartl, F. U. DnaK Functions as a Central Hub in the *E. coli* Chaperone Network. *Cell Reports* **2012**, *1* (3), 251–264.
- (230) Schweder, T.; Lin, H. Y.; Jürgen, B.; Breitenstein, A.; Riemschneider, S.; Khalameyzer, V.; Gupta, A.; Büttner, K.; Neubauer, P. Role of the General Stress Response during Strong Overexpression of a Heterologous Gene in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *58* (3), 330–337.
- (231) Greenfield, N. J. Using Circular Dichroism Collected as a Function of Temperature to Determine the Thermodynamics of Protein Unfolding and Binding Interactions. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (6), 2527–2535.
- (232) Dupeux, F.; Röwer, M.; Seroul, G.; Blot, D.; Márquez, J. A. A Thermal Stability Assay Can Help to Estimate the Crystallization Likelihood of Biological Samples. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *67* (11), 915–919.
- (233) Rhodes, G. An Overview of Protein Crystallography. In *Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models*; Academic Press, 2000; pp 5–28.
- (234) Islam, S. A.; Carvin, D.; Sternberg, M. J. E.; Blundell, T. L. HAD, a Data Bank of Heavy-Atom Binding Sites in Protein Crystals: A Resource for Use in Multiple Isomorphous Replacement and Anomalous Scattering. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1998**, *54* (6), 1199–1206.

- (235) Hendrickson, W. A.; Horton, J. R.; LeMaster, D. M. Selenomethionyl Proteins Produced for Analysis by Multiwavelength Anomalous Diffraction (MAD): A Vehicle for Direct Determination of Three-Dimensional Structure. *EMBO J.* **1990**, *9* (5), 1665–1672.
- (236) Pieper, M.; Betz, M.; Budisa, N.; Gomis-Riith, F.-X.; Bode, W.; Tschesche, H. Expression, Purification, Characterization, and X-Ray Analysis of Selenomethionine 215 Variant of Leukocyte Collagenase. *J. Protein Chem.* **1997**, *16* (6), 637–350.
- (237) Koehnke, J.; Mann, G.; Bent, A. F.; Ludewig, H.; Shirran, S.; Botting, C.; Lebl, T.; Houssen, W. E.; Jaspars, M.; Naismith, J. H. Structural Analysis of Leader Peptide Binding Enables Leader-Free Cyanobactin Processing. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11* (8), 558–563.
- (238) Zhu, Y.; Li, H.; Long, C.; Hu, L.; Xu, H.; Liu, L.; Chen, S.; Wang, D.-C.; Shao, F. Structural Insights into the Enzymatic Mechanism of the Pathogenic MAPK Phosphothreonine Lyase. *Mol. Cell* **2007**, *28* (5), 899–913.
- (239) Eswaran, J.; Lee, W. H.; Debreczeni, J. É.; Filippakopoulos, P.; Turnbull, A.; Fedorov, O.; Deacon, S. W.; Peterson, J. R.; Knapp, S. Crystal Structures of the P21-Activated Kinases PAK4, PAK5, and PAK6 Reveal Catalytic Domain Plasticity of Active Group II PAKs. *Structure* **2007**, *15* (2), 201–213.
- (240) Huse, M.; Kuriyan, J. The Conformational Plasticity of Protein Kinases. *Cell* **2002**, *109* (3), 275–282.
- (241) Michels, T.; Dölling, R.; Haberkorn, U.; Mier, W. Acid-Mediated Prevention of Aspartimide Formation in Solid Phase Peptide Synthesis. *Org. Lett.* **2012**, *14* (20), 5218–5221.
- (242) Mergler, M.; Dick, F.; Sax, B.; Weiler, P.; Vorherr, T. The Aspartimide Problem in Fmoc-Based SPPS. Part I. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9* (1), 36–46.
- (243) Mergler, M.; Dick, F.; Sax, B.; Stähelin, C.; Vorherr, T. The Aspartimide Problem in Fmoc-Based SPPS. Part II. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9* (8), 518–526.
- (244) Mergler, M.; Dick, F. The Aspartimide Problem in Fmoc-Based FPPS. Part III. *J. Pept. Sci.* **2005**, *11* (10), 650–657.
- (245) LaVallie, E. R.; McCoy, J. M. Gene Fusion Expression Systems in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1995**, *6* (5), 501–506.
- (246) Rudolph, R.; Lilie, H. In Vitro Folding of Inclusion Body Proteins. *FASEB J.* **1996**, *10* (1), 49–56.
- (247) Krawczyk, J. M.; Völler, G. H.; Krawczyk, B.; Kretz, J.; Brönstrup, M.; Süßmuth, R. D. Heterologous Expression and Engineering Studies of Labyrinthopeptins, Class III Lantibiotics from *Actinomadura namibiensis*. *Chem. Biol.* **2013**, *20* (1), 111–122.