

Charakterisierung
der Labyrinthopeptin-Synthetase LabKC in vitro

vorgelegt von
Diplom-Biologe
Wolfgang Müller
aus Riedenburg

Von der Fakultät II – Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzende:	Prof. Dr. rer. nat. Marga C. Lensen
Erster Bericht/Gutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Roderich D. Süßmuth
Zweite Berichterin/Gutachterin:	Prof. Dr. rer. nat. Elke Dittmann

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 29.07.2011

Berlin 2011

D 83

Zusammenfassung:

Charakterisierung der Labyrinthopeptin-Synthetase LabKC in vitro

Der erstmals 1988 beschriebene Actinomyceten-Stamm *Actinomadura namibiensis* produziert in seinem Kulturüberstand die drei Sekundärmetabolite LabA1, A2 und A3. Dabei handelt es sich um ribosomal synthetisierte Peptide, welche aufgrund ihrer posttranslational eingeführten Lanthionin-Verbrückungen in die Gruppe der Lantibiotika eingeordnet wurden. Die Aufklärung der Röntgenkristallstruktur von Labyrinthopeptin A2 erbrachte weitere detaillierte Einblicke in die bis dato noch relativ unbekannte Klasse III Lantibiotika. Eine zentrale Erkenntnis war vor allem die Entdeckung eines neuartigen Labionin-Motives. Mit der Identifizierung des Genclusters der Labyrinthopeptine wurde zudem der Grundstein für die weitere Untersuchung der Biosynthese gelegt. Neben den Sequenzen für die Vorläuferpeptide von LabA1 und LabA2 codieren weiterhin zwei Gene für den Export der Peptide, sowie ein Gen für ein Enzym LabKC, welches für die Einführung der Labionin-Verbrückungen verantwortlich ist. Durch Vergleich mit anderen bekannten Enzymen konnten in der Sequenz von LabKC eine N-terminale Lyase- und eine zentrale Ser/Thr-Kinase-Domäne sowie eine C-terminale Domäne mit Ähnlichkeit zu Lantibiotika-Zyklasen identifiziert werden. Der vorgeschlagene Mechanismus für die Labionin-Bildung sieht zunächst die Phosphorylierung von zwei Serin-Resten im LabA2 Präpropeptid vor, gefolgt von der anschließenden Zyklisierung über ein C-terminales Cystein durch eine doppelte Michael-Addition. Ausgehend von diesen Vorkenntnissen war das Hauptziel der vorliegenden Arbeit zunächst die Etablierung eines in vitro Enzym-Assays für die Untersuchung der Labyrinthopeptin-Biosynthese. Damit sollte eine detaillierte Charakterisierung der Funktionsweise des LabA2-prozessierenden Enzyms LabKC ermöglicht werden. Hierzu wurde dieses zunächst erfolgreich kloniert, in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Die Bereitstellung geeigneter Peptidsubstrate für die enzymatische Umsetzung erfolgte mittels chemischer Peptidsynthese an fester Phase. Nach Optimierung der Assay-Bedingungen sowie unter Verwendung des Nukleotids GTP als Co-Substrat für die Phosphorylierungsreaktion konnte schließlich die komplette Dehydratisierung und Zyklisierung eines synthetischen LabA2-Präpropeptids erreicht werden. Für die Analytik der enzymatischen Umsetzungen wurden massenspektrometrische Methoden angewandt. Nach der Optimierung und Charakterisierung wichtiger Parameter für die in vitro Umsetzung mit LabKC stand die Untersuchung des katalytischen Mechanismus im Mittelpunkt der weiteren Arbeiten. Unter Anwendung von Mutagenese-Methoden konnten katalytisch wichtige Aminosäureseitenketten in der Lyase- und Ser/Thr-Kinase Domäne von LabKC identifiziert und ein entsprechender Mechanismus postuliert werden. Der Reaktionsablauf der Labyrinthopeptin-Biosynthese wurde zudem durch Umsetzungen synthetischer Labyrinthopeptin-Derivate mit LabKC untersucht. Ein weiteres Ziel war die detaillierte Untersuchung der Rolle des Leaderpeptids für die Biosynthese der Labyrinthopeptine. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch Testierung zahlreicher LabA2-Leaderpeptid-Varianten die absolute Notwendigkeit dieser Aminosäuresequenz für die erfolgreiche Prozessierung durch LabKC gezeigt werden. Weiterhin wurde ein Erkennungsmotiv identifiziert und charakterisiert. Im Fokus zukünftiger Arbeiten steht die Aufklärung des Mechanismus für die Labionin-Zyklisierung sowie die Strukturaufklärung von LabKC oder homologen Enzymen mittels Röntgenkristallographie.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen:

„Leader Peptide-Directed Processing of Labyrinthopeptin A2 Precursor Peptide by the Modifying Enzyme LabKC”

W. M Müller, P. Ensle, B. Krawczyk, R.D. Süssmuth, *Biochemistry* **2011**, 39, 8362 – 8373.

„In vitro biosynthesis of the prepeptide of type-III lantibiotic Labyrinthopeptin A2 including formation of a C-C bond as a post-translational modification”

W. M. Müller, T. Schmiederer, P. Ensle, R. D. Süssmuth, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 2436 – 2440 und *Angew. Chem.* **2010**, 122, 2486 – 2490.

Poster:

1. *„Studies on the structure and the biosynthesis of Labyrinthopeptin, a new Lantibiotic-type, isolated from Actinomadura sp.”*

W. Müller, J. Krawczyk, J. Nachtigall, T. Schmiederer, K. Meindl, K. Schneider, A. Reicke, D. Butz, S. Keller, G. Nicholson, H. Gühring, L. Vértesy, J. Wink, H. Hoffmann, M. Brönstrup, G.M. Sheldrick, R. D. Süssmuth; 9. *Deutsches Peptidsymposium*, Göttingen 11.03. - 14.03. **2009**.

2. *„Labyrinthopeptins: a new class of carbacyclic lantibiotics”*

T. Schmiederer, W. Müller, K. Meindl, K. Schneider, A. Reicke, D. Butz, S. Keller, H. Gühring, L. Vértesy, J. Wink, H. Hoffmann, M. Brönstrup, G. M. Sheldrick, R. D. Süssmuth; *Annual Meeting on Frontiers in Medicinal Chemistry*, Münster 14.03. - 17.03. **2010**.

3. *„Studies on the Biosynthesis of Class III Lantibiotics”*

P. Ensle, B. Krawczyk, A. Pesic, W. Müller, R. D. Süssmuth; 10. *Deutsches Peptidsymposium*, Berlin 07.03. - 10.03. **2011**.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. Roderich Süßmuth

in der Zeit von November 2007 bis Januar 2011 am Institut für Chemie der Fakultät II der Technischen Universität Berlin angefertigt.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Roderich D. Süßmuth für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und die Überlassung des äußerst spannenden und anspruchsvollen Dissertationsthemas. Weiterhin danke ich ihm für die optimalen Voraussetzungen in seinem Arbeitskreis zur Erlernung neuer und vielseitiger Analysenmethoden. Für das stets freundschaftliche Verhältnis, das entgegengebrachte Vertrauen, die alltägliche Betreuung und Ermutigung, sowie für die investierte Zeit zur Durchsicht dieser Arbeit bin ihm weiterhin sehr dankbar.

Frau Prof. Dr. Elke Dittmann und Frau Prof. Dr. Marga Lensen danke ich herzlich für die Übernahme der zweiten Begutachtung bzw. des Prüfungsvorsitzes.

Herrn PD Dr. Ulrich Keller möchte ich herzlich für die Diskussionen und wertvollen Ratschläge danken.

Herrn Dr. Timo Schmiederer danke ich für die Einarbeitung in das Projektthema und in die Eigenheiten des Oetkerbaus, sowie für die zahlreichen hilfreichen Tipps während der ersten Monate in Berlin.

Besonderer Dank gilt Herrn Dipl.-Chem. Paul Ensle für die Synthese der „hundert“ Peptidvarianten, Herrn Dipl.-Chem. Alexander Pesic für die Durchführung der GC-MS Analytik sowie Herrn M. Sc. Bartłomiej (Bartek) Krawczyk für die Übernahme des Projektes und Durchführung weiterer Enzym-Assays.

Für die erfolgreiche Zusammenarbeit im Labyrinthopeptin-Projekt danke ich meinen Kollegen Frau M. Sc. Joanna Krawczyk, Herrn M. Sc. Bartłomiej (Bartek) Krawczyk, Herrn Dipl.-Chem. Paul Ensle, Herrn Dr. Maik Henkel und Herrn Dr. Georg Sambeth.

Herrn Dipl.-Chem. Jonny Nachtigall, Herrn M. Sc. Soleiman Helaly, Frau M. Sc. Joanna Krawczyk und Frau Dipl.-Biol. Manuela Hügelland danke ich für die freundschaftliche Atmosphäre in unserem klimatisierten Büro.

Herrn Dr. Heiko Schadt, Herrn Dipl.-Chem. Jonny Nachtigall, Herrn Dipl.-Chem. Florian Oldach und Frau Dr. Eva Mösker danke ich für die Hilfestellung bei der Einarbeitung und Handhabung der LC-MS-Geräte.

Frau Dipl.-Biol. Manuela Hügelland, Herrn Dipl.-Chem. Siamak Sensari und Sina danke ich für die erholsamen „Raucher“- und Kaffeepausen vor dem Oetkergebäude.

Herrn M. Sc. Matthias Exner vom Arbeitskreis Budisa sowie den weiteren treuen Kantinenbesucher danke ich für die aufheiternden Themen und Diskussionen während der Mittagspause.

Recht herzlicher Dank gilt auch meinen Praktikanten Benjamin Schumann (Universität Tübingen), David Wagner, Katharina Wittig und Anne Borowski. Sie haben durch ihren Einsatz erheblich zum Gelingen dieses Projektes beigetragen.

Herrn Dr. Stefan Pohle danke ich für die gemeinsame Bewältigung des Berlin-Marathons 2009.

An dieser Stelle möchte ich auch recht herzlich meiner Familie und meinen Freunden „zu Hause“ in Riedenburg danken. Wenn ich auch während dieser drei Jahre in Berlin sehr selten die Zeit fand Euch einen Besuch abzustatten, so waren es immer sehr erholsame, ausgleichende und wertvolle Tage für mich.

Mein besonderer Dank gilt Anne. In schwierigen Projektphasen hast Du mich immer Best möglichst unterstützt und auch das Verständnis für die langen Abende und Wochenenden im Labor entgegengebracht.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung	7
1.1 Ribosomal synthetisierte Peptidantibiotika	7
1.2 Lantibiotika	10
1.2.1 Klassifizierung	10
1.2.2 Lantibiotika-Biosynthese	15
1.2.3 Weitere Modifikationen von Lantibiotika	21
1.2.4 Funktion des Leaderpeptids	22
1.2.5 Biologische Aktivität und Wirkmechanismus von Lantibiotika	23
1.3 Die Labyrinthopeptine	25
2 Zielsetzung	31
3 Materialien	33
3.1 Geräte	33
3.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	35
3.3 Enzyme und Antikörper	38
3.4 Kit-Systeme	39
3.5 Verwendete Vektoren	39
3.6 Verwendete Größenmarker	40
3.7 Puffer und Lösungen	41
3.7.1 Lösungen für Arbeiten mit DNA	41
3.7.2 SDS-PAGE nach Lämmli	41
3.7.3 Gelfärbung mit Coomassie Brilliant Blau	42
3.7.4 Western-Blotting	43
3.7.5 Lösungen für Arbeiten mit Proteinen	44
3.7.6 Lösungen für Arbeiten mit <i>E. coli</i>	46
3.8 Bakterienstämme	46
3.9 Nährmedien und Antibiotika	47
3.10 Oligonukleotid-Primer	49
4 Methoden	51
4.1 Mikrobiologische Methoden	51
4.1.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen	51
4.1.2 Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> -Stämmen	51

4.1.3	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	51
4.1.4	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	52
4.1.5	Entsorgung von Mikroorganismen	52
4.2	Molekularbiologische Methoden	53
4.2.1	Bestimmung der DNA-Konzentration	53
4.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	53
4.2.3	Kolonie-PCR.....	56
4.2.4	Ortsgerichtete Mutagenese PCR	56
4.2.5	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	58
4.2.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	59
4.2.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	59
4.2.8	Spaltung von dsDNA durch Restriktionsendonukleasen	59
4.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten	60
4.2.10	TA-Klonierung und A-Addition	60
4.2.11	DNA-Sequenzierung.....	61
4.3	Proteinbiochemische Methoden.....	62
4.3.1	Proteinexpression im analytischen Maßstab	62
4.3.2	Proteinexpression im präparativen Maßstab	62
4.3.3	Reinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie	63
4.3.4	Dialyse von Proteinlösungen	67
4.3.5	Einkonzentrieren von Proteinlösungen	67
4.3.6	Proteinreinigung mit Größenausschlusschromatographie (SEC)	67
4.3.7	Reinigung von Peptiden mit Größenausschlusschromatographie.....	68
4.3.8	Präparative RP-HPLC-Trennungen	69
4.4	Analytische Methoden	70
4.4.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	70
4.4.2	Färbung der SDS-Gele mit Coomassie Brilliant Blue G250	71
4.4.3	Western-Blotting und Immunodetektion	71
4.4.4	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Absorptionsspektroskopie...	73
4.4.5	Circulardichroismus-Spektroskopie.....	74
4.4.6	N-terminale Sequenzierung.....	76
4.4.7	LabKC Enzym-Assay	77
4.4.8	Proteaseverdau mit Trypsin	77
4.4.9	Probenvorbereitung für LC-MS-Messungen	78
4.4.10	LC-ESI-MS Messungen.....	78
4.4.11	Peptidsequenzierung mittels LC-MS/MS Experimente.....	80
4.4.12	Aminosäureanalytik mittels Gaschromatographie (GC).....	80
5	Ergebnisse und Diskussion.....	83
5.1	Die Labyrinthopeptin-Synthetase LabKC.....	83
5.2	Klonierung, rekombinante Expression und Reinigung von LabKC	85
5.2.1	Klonierung verschiedener Expressionskonstrukte von LabKC	86
5.2.2	Rekombinante Expression und Reinigung von LabKC	87

5.2.3	Präparative Reinigung von LabKC	89
5.3	Etablierung des LabKC <i>in vitro</i> -Assays	92
5.3.1	Bereitstellung des Peptidsubstrats	92
5.3.2	Aktivitätstest mit rekombinantem LabKC _{His6}	93
5.3.3	Umsetzung von LabyrinthopeptinA1	95
5.3.4	Untersuchung der Zyklisierungsreaktion von LabKC	96
5.3.5	Optimierung der <i>in vitro</i> Assaybedingungen	102
5.3.6	Leaderpeptid abhängige Prozessierung von LabKC	107
5.3.7	Untersuchung der Eliminierungsreaktion mit phosphorylierten Peptidsubstraten	121
5.4	Ortsgerichtete Mutagenese zur Aufklärung des enzymatischen Mechanismus	126
5.4.1	Mutagenese im aktiven Zentrum der Ser/Thr-Kinase-Domäne	126
5.4.2	Mutagenese der N-terminalen Lyase-Domäne	130
6	Zusammenfassung und Ausblick	137
7	Anhang:	143
7.1	DNA- und Aminosäuresequenz von LabKC	143
7.2	Strukturvorhersagemodell für LabKC	145
7.3	Reinigung von LabKC	147
7.4	LC-MS-Spektren	149
7.4.1	Versuche zur Untersuchung der Zyklisierungsreaktion	149
7.4.2	Umsetzungen zur Optimierung der Assay-Bedingungen	154
7.4.3	LC-MS-Spektren zur Charakterisierung der Funktionalität des Leaderpeptids	162
7.4.4	LC-MS Spektren zu Phosphopeptiden:	179
7.4.5	Mutagenesestudien	182
8	Literaturverzeichnis	185

Abkürzungsverzeichnis

λ	Wellenlänge
Δ	Änderung
Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
A	Absorption
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ACN	Acetonitril
ACV	L- α -Aminoadipyl-L-Cysteinyl-D-Valin
ad	addiere bis
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASA	Aminosäureanalytik
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
AviCys	S-(Z)-2-Aminovinyl-D-cystein
AviMeCys	S-(Z)-2-Aminovinyl-(3S)-3-methyl-D-cystein
AU	Absorptionseinheit (<i>absorption unit</i>)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
c	Konzentration
CD	Zirkulardichroismus (<i>circular dichroism</i>)
C-terminal	carboxyterminales Ende einer Polypeptidkette
CTP	Cytidintriphosphat
CV	Säulenvolumen (<i>column volume</i>)
d	Schichtdicke der Küvette [cm]

Da	Dalton (1 Da = $1.66 \cdot 10^{-27}$ kg)
DAD	Dioden Array Detektor
DAOC	Deacetoxycephalosporin C
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
Dha	2,3-Didehydroalanin
Dhb	2,3-Didehydrobutyrin
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
dH ₂ O	2-fach deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPI	enhanced product ion scan
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
eV	Elektronenvolt
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FT-ICR-MS	Fourier-Transform-Ionen-Zyklotron-Massenspektrometrie
g	Gramm
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
γ -S-GTP	Guanosin 5'-[γ -thio]triphosphat
h	Stunde (<i>hour</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IMAC	immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie

IPNS	Isopenicillin- <i>N</i> -Synthetase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
Kana	Kanamycin
kDa	Kilodalton
kbp	Kilo-Basenpaare
L	Liter
Lab	Labionin
Lan	Lanthionin
LB	<i>lysogeny broth</i> (Nährmedium für <i>E. coli</i>)
LC	Flüssigkeitschromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
m	Masse
M	molar
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
m/z	Masse zu Ladungs-Verhältnis
MCS	multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
MeLan	Methyllanthionin
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minuten
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MRSA	Methicillin resistente <i>S. aureus</i> Stämme
MS	Massenspektrometer / Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
NBD	<i>nucleotide-binding-domain</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie

MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
μM	mikromolar
μl	Mikroliter
nm	Nanometer
NMR	Kernmagnetische Resonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NRPS	nicht-ribosomale Peptidsynthetase
NTA	Nitrilotriessigsäure (<i>N,N</i> -Bis(carboxymethyl)glycin)
<i>N</i> -terminal	Aminoterminales Ende einer Polypeptidkette
OD	optische Dichte
ORF	<i>open-reading frame</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	Protein-Datenbank
PEG	Polyethylenglykol
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pI	isoelektrischer Punkt
PITC	Phenylisothiocyanat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ppm	Teile pro Million (<i>parts per million</i>)
PTH	Phenylthiohydantoin
RBS	Ribosomen-Bindungsstelle (<i>ribosome-binding site</i>)
RP	Umkehrphase (<i>reversed-phase</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SEC	Größenausschlusschromatographie (<i>size exclusion chromatography</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SPE	Festphasenextraktion (<i>solid phase extraction</i>)
T	Temperatur

TCA	Trichloressigsäure (<i>trichloroacetic acid</i>)
TES	N-Tris-(hydroxymethyl)-2-methyl-aminoethansulfonsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TIC	Totalionenchromatogramm
TTP	Thymidintriphosphat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymeinheit (<i>enzyme unit</i>)
üN	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
Vis	sichtbares Licht
VRE	Vancomycin resistente Enterokokken
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktosid
XIC	nach Masse selektiertes Ionenchromatogramm

1 Einleitung

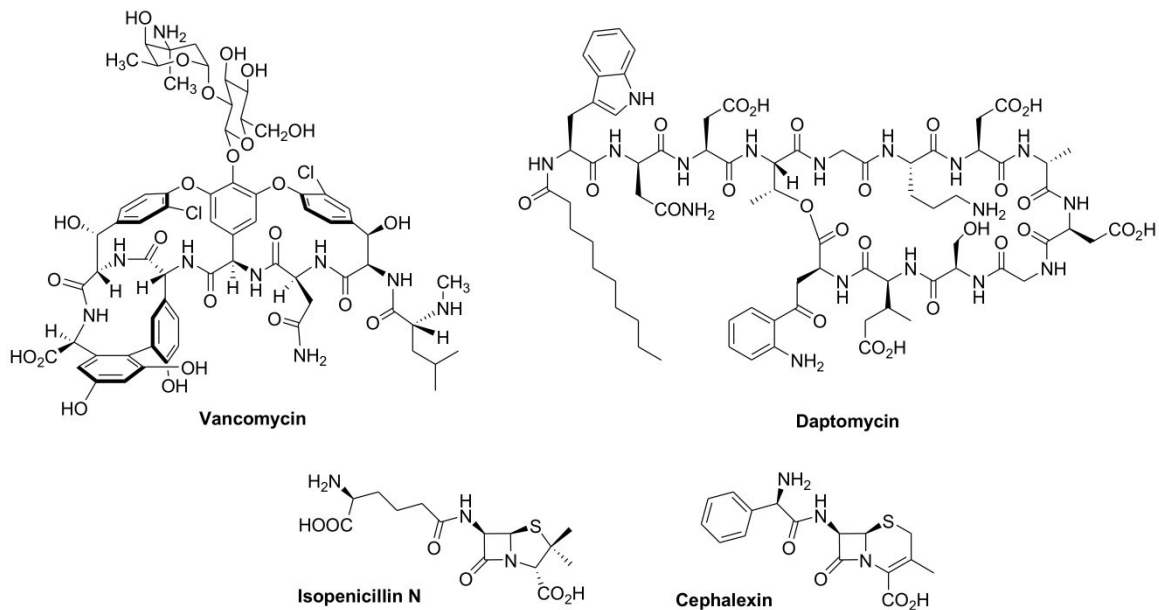
1.1 Ribosomal synthetisierte Peptidantibiotika

Eine Vielzahl an Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen produzieren in ihrem Sekundärmetabolismus verschiedenste Naturstoffe, um sich gegen Fressfeinden zu schützen und sich Standortvorteile gegenüber Mitbewerbern zu sichern. Seit den Ursprüngen der Zivilisation versucht der Mensch sich dieses enorme Potential an Wirkstoffen für eine praktische Anwendung zu Nutze zu machen. Viele Kulturen wussten bereits früh mit Heilkräutern und Pflanzengiften richtig umzugehen und mit Beginn der modernen Naturstoffforschung im 19. und Anfang des 20. Jahrhunderts resultierte dies im gezielten *Screening* nach Wirkstoffen, sowie deren Isolierung und Strukturaufklärung. Neben relativ einfachen Molekülen wie Fettsäuren, Steroiden und Kohlenhydraten zählen auch sehr komplex aufgebaute Verbindungen mit peptidischem Ursprung zu den antibiotischen Naturstoffen.

Im Laufe der Evolution wurden für die Synthese von Peptidantibiotika zwei verschiedene Systeme etabliert, die nicht-ribosomale sowie die ribosomale Peptidsynthese.^[1, 2, 3, 4] Die nicht-Ribosomale Peptidsynthese (NRPS) erfolgt dabei an multimeren Enzymkomplexen, den nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen. Struktur und Länge der hierbei gebildeten Peptide hängen eng mit dem modularen Aufbau der Synthetasekomplexe zusammen. Sowohl proteinogene, als auch eine Vielzahl an nicht proteinogenen Aminosäuren werden nach Aktivierung mit ATP als Aminoacyl-AMP-Bausteine und Übertragung auf die Thioestergruppe eines Phosphopantetheinarms in einem Kondensationsschritt zu einer Peptidkette zusammengefügt. In den häufig sehr komplex zusammengesetzten NRPS-Genclustern finden sich neben den Sequenzen, welche für die einzelnen Module des Synthetasekomplexes codieren, zudem häufig Gene für die weitere Modifizierung der Peptidkette, wie z.B. Monooxygenasen und Glycosyltransferasen.^[5] Prominente Vertreter nicht-ribosomal synthetisierter Peptide sind das Lipopeptidantibiotikum Daptomycin sowie das Glykopeptid Vancomycin, welches seit Anfang der 80er Jahre gegen multiresistente Staphylokokken-Stämme (MRSA) eingesetzt wird (Abbildung 1).^[4, 5]

Auch die β -Lactam-Antibiotika sind nicht-ribosomalen Ursprungs. So werden z.B. die Vorläuferstufen der Penicilline und Cephalosporine an der L- α -Aminoadipyl-L-Cysteinyl-D-Valin (ACV) -Synthetase gebildet. Dabei handelt es sich um den Prototypen der NRPS-Synthetasen, einen 400 kDa großen Enzymkomplex, welcher Adipinsäure, L-Cystein und L-Valin zum ACV-Grundgerüst verknüpft. Über die Isopenicillin-N-Synthetase (IPNS) wird anschließend das bizyklische Ringsystem von Isopenicillin-N gebildet (Abbildung 1). Dieses β -Lactamgrundgerüst kann wiederum durch die DAOC-Synthase zu Deacetoxycephalosporin C umgewandelt werden.^[4]

a) Nicht ribosomal synthetisierte Peptidantibiotika:



b) Ribosomal synthetisierte Peptidantibiotika:

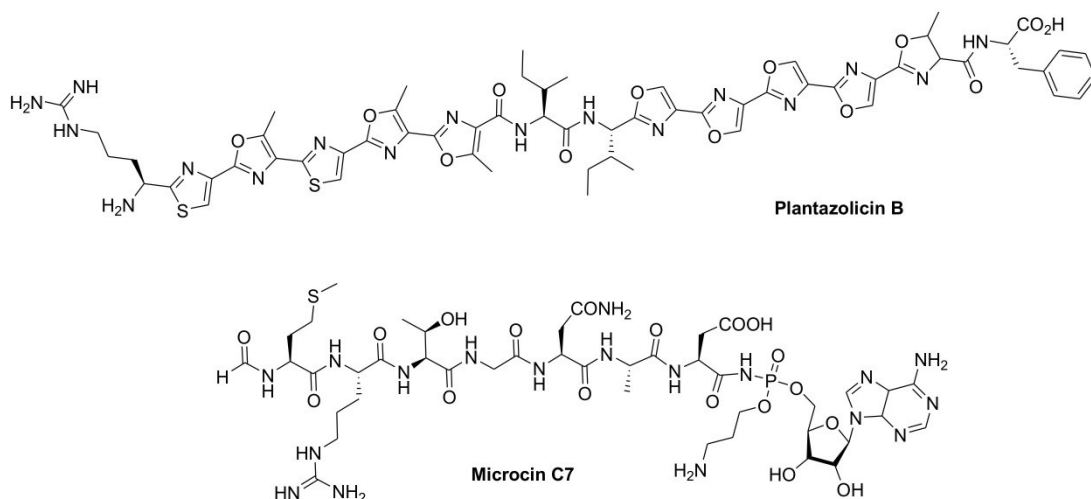


Abbildung 1: Vertreter der a) nicht-ribosomal synthetisierten und b) ribosomal synthetisierten Peptidantibiotika.^[4, 6]

Nicht-ribosomale Peptidantibiotika zeigen nicht nur eine große Diversität hinsichtlich ihrer Struktur, sondern auch bezüglich ihrer Wirkmechanismen und molekularen *Targets*. Diese umfassen u.a. die Zerstörung der Zellmembran, sowie die Inhibition der Zellwandbiosynthese, Proteinbiosynthese, DNA-Replikation und RNA-Transkription.^[4]

Im Gegensatz zu den nicht-ribosomal synthetisierten Peptiden waren Peptidantibiotika ribosomalen Ursprungs bisher nur von geringer Bedeutung in der Humanmedizin und anderen Anwendungen. Eine Gemeinsamkeit aller peptidischen Wirkstoffe ribosomalen Ursprungs ist deren Synthese als inaktive Vorläuferpeptide, meistens in Verbindung mit

einem *N*-terminalen Leaderpeptid. Die lineare Peptidkette wird anschließend in vielfältiger Weise enzymatisch posttranslational modifiziert, wodurch teilweise sehr komplex aufgebaute, hydrolysestabile Strukturen gebildet werden. Aufgrund ihrer Herkunft und Struktur lassen sich die Vertreter der ribosomalen Peptidantibiotika in verschiedene Klassen einteilen, darunter z.B. Defensine, Microcine, Patellamide, Thiopeptide und Microviridine.^[4]

Die Gruppe der Microcine umfasst Peptide unterschiedlicher Struktur, welche von Gram-negativen Enterokokken-Stämmen wie z.B. *E. coli* produziert werden. Das Lassopeptid Microcin J25, sowie das von Enterobactin abgeleitete Microcin MccE492m und Microcin B17 sind repräsentative Vertreter dieser Klasse. Bei letzterem handelt es sich um ein Peptid, welches aromatische Heterozyklen in Form von Thiazolen und Oxazolen im Peptidrückgrat aufweist und als DNA-Gyrase-Inhibitor fungiert.^[4, 7]

Im Zuge von Genomprojekten konnten kürzlich Vertreter der Thiopeptidantibiotika der ribosomalen Synthese zugeordnet werden. Dies war insofern überraschend, da aufgrund ihrer sehr komplex aufgebauten Strukturen eine Synthese mittels NRPS vermutet wurde. Nahezu zeitgleich wurde von vier Arbeitsgruppen unter Einsatz moderner Sequenzieretechniken der ribosomale Ursprung der makrozyklischen Thiopeptide Thiostrepton, Siomycin, Thiomuracin und Thiocillin aufgeklärt.^[8, 9, 10, 11] Neben den Strukturgenen, codierend für die Thiopeptidvorläuferpeptide, konnten in den Genclustern zahlreiche Sequenzen codierend für Enzyme identifiziert werden, welche für die Einführung der vielfältigen posttranslationalen Modifizierungen, darunter die Thiazolbildung, verantwortlich sind. Die Aufklärung der zugrundeliegenden Biosynthesemechanismen steht gegenwärtig noch aus.^[12]

Die Lantibiotika stellen eine weitere eigenständige Gruppe der ribosomalen Peptidantibiotika dar. Sie bilden die Grundlage dieser Arbeit und sollen im Folgenden näher vorgestellt werden.

1.2 Lantibiotika

Bei den Lantibiotika handelt es sich um Peptide von meist 19 bis 38 Aminosäuren Länge, welche ribosomal synthetisiert werden und ihre Ausprägung hinsichtlich Struktur, Aktivität und Stabilität durch diverse posttranslationale Modifikationen erhalten.^[13, 14, 15] Lantibiotika werden zunächst zusammen mit einer *N*-terminalen Leadersequenz als inaktive Präpropeptide synthetisiert und durch enzymatische posttranslationale Modifizierung schließlich zum biologisch aktiven Peptid prozessiert. Die Peptidprozessierung beschränkt sich dabei auf die Region des *C*-terminalen Propeptids welches auch als Strukturpeptid bezeichnet wird, im Gegensatz zum Leaderpeptid, welches nicht modifiziert wird. Alle Vertreter dieser Gruppe haben die ungewöhnlichen Bausteine Lanthionin (Lan) bzw. Methyllanthionin (MeLan) als Struktur motive gemeinsam (Abbildung 2).^[3, 13, 15] Historisch betrachtet geht der Begriff Lanthionin (Lan) auf die bei der Behandlung von Wolle (lat.: lana = Wolle) mit Natriumcarbonat erstmals beobachtete Entstehung dieser Aminosäuren zurück.^[16] Diese charakteristischen Strukturmerkmale führten schließlich auch zur Namensgebung dieser Naturstoffklasse, abgeleitet aus dem englischen Wort *lantibiotics* für *lanthionine-containing antibiotic peptides*.^[13, 14] In den folgenden Abschnitten sollen die Lantibiotika hinsichtlich ihrer Klassifizierung, Struktur, biologischen Aktivität und Biosynthese detaillierter beschrieben werden.

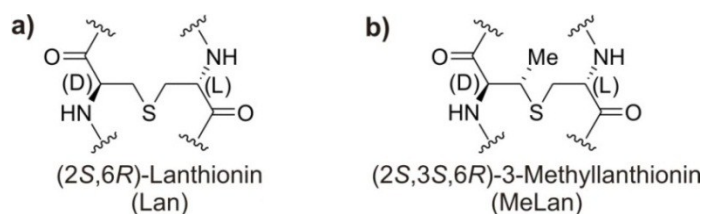
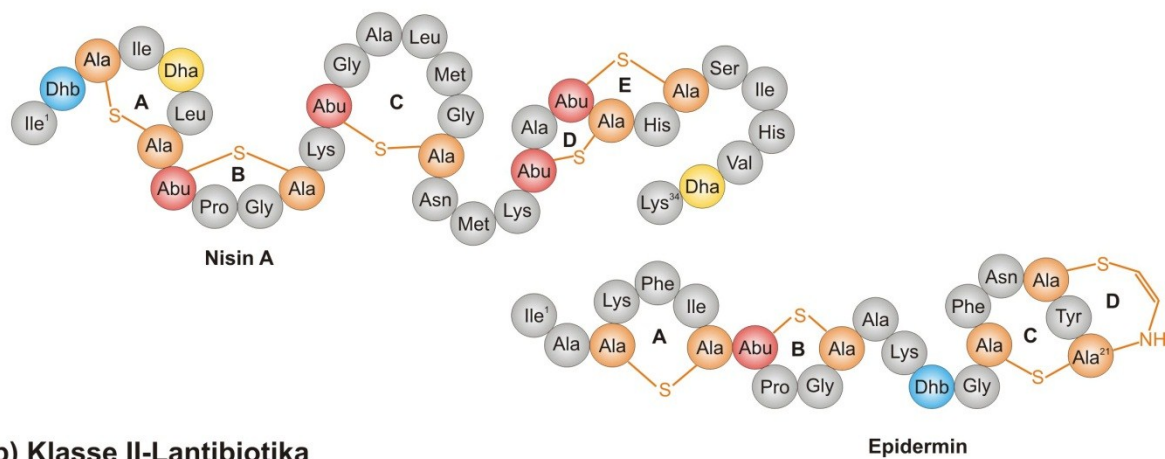


Abbildung 2: Strukturformeln von a) Lanthionin (Lan) und b) Methyllanthionin (MeLan).

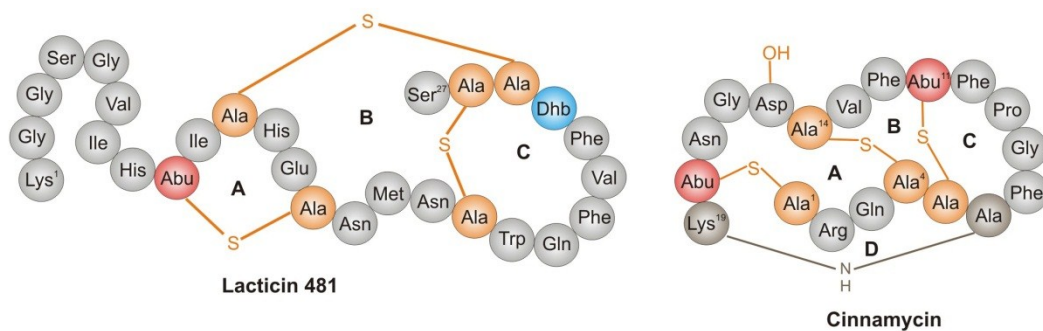
1.2.1 Klassifizierung

Erstmals wurden die Lantibiotika von Prof. Dr. Günther Jung (Universität Tübingen) anhand ihrer Ringstruktur und biologischen Aktivität in Typ A und Typ B Lantibiotika klassifiziert.^[15, 17] In einer alternativen Systematik nach Pag & Sahl erfolgt die Einteilung der Lantibiotika in die Klassen I, II und III anhand genetischer Gemeinsamkeiten sowie der Sequenzhomologie ihrer Leaderpeptide.^[18] Aufgrund der biosynthetischen Betrachtung dieses Themengebietes wird in der vorliegenden Arbeit auf letztere Systematik zurückgegriffen. Die Strukturen verschiedener Vertreter aller drei Klassen sind in Abbildung 3 als Kugelmodelle vereinfacht dargestellt.

a) Klasse I-Lantibiotika



b) Klasse II-Lantibiotika



c) Klasse III-Lantibiotika

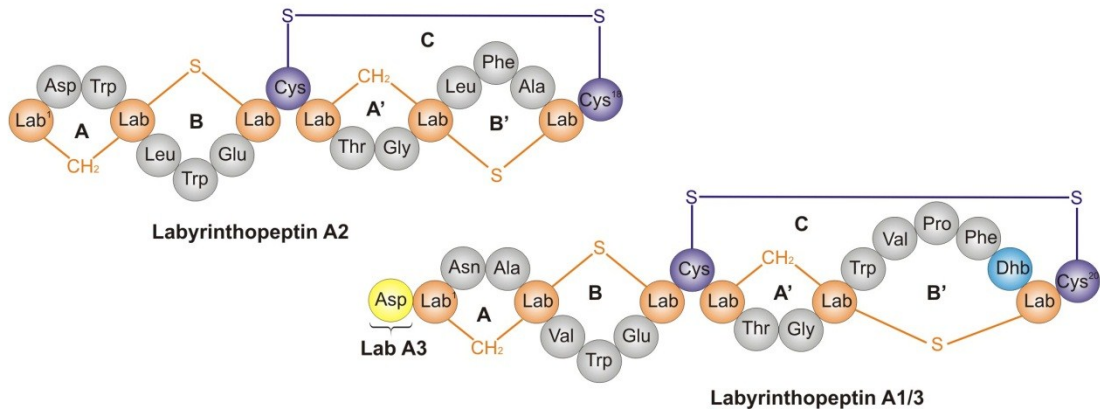


Abbildung 3: Kugelmodelle von Vertretern der drei bekannten Lantibiotika-Klassen. a) Klasse I: Nisin und Epidermin, b) Klasse II: Lacticin481 und Cinnamycin c) Klasse III: Labyrinthopeptine A1 und A2.

Im Folgenden sollen die drei verschiedenen Lantibiotika-Klassen näher charakterisiert werden:

Klasse I-Lantibiotika

Der bekannteste Vertreter der Klasse I-Lantibiotika ist Nisin, welches seit über 40 Jahren als Konservierungsstoff für Lebensmittel eingesetzt wird, ohne dass dabei ein Auftreten von bakterieller Resistenz beobachtet wurde (Abbildung 3).^[19] Nisin wurde bereits 1928 entdeckt und

ist damit eine der ältesten bekannten antibakteriellen Verbindungen.^[15, 20, 21] Der Produzent *Lactococcus lactis* stellt neben Nisin A mit Nisin Z und Q noch mindestens zwei weitere Varianten her, die sich geringfügig in unterschiedlichen Aminosäurepositionen unterscheiden.^[13, 19] Weiterhin produziert *Streptococcus uberis* eine vierte Variante, Nisin U, welches 78 % Sequenzidentität zu Nisin A aufweist.^[22] Im strukturell flexiblen Nisinmolekül sind drei *N*-terminale (A, B, C) und zwei *C*-terminale Ringe (D und E) durch eine Scharnier-Region miteinander verbunden.^[13, 15] Ein weiteres gemeinsames Merkmal der Klasse I-Lantibiotika ist das konservierte F(N/D)LD-Motiv im Leaderpeptid (Abbildung 12).^[13, 15] Obwohl die Gencluster teilweise sehr unterschiedlich aufgebaut sind, finden sich doch Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Sequenzen für die an der Lan/MeLan-Bildung beteiligten Enzyme. Bei Klasse I-Lantibiotika codieren hierfür immer eine Sequenz *lanB* für eine Dehydratase, sowie *lanC* für eine Zyklase (Abbildung 5). Die mechanistischen Grundlagen für diese Reaktion werden später in Abschnitt 1.2.2. detaillierter beschrieben. Charakteristisch ist auch ein Gen für eine Protease *lanP* zur Abspaltung des Leaderpeptids. Häufig enthalten Klasse I-Lantibiotika Gencluster zudem Gene für Proteine mit regulatorischer Funktion (*lanR*), sowie mehrere ORFs (*open reading frame*) die für Immunitätsmechanismen codieren (*lanI*, *lanEFG*) (Abbildung 4). Die *lanEFG* Sequenzen codieren ebenso wie *lanT* für ABC-Transporter und sind für den Export der prozessierten Lantibiotika zuständig.^[15]

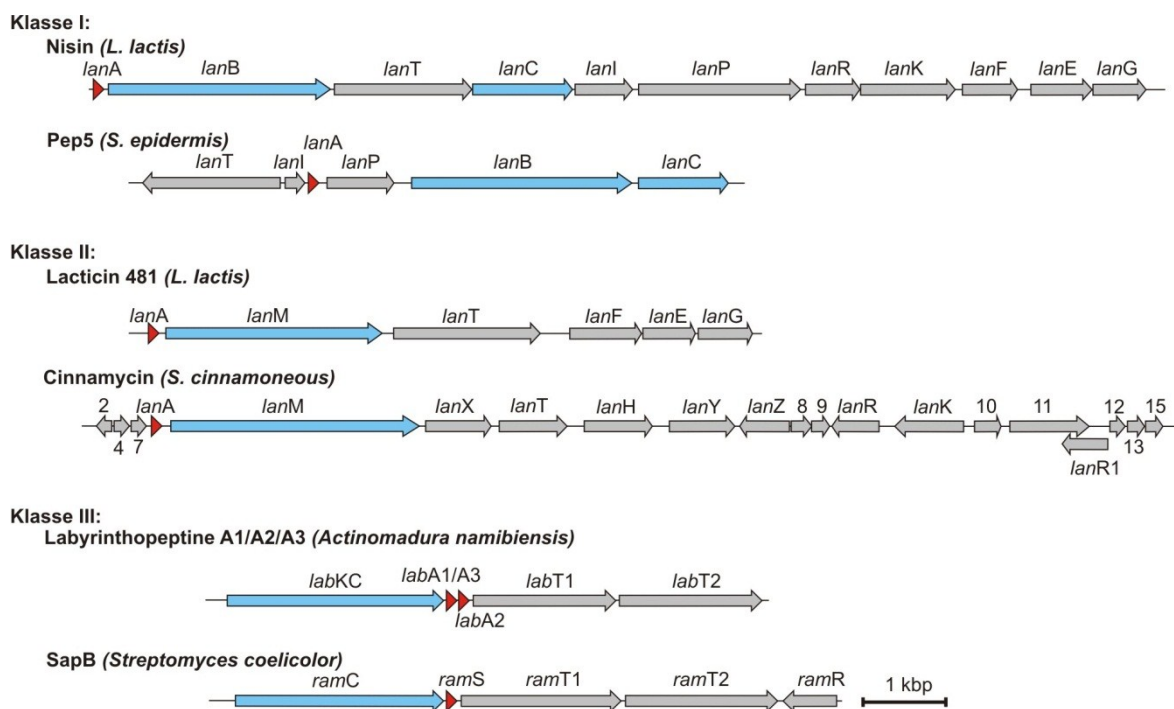


Abbildung 4: Architektur von Gencluster verschiedener Vertreter aller drei Lantibiotika-Klassen. Gene für Vorläuferpeptide sind rot, Gene die für Lanthionin und Labionin-Biosyntheseenzyme codieren sind blau hinterlegt.

Tabelle 1: Zusammenfassung der wichtigsten Enzyme und Proteine die an der Lantibiotika-Biosynthese beteiligt sind.

Enzym	Funktion	Beispiele
LanA	Präpropeptid	NisA, CinA, LctA ^[13, 15]
LanR/K	regulatorische Proteine	SpaR ^[13, 15]
LanI/EFG	Immunität	NisI, EpiEFG ^[13, 15]
LanB	Dehydratisierung (Typ I)	NisB ^[13, 15]
LanC	Thioetherbildung zwischen Cys und Dha/Dhb (Klasse I)	NisC, SpaC ^[13, 15]
LanT	Export modifizierter Peptide (bei Klasse II zudem Leaderabspaltung)	MrsM, SalT ^[41]
LanP	Abspaltung des Leaderpeptids (Klasse I)	NisP, PepP ^[13, 15]
LanM	Dehydratisierung von Ser und Thr; Thioetherbildung (Klasse II)	LctM ^[23] , HalM ^[25]
LabKC	Dehydratisierung von Ser und Thr, Labionin-/Lanthioninbildung (Klasse III)	LabKC ^[42] , RamC ^[72] , VenL ^[31]

Neben Nisin sind Subtilin (*Bacillus subtilis*), Epidermin (*Staphylococcus epidermis*) und Gallidermin (*Staphylococcus gallinarium*) weitere prominente Vertreter der Klasse I-Lantibiotika.^[13, 14, 15] Peptide dieser Klasse besitzen insgesamt betrachtet eine längliche, gestreckte, amphiphile Struktur.

Klasse II-Lantibiotika

Für die Einteilung in die Klasse II-Lantibiotika ist das Vorhandensein eines GG- bzw. GA-Motivs am C-terminalen Ende des Leaderpeptids ein charakteristisches Merkmal (Abbildung 12). Diese beiden Aminosäuren markieren zugleich die Schnittstelle für die Protease zur Abspaltung des Leaderpeptids. Im Vergleich zu Klasse I-Lantibiotika besitzen diese Peptide meist eine kompaktere, globuläre Struktur mit vorwiegend hydrophobem Charakter.^[13] Weiterhin codiert in den Genclustern dieser Gruppe nur eine Sequenz *lanM* für ein bifunktionelles Enzym, welches für die Bildung der Lanthionin- und Methyllanthionin-Verbrückungen verantwortlich ist. Ein bekannter Vertreter dieser Gruppe ist Lacticin481 (*Lactococcus lactis*), bei dem es erstmals gelang die Biosynthese in einem *in vitro* Enzym-Assay nachzustellen (Abbildung 3).^[23] Die Sequenzen der Transportsysteme der Klasse II-Lantibiotika (*lanT*) besitzen neben ihrer hauptsächlichen Funktion im Peptidexport zudem häufig eine N-terminale Cysteinprotease-Domäne für die proteolytische Abspaltung des Leaderpeptids.^[13, 15] Zu den Klasse II-Lantibiotika zählen auch die Zwei-Komponenten Lantibiotika, deren biologisch aktive Form durch die

Zusammenlagerung zweier reifer Peptide ausgebildet wird. Jedes der beiden Peptide wird dabei durch ein eigenes Strukturgen codiert und durch unterschiedliche LanM-Enzyme modifiziert. Bekannte Vertreter der Zwei-Komponenten Lantibiotika sind Lacticin 3147 und Haloduracin.^[13, 24, 25]

Vor kurzem wurden von der Arbeitsgruppe van der Donk erstmals Lantibiotika aus den Photosynthese betreibenden marinen Cyanobakterien der Gattung *Prochlorococcus* *in vitro* beschrieben.^[26] Die darin gefunden Gencluster enthielten mehrere Sequenzen für verschiedene Strukturpeptide, jedoch nur ein einzelnes Gen für ein modifizierendes Enzym vom LanM-Typ. Durch *in vitro*-Untersuchungen konnte die hohe Promiskuität dieses ProcM-Enzyms gezeigt werden. Von den 29 codierenden Strukturpeptiden konnten 17 erfolgreich *in vitro* exprimiert und gereinigt werden. Alle linearen Peptide wurden von ProcM unter Ausbildung verschiedener Ringverknüpfungen prozessiert.^[26]

Klasse III Lantibiotika

Die dritte Lantibiotika-Klasse bilden Peptide zu denen bisher das SapB-Morphogen (*Streptomyces coelicolor*), SapT (*Streptomyces tendae*) sowie AmfS (*Streptomyces griseus*) gezählt wurden.^[27, 28, 29, 30] Erwähnenswert ist auch, dass keines der Peptide eine antibiotische Aktivität aufweist, jedoch für die Entwicklung des Produzenten von entscheidender Bedeutung ist. Die Gencluster dieser Gruppe sind im Vergleich zu den beiden anderen Lantibiotika-Klassen sehr einfach aufgebaut und nur auf die wichtigsten Biosynthesegene beschränkt. Für das mutmaßlich an der Lanthioninbiosynthese von SapB und AmfS beteiligte Enzym codiert jeweils eine Gensequenz (*ramC*, *amfT*) die jedoch bis auf die C-terminale Zyklase Domäne kaum Homologie zu den Enzymen der beiden anderen Klassen aufweist. Weiterhin finden sich jeweils zwei Sequenzen welche für Transporter vom ABC-Typ (*ramT1*, *ramT2*) codieren, die jedoch keine Proteasedomäne wie Transporter der Klasse II-Lantibiotika besitzen. Überhaupt fehlt den Klasse-III Genclustern ein Gen für eine Protease zur Abspaltung des Leaderpeptids. Bisher war abgesehen von SapB über die Struktur und Biosynthese von Klasse III-Lantibiotika nur wenig bekannt. Mit der Entdeckung der Labyrinthopeptine, welche in Abschnitt 1.3 ausführlicher beschrieben werden, sollte sich dies jedoch ändern.

Kürzlich wurde ein weiteres, Klasse-III ähnliches Gencluster, aus *Streptomyces venezuelae* beschrieben. Während darin das für das modifizierende Enzym codierende Gen *venL* bis auf die C-terminale Sequenz eine hohe Homologie zu *ramC* des SapB-Genclusters aufweist, unterscheidet sich das Strukturgen *venA* deutlich von der entsprechenden *ramS* Sequenz. Die Autoren schlugen deshalb die Einteilung dieser Peptide in eine neue Klasse IV-Lantibiotika vor.^[31]

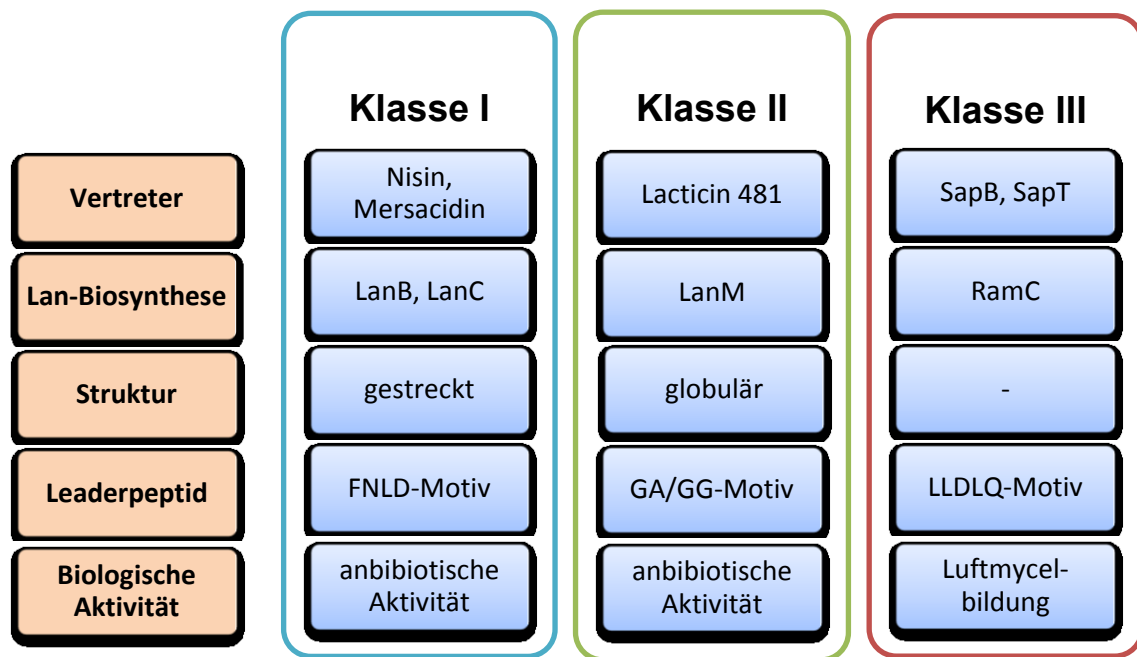


Abbildung 5: Zusammenfassung charakteristischer Merkmale der drei Lantibiotika-Klassen.

1.2.2 Lantibiotika-Biosynthese

Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt wurde, unterscheiden sich die drei Lantibiotika-Klassen hinsichtlich der Einführung der Thioetherbrücken in das Peptidrückgrat. Allen gemeinsam ist die ribosomale Synthese der Vorläuferpeptide mit einem *N*-terminalem Leaderpeptid und einem *C*-terminalen Propeptid. Im Cytosol der Produzentenzelle erfolgt anschließend die posttranslationale Modifikation mit Ausbildung der Lanthionin- und Methyllanthioninverbrückungen sowie diverser weiterer Modifizierungen. Das prozessierte Peptid wird anschließend aus der Zelle exportiert und das Leaderpeptid proteolytisch abgespalten (Abbildung 6).

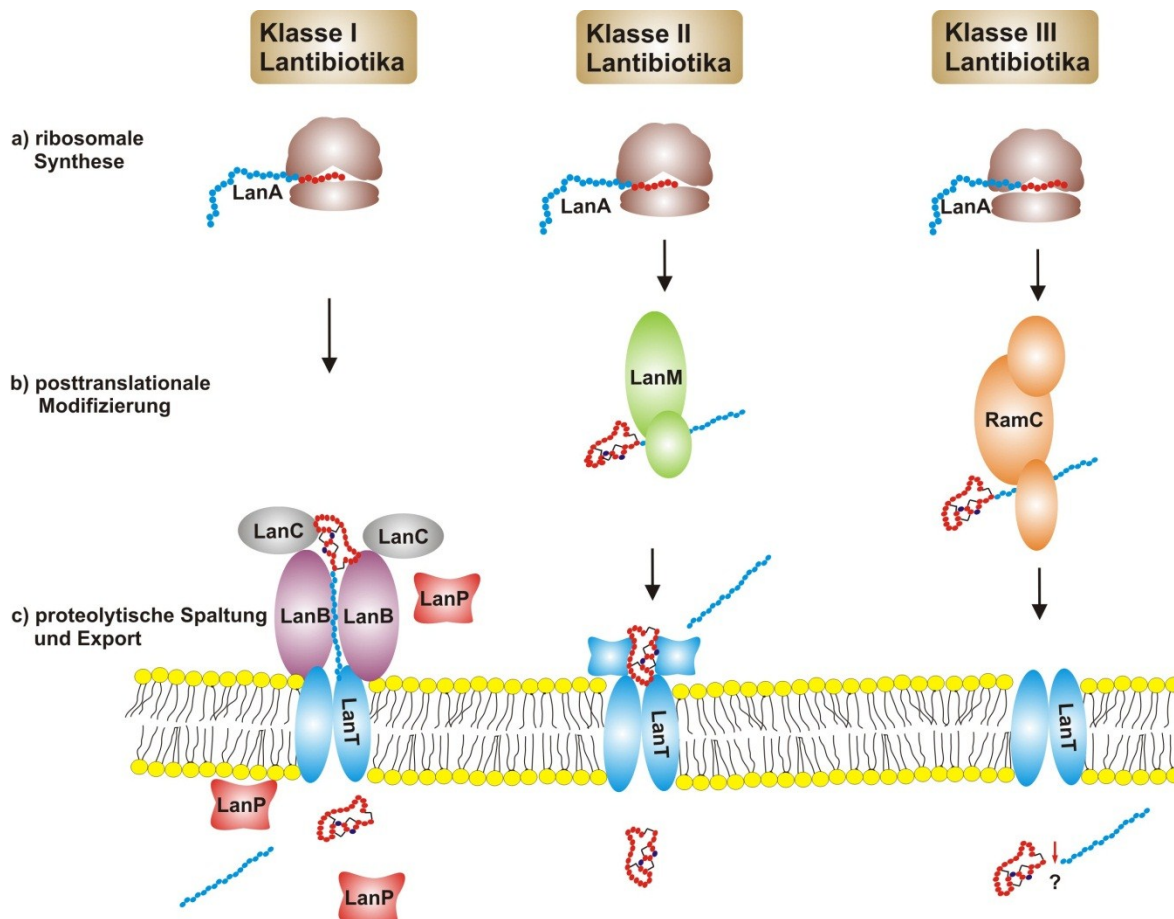


Abbildung 6: Schema der Lantibiotikabiosynthese bei den Klassen I, II und III. Nach der ribosomalen Synthese der Vorläuferpeptide erfolgt die Einführung der Lanthionin- und Methyllanthionin-Brücken durch verschiedene Enzyme. Anschließend wird das Leaderpeptid proteolytisch abgespalten und das fertig prozessierte Lantibiotikum aus der Produzentenzelle exportiert. Die Lokalisierung der Proteasen sowie Aufbau der Transporter unterscheiden sich je nach Lantibiotika-Klasse.

Der Mechanismus der Lanthionin- bzw. Methyllanthioninsynthese umfasst zwei Reaktionsschritte. Zunächst erfolgt die Dehydratisierung der Seitenketten von Serin bzw. Threonin. Dies geschieht mittels einer Phosphorylierungsreaktion mit anschließender Eliminierung der Phosphatgruppe, resultierend in der Bildung eines 2,3-Didehydroalanins (Dha) bzw. 2,3-Didehydrobutyrins (Dhb) (Abbildung 7). Bei den Klasse I-Lantibiotika wird dieser erste Schritt durch die etwa 120 kDa großen LanB-Dehydratasen katalysiert, welche keine signifikante Homologie zu anderen bekannten Proteinen aufweisen. Der zugrundeliegende enzymatische Mechanismus für die Dehydratisierung konnte hier jedoch noch nicht aufgeklärt werden. Untersuchungen an NisB und SpaB zeigten weiterhin eine Anlagerung an die Zellmembran, obgleich LanB-Enzyme keine Transmembranhelices in ihrer Sequenz aufweisen.^[15, 32] Des Weiteren wurde infolge von Co-

Immunpräzipitationsversuchen vorgeschlagen, dass LanB und LanC zusammen einen an die Membran assoziierten Komplex ausbilden.^[15, 33]

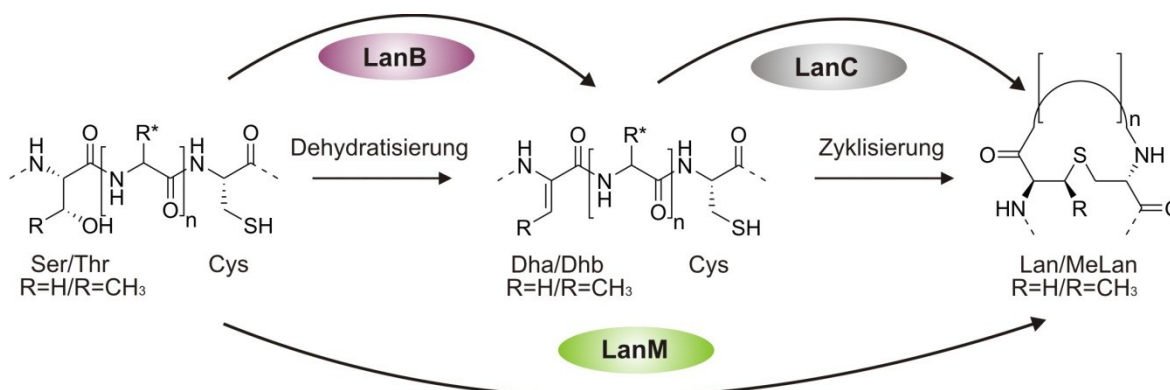


Abbildung 7: Mechanismus der posttranslationalen Bildung von Lanthionin bzw. Methyllanthionin. Die Seitenketten von Serin bzw. Threonin werden zunächst zu Dha bzw. Dhb dehydratisiert. Anschließend wird durch einen nukleophilen Angriff der Cysteinseitenkette die Thioetherbrücke gebildet. Bei Klasse I-Lanthibiotika wird die Dehydratisierungsreaktion durch LanB, die Zyklisierungsreaktion durch LanC katalysiert. Im Falle der Klasse II-Lantibiotika werden beide Schritte durch ein bifunktionelles Enzym, LanM, durchgeführt.

Die Zyklasen LanC katalysieren die anschließende Zyklisierungsreaktion bei Klasse I-Lantibiotika. Meyer *et al.* konnten dabei erstmals diese Reaktion am Beispiel von Pep5 mit der Zyklase PepC *in vivo* zeigen.^[34] In diesem Schritt greift die zum Thiolat aktivierte Seitenkette von Cystein das Michaelssystem von Dha bzw. Dhb stereoselektiv unter Ausbildung einer Thioetherbrücke an. Mit der Aufklärung der Kristallstruktur der Nisin-Zyklase gelang es, einen detaillierten Einblick in den zugrunde liegenden Mechanismus zu erhalten.^[35, 36]

Bei der Nisin-Zyklase handelt es sich um ein Enzym mit einer α, α -Fass-Struktur, bestehend aus insgesamt 14 Helices. Sieben Helices bilden das Innere des Fasses in dessen Zentrum sich ein Zink-Ion befindet (Abbildung 8).^[35, 37] Dieses Metallzentrum wird dabei von drei konservierten AS-Resten (2x Cystein, 1x Histidin) sowie einem Wassermolekül in tetraedischer Umgebung koordiniert (Abbildung 9).

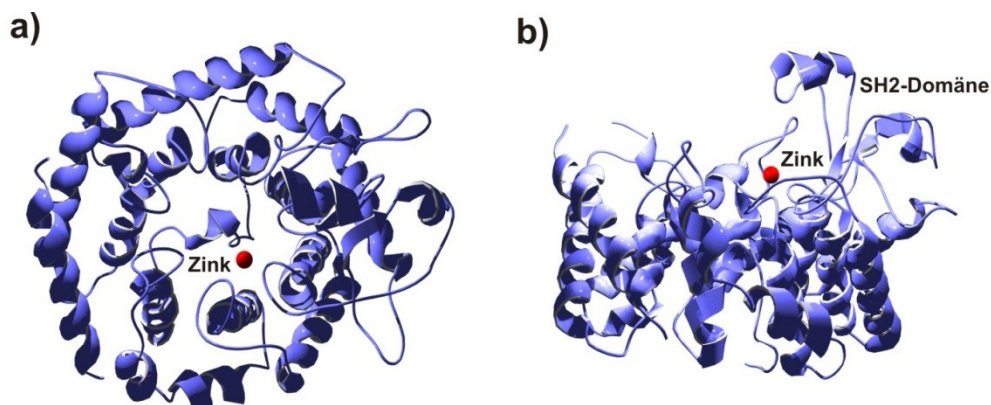


Abbildung 8: Kristallstruktur der Nisin-Zyklase NisC (PDB 2g02). a) Aufsicht auf die Zyklase bestehend aus einem α,α -Barrel aus 14 Helices und einem zentralen Zn^{2+} -Ion. b) Seitenansicht mit SH2-ähnlicher Domäne.

Im vorgeschlagenen Mechanismus für die Zyklisierung, welcher durch Mutagenesestudien bestätigt werden konnte, muss die Thiolgruppe des Cysteins unter physiologischen, neutralen Bedingungen zuerst zum Thiolat deprotoniert werden. Nach Bindung des dehydratisierten Peptidsubstrates durch NisC wird das Wassermolekül durch die Cysteinseitenkette des Peptids verdrängt. Eine basische Seitenkette, vermutlich His^{212} , deprotoniert anschließend das Cystein für die folgende nukleophile Addition an das Michaelssystem von Dha/Dhb. Dabei entsteht zunächst ein Enolat-Zwischenprodukt welches am α -Kohlenstoffatom unter Inversion der Konfiguration protoniert wird. Das L-Cystein behält hingegen seine *R*-Konfiguration im gebildeten (2*S*, 6*R*)-Lanthionin bzw. (2*S*,3*S*,6*R*)-3-Methyllanthionin (MeLan) bei (Abbildung 9).^[35, 36] Bei der Aufklärung des Zyklisierungsmechanismus konnte weiterhin gezeigt werden, dass die NisC-Enzyme nicht nur die Regio- und Stereoselektivität, sondern auch die Richtung der Thioetherverbrückung bestimmen. Diese läuft bei Klasse I-Lantibiotika immer unter Angriff eines C-terminalen Cysteins auf die N-terminale Dehydroaminoäure ab.^[35, 37]

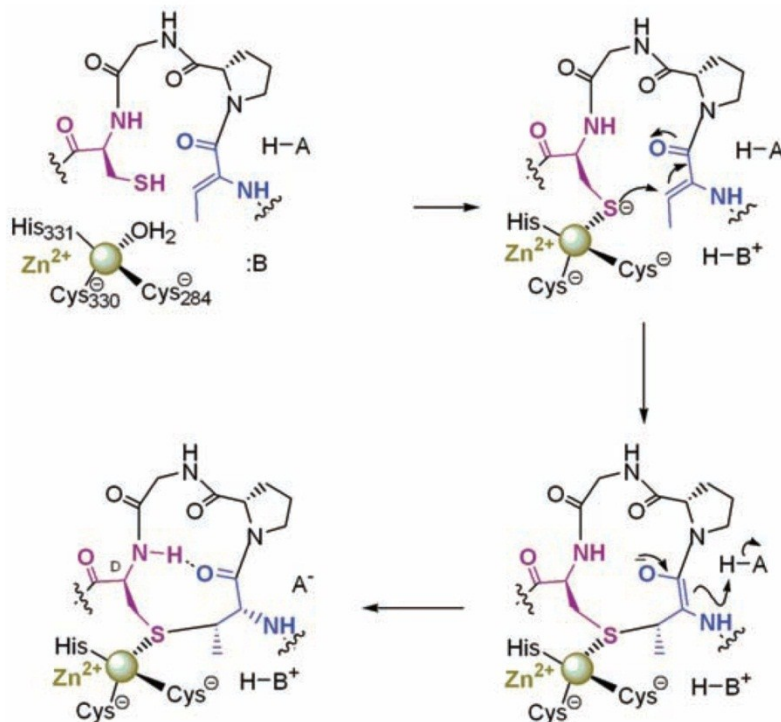


Abbildung 9: Postulierter Mechanismus für die Zyklisierungsreaktion bei der Bildung von Lanthionin bzw. Methyllanthionin.

Im Gegensatz zu Klasse I-Lantibiotika wird die Lanthionin- und Methyllanthionin-Verbrückung bei Klasse II-Lantibiotika durch ein bifunktionelles Enzym LanM katalysiert. Die etwa 100 kDa großen LanM-Enzyme besitzen keine Sequenzhomologie zu den Dehydratasen LanB, weisen jedoch im C-terminalen Bereich eine Homologie zu den LanC-Zyklasten auf. Die erste *in vitro*-Biosynthese von Lantibiotika konnte am Beispiel der Lacticin481-Synthetase LctM gezeigt werden.^[23] Nach rekombinanter Expression des Lacticin481-Präpropeptids und Reinigung über einen N-terminalen His₆-Tag erfolgte eine Inkubation mit dem ebenfalls aus *E. coli* gereinigten LctM Enzym. Dabei konnte die vollständige posttranslationale Modifikation unter Ausbildung von zwei Lanthionin- und einer Methyllanthionin-Verbrückung, sowie die Bildung eines Didehydrobutyrins in Abhängigkeit von ATP beobachtet werden. Die Aminosäuresequenz von LctM besitzt jedoch kein konserviertes ATP-Bindemotiv sowie die in herkömmlichen Kinasen konservierten katalytischen Reste. In weiterführenden Mutagenesestudien wurden essentielle Aminosäurereste für diese Reaktion identifiziert. Der zugrunde liegende Mechanismus sieht zunächst die Phosphorylierung der Serin- bzw. Threonin-Seitenkette unter ATP-Verbrauch vor (Abbildung 10).^[38] Ein katalytisch wichtiger Rest scheint hierbei Asp242 zu sein. Ein Austausch gegen Ala führte zum vollständigen Erliegen der Reaktion. Im zweiten Schritt erfolgt eine Eliminierung der Phosphatgruppe unter Bildung der Didehydroaminoäure. Vermutlich ist ein basischer Rest für die Deprotonierung des α -Kohlenstoffatoms verantwortlich, wobei wie bereits beim Zyklisierungsmechanismus ein

Enolat-Zwischenprodukt gebildet wird. Im Zuge der Mutagenesstudien an LctM wurde hierfür ein konserviertes Arg³⁹⁹ als Protonenakzeptor vorgeschlagen, obwohl dessen pK_a-Wert mit 12.5 in Lösung sehr hoch ist. Bei Austausch dieses Restes gegen Met konnte LctM die Eliminierungsreaktion nicht mehr ausführen, was sich durch Anhäufung von phosphorylierten Peptidintermediaten im *in vitro*-Assay zeigte.^[38] Für die Reprotonierung bei der Eliminierungsreaktion wird die Beteiligung eines sauren Restes diskutiert. Beide Reaktionen könnten wiederum in einem konzertierten Mechanismus erfolgen. Weitere Studien zeigten außerdem, dass für die Eliminierungsreaktion ADP und Mg²⁺ im aktiven Zentrum gebunden sein müssen.^[38, 39]

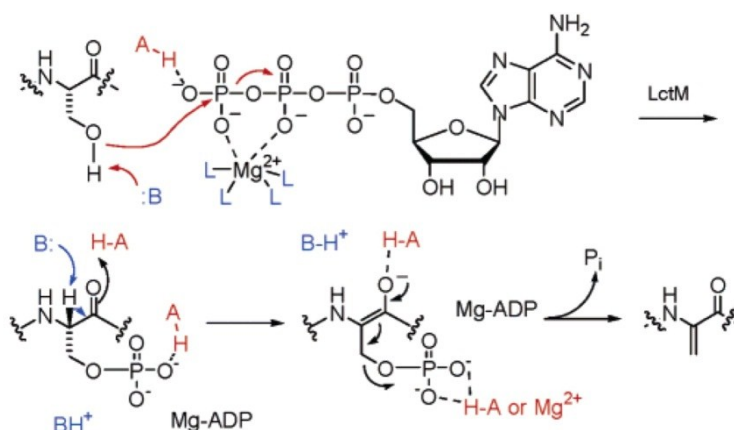


Abbildung 10: Postulierter Mechanismus für die Dehydratisierungsreaktion der Lacticin-Synthetase LctM.^[38]

Wie bereits erwähnt wurde, katalysieren LanM-Enzyme neben der Dehydratisierungs- auch die Zyklisierungsreaktion und besitzen Homologien zu LanC-Zyklasen. Alle Zn²⁺-Liganden der Nisin-Zyklase sind auch in den LanM-Enzymen hoch konserviert. Bei Austausch der entsprechenden Cystein- und Histidinreste konnte eine Dehydratisierung des Lacticin481-Präpropeptids noch beobachtet werden, das Ausmaß der Zyklisierung und Bildung der Thioetherverbrückungen war jedoch stark vermindert.^[40] Dementsprechend wurde ein Zyklisierungsmechanismus analog zur Nisin-Zyklase vorgeschlagen (Abbildung 9). Bisher gelang es nicht, ein LanM-Enzym zu kristallisieren, um erforderliche detailliertere Informationen über die am Mechanismus beteiligten katalytischen Reste zu erhalten.

Über die Biosynthese der Klasse III-Lantibiotika war bisher wenig bekannt. Einzig am Beispiel des SapB-Morphogens konnten erste Erkenntnisse gewonnen werden. Durch *in vivo*-Studien wurde gezeigt, dass das *ramC*-Gen essentiell für die Bildung von SapB ist und die Expression durch RamR reguliert wird.^[41, 42] Bei der Überexpression von RamC in *E. coli* wurde eine potentielle

Insertion in die Zellmembran sowie eine Dimerisierung des Enzyms diskutiert.^[43, 44] Eine enzymatische Aktivität von RamC konnte *in vitro* jedoch bisher nicht festgestellt werden.

1.2.3 Weitere Modifikationen von Lantibiotika

Neben der Bildung der Thioetherverbrückungen werden noch viele weitere posttranslationale Modifizierungen durch Produkte der Lantibiotika-Gencluster katalysiert (Abbildung 11). Ein sehr gut charakterisiertes Beispiel hierfür ist die oxidative Decarboxylierung des C-terminalen Cysteinrestes von Epidermin und Mersacidin unter Ausbildung von *S*-Aminovinylcystein (AviCys).^[45] Verantwortliches Enzym für diese Reaktion ist EpiD, ein Flavoenzym, welches als erstes Enzym der Lantibiotika-Biosynthese überhaupt in Reinform exprimiert, gereinigt und auch kristallisiert werden konnte.^[46] Im Zuge von *in vitro*-Untersuchungen konnte der katalytische Mechanismus von EpiD detailliert charakterisiert und aufgeklärt werden.^[47, 48]

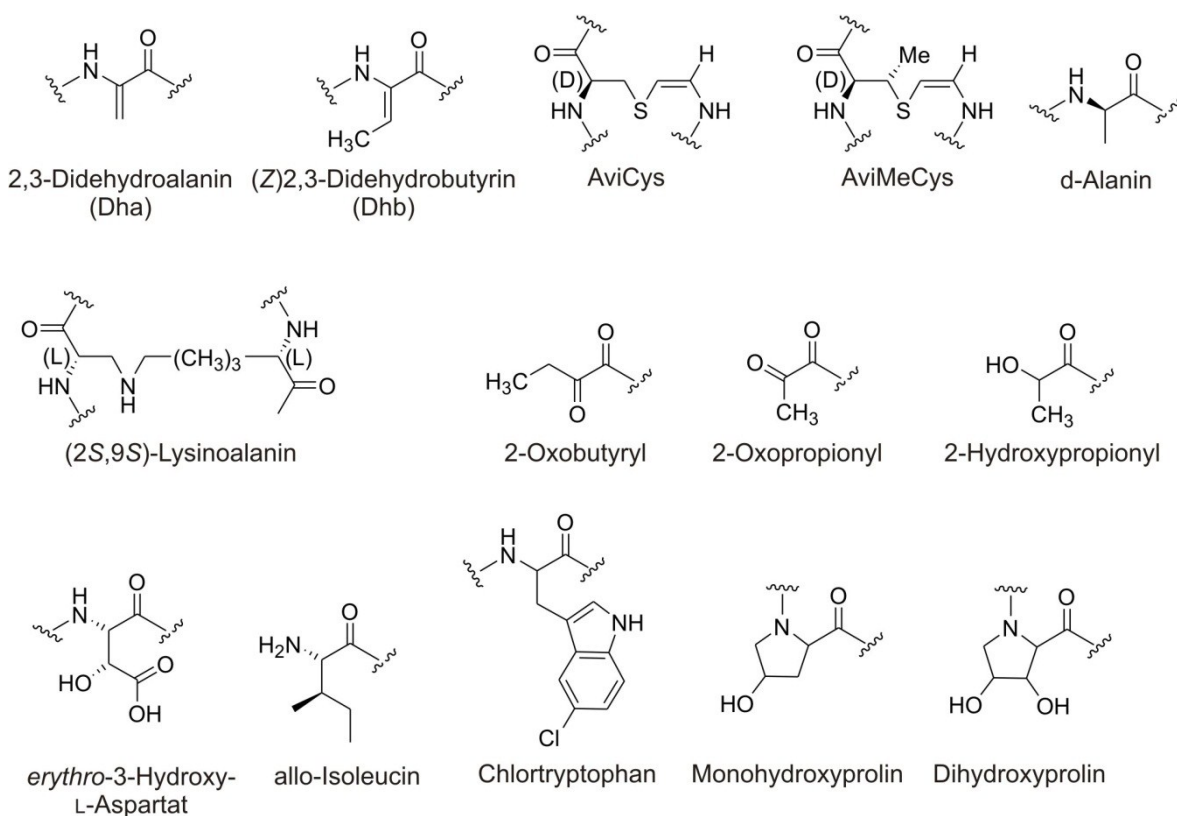


Abbildung 11: Übersicht einiger bisher gefundenen posttranslationalen Modifizierungen bei Lantibiotika.^[49]

1.2.4 Funktion des Leaderpeptids

Wie bereits erwähnt, erfolgt die Synthese ribosomaler Peptidantibiotika zusammen mit einem *N*-terminalen Leaderpeptid.^[4, 50] Sowohl für Klasse I- als auch für Klasse II-Lantibiotika wurden bereits detaillierte Studien im Hinblick auf die Struktur, Funktion und Wichtigkeit des Leaderpeptids durchgeführt.

a) Klasse I-Lantibiotika

	Leaderpeptid	Propeptid
Nisin A	MSTKD FNLD LVSVSKK--DSGASPR	1 ITSISLCTPGCK TGALMGONMKTATGHCSIHVSK
Subtilin	MSKFDD FDL DVVKVSKQ--DSKITPQ	WKSESLCTPGOV TGALQTSFLOTITONOKISK
Ericin S	MSKFDD FDL DVVKVSKQ--DSKITPQ	WKSESVCTPGOV TGVLOTFLQITITONCHISK
Epidermin	MEAVKEKNDL FNLD VKVNAKESNDSGAEP	IASKFICTPGCAKT GSFNSYCC
Gallidermin	MEAVKEKNEL FDL DVKVNAKESNDSGAEP	IASKFLCTPGCAKT GSFNSYCC
Staphylococcin T	MEAVKEKNEL FDL DVKVNAKESNDSGAEP	IASKFLCTPGCAKT GSFNSYCC
Mutacin 1140	MSNTQLLEVLGTET FDVQ EDLFAFDTTDTTIVASNDPDPTR	FKSWSLCTPGCAKT GSFNSYCC
Mutacin I	MSNTQLLEVLGTET FDVQ EDLFAFDTTDTTIVASNDPDPTR	FSSLSLCSLGTGVKNPFSNSYCC
Pep5	MKNKNL FDLE IKKETSQNTD-ELEPQ	TAGPAIRASVKQCQKTLKATRLFTVSCKGKNGCK

b) Klasse II-Lantibiotika

	Leaderpeptid	Propeptid
Lacticin 481	MKEQNSFNLLQ EV TES EL DLILGA	KGSGVIHTISHECHMNSWQFVFTCCS
Streptococcin A-FF22	MEKNNEVINSIQ EV SLE EL DQII GA	GKNGVFKTISHECHLNTWAFATCCS
Variacin	MTNAFQALD EV TD EL DAILGG	GSGVIPTISHECHMNSFQFVFTCCS
Butyrivibriocin OR79	MNKELNALTNPIDEK EL EQILGG	GNGVIKTISHECHMNTWQFIFTCCS
Mutacin II	MNKLNSNAVVS NE VSD EL DTILGG	NRWWQGVVPTVSYEHRMNSWQHVFCC
Salivaricin A	MKNSKDILNNAIE EV SEK EL MEVAGG	KRGSGWIATITDDSPNSVFVCC
Salivaricin A1	MKNSKDILTNAIE EV SEK EL MEVAGG	KKGSGWFATITDDSPNSVFVCC
Sublancin 168	MEKLFK EV KLE EL ENQKGS	GLGKAQCAALWLOASGGTIGGGGAVALQNYRQFGR

Abbildung 12: Multiples Sequenzalignment von Lantibiotika-Vorläuferpeptiden der Klassen I (a) und II (b).^[15] Konservierte Aminosäuren im Leaderpeptid sind in rot gekennzeichnet, an der Bildung von Lanthionin und Methyllanthionin beteiligte Aminosäuren in den Propeptiden sind gelb und blau hinterlegt.

Leaderpeptide der Klasse I-Lantibiotika haben durchschnittlich eine Länge von 25 Aminosäuren und besitzen ein charakteristisches FNLD-Motiv im *N*-terminalen Abschnitt der Sequenz sowie einen konservierten Prolinrest an Position -2 (Abbildung 12). Eine wichtige Funktion des Leaderpeptids ist der Selbstschutz der Produzentenzelle vor dem fertig prozessierten Peptid. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnte gezeigt werden, dass sich die biologische Aktivität von posttranslational modifizierten Lantibiotika, bei denen das Leaderpeptid noch nicht abgespalten wurde, deutlich vermindert ist.^[35, 51]

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Erkennung des prozessierten Lantibiotikums durch die Transportsysteme beim Export von Klasse I-Lantibiotika über die Leadersequenz erfolgt. Peptide, die nicht zu Lantibiotika gehörten, wurden an die Leaderpeptide von Nisin und Subtilin kloniert und deren erfolgreicher Export über die entsprechenden Transportsysteme gezeigt.^[52, 53]

Eine wichtige Rolle haben die Leaderpeptide auch bei der Einführung der posttranslationalen Modifikationen. Die Erkennung des Präpropeptids über die Leadersequenz durch die prozessierenden Enzyme LanB und LanC konnte am Beispiel von Nisin sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt werden.^[35, 54, 55]

Die Leadersequenzen von Klasse II-Lantibiotika besitzen als charakteristisches Merkmal ein GG- bzw. GA-Motiv am C-terminalen Ende der Sequenz, wodurch zugleich die Spaltstelle für die Protease markiert wird.^[13, 15, 50] Die unterschiedlichen Funktionen dieser Leaderpeptide gleichen denen der Klasse I-Lantibiotika, darunter auch der Selbstschutz des Produzenten vor dem fertig prozessierten Peptid solange die Leadersequenz sich noch am selbigen befindet.^[23] Ebenso wurde die Wichtigkeit in Bezug auf die Erkennung durch das Lanthionin-einführende Enzym LanM untersucht. *In vitro*-Studien an Lacticin481 zeigten, dass in diesem Fall das Leaderpeptid nicht essentiell für die Erkennung durch die Lacticin-Synthetase LctM ist.^[56] Lacticin-Propeptide wurden auch ohne Leadersequenz von LctM modifiziert, jedoch mit geringerer Effektivität und unvollständiger Modifizierung des Peptids. Durch Zugabe des Leaderpeptids zur Reaktion wurde die Prozessierungseffizienz von LctM deutlich gesteigert. Die Autoren folgerten aus diesen Ergebnissen, dass das Leaderpeptid eine Funktion bei der Aktivierung des Enzyms spielen könnte. Weiterhin zeigte sich, dass die Prozessierungsrichtung des Enzyms vom N- zum C- Terminus des Peptides in Abwesenheit des Leaderpeptids aufgehoben war und ungerichtet erfolgte.^[56, 57]

1.2.5 Biologische Aktivität und Wirkmechanismus von Lantibiotika

Viele der von Gram-positiven Bakterien produzierten Lantibiotika inhibieren das Wachstum anderer Bakterien auf unterschiedliche Art und Weise. Bisher konnten unterschiedliche Wirkmechanismen für die Entfaltung der antibiotischen Aktivität von Lantibiotika aufgeklärt werden. Einen zentralen Angriffspunkt stellt hierbei die Zellwand Gram-positiver Bakterien dar.^[15, 58] Nisin und andere Klasse I-Lantibiotika, darunter Epidermin und Mutacin 1140, zeigen hierbei unter anderem ihre Wirkung durch Einlagerung in die Zellmembran und Ausbildung von Poren. Dies führt zu einem Ausstrom von Metaboliten, sowie zum Verlust wichtiger Ionengradienten, was wiederum den unmittelbaren Zelltod zur Folge hat.^[17, 59] Sehr gut konnte dies am Beispiel von Nisin untersucht werden. In dem vorgeschlagenen Mechanismus, welcher auf zahlreichen NMR-Daten mit Fluoreszenzmarkierung basiert, interagiert der hydrophobe Teil des amphipatischen Nisinmoleküls mit der Membran, während hydrophile Seitenketten den Innenraum der Pore auskleiden. Zentraler Punkt hierbei ist die Interaktion von Nisin mit Lipid II. Dabei binden die N-terminalen Ringsysteme die Disaccharid-Pyrophosphatregion von Lipid II, während der positiv geladene C-Terminus von Nisin mit den Kopfgruppen der Lipide der Zellmembran wechselwirkt.^[15, 60, 61] Mehrere Moleküle dieses Nisin-Lipid

II-Komplexes lagern sich wiederum zur Ausbildung einer Pore zusammen (Abbildung 13).^[15] Insgesamt werden dabei vier Lipid-II-Bausteine welche mit acht Nisin-Molekülen interagieren, benötigt. Die exakte Struktur, die hierbei ausgebildet wird, ist jedoch nicht bekannt.

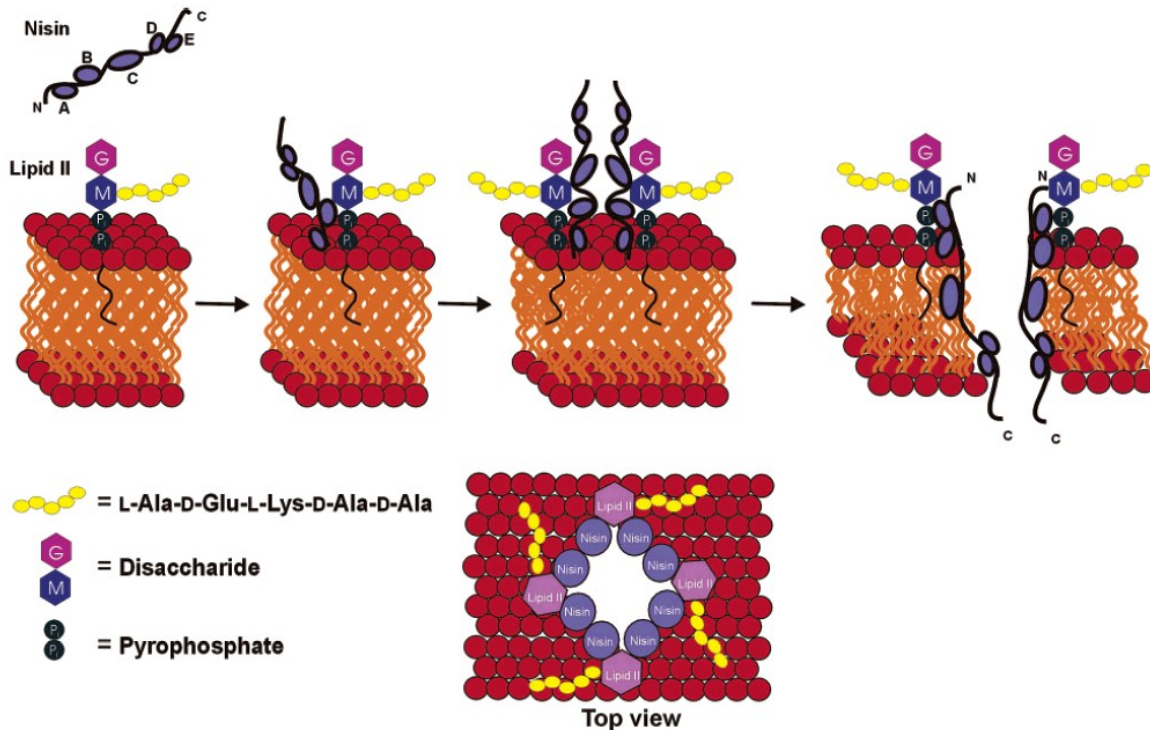


Abbildung 13: Postulierter Mechanismus für die Porenbildung in bakteriellen Zellmembranen in Folge der Interaktion von Nisin mit Lipid-II-Molekülen.^[15]

Studien mit den Glykopeptidantibiotika Vancomycin und Ramoplanin zeigten, dass die Bindung an Lipid II ein viel verbreiteter Mechanismus zur Inhibition der bakteriellen Zellwandbiosynthese ist.^[15, 62, 63] Durch die Bindung von Nisin an Lipid II wird zudem der Aufbau der Zellwand mit Peptidoglykan blockiert. Aufgrund der Komplexbildung mit Nisin ist dieses Polymer für die Transpeptidase- und Transglucosidase-Enzyme nicht mehr zugänglich, wodurch die Quervernetzung der Zellwandbausteine inhibiert wird. Eine entsprechende Interaktion mit Lipid II liegt auch bei Mersacidin vor, wobei hier jedoch keine Porenbildung beobachtet wurde.^[15, 64] Sowohl gegen Methicillin-resistente *S. aureus* Stämme (MRSA) als auch gegen Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) konnte hier eine antibiotische Aktivität festgestellt werden.^[15, 64, 65]

Eine weitere Aktivität zeigen die Klasse II-Lantibiotika Cinnamycin und Duramycin als wirksame Inhibitoren der Phospholipase A2 durch Bindung des Substrats Phosphatidylethanolamin.^[66, 67] Duramycin wurde bereits in klinischen Studien zur Testung seiner Aktivität gegen Cystische Fibrose und anderen Atemwegserkrankungen eingesetzt.^[13, 68] Ein weiteres Beispiel für eine mögliche praktische Anwendung von

Lantibiotika ist Mutacin 1140, das effektiv gegen Karies-hervorrufende Streptokokken wirkt, sowie Epidermin als Wirkstoff gegen Akne.^[37, 69]

Abgesehen von ihrer antibiotischen Aktivität gegen vegetative Zellformen konnte für Nisin und Sublancin auch eine Inhibition der Sporenkeimung von *Bacillus*- und *Clostridium*-Arten nachgewiesen werden. Als mögliche Ursache wird hierbei eine kovalente Modifizierung freier Sulfhydrylgruppen auf der Sporenoberfläche mit reaktiven Dha-Resten diskutiert.^[15]

Während bei verschiedenen Vertretern der Klasse I- und II- Lantibiotika also eine antibiotische Aktivität gegen Gram-positive Bakterien gezeigt wurde, besitzen SapB und SapT der Klasse III-Lantibiotika eine weitere interessante biologische Funktion. Anstelle der Wachstumsinhibition wurden SapB und SapT infolge ihrer Eigenschaft als oberflächenaktive Substanzen eine Schlüsselrolle bei der Luftmycelbildung ihrer Produzentenstämme *S. coelicolor* und *S. tendae* zugeschrieben.^[27, 28]

1.3 Die Labyrinthopeptine

Eine besondere Bereicherung der bisher noch wenig charakterisierten Klasse III-Lantibiotika stellt die Entdeckungsgeschichte der Labyrinthopeptine dar. Diese neuartigen Peptide werden von dem Actinomyceten *Actinomadura namibiensis* DSM 6313 produziert, welcher in Folge eines Screeningprogramms der ehemaligen Hoechst AG (heute Sanofi) im Jahre 1988 in der namibischen Wüste entdeckt wurde (Abbildung 14).^[70]

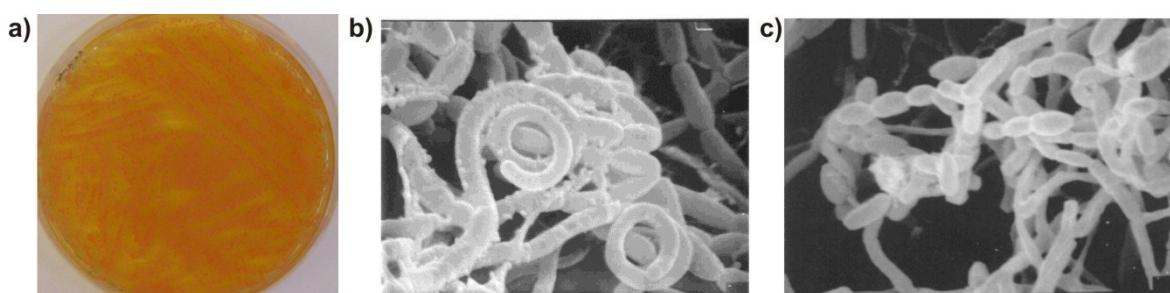


Abbildung 14: a) Phänotypisches, lachsfarbenes Aussehen von *Actinomadura namibiensis* auf einer Agarplatte. Die Photographien b) und c) zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen der spiralförmigen Sporenketten des Luftmycels.^[70]

Aus dem Kulturüberstand von *A. namibiensis* DSM 6313 konnten nach einem aktivitätsbasierten *Screening* gegen *Herpes-simplex*-Viren drei biologisch aktive Sekundärmetabolite isoliert werden. Dabei handelte es sich um Verbindungen peptidischen Ursprungs, welche mithilfe chromatographischer Methoden weiter aufgereinigt werden konnten. Infolge der Strukturaufklärung im Arbeitskreis von Prof. Dr. Roderich Süßmuth an der TU Berlin konnte die Aminosäurezusammensetzung und für ein Peptid die hochauflösende Molekülmasse von 1922.6872 Da mit der Summenformel $C_{85}H_{110}N_{20}O_{24}S_4$

mittels ESI-FTICR-Massenspektrum erfolgreich ermittelt werden. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. George Sheldrick (Georg-August-Universität Göttingen) gelang es schließlich von einer der drei Verbindungen eine Kristallstruktur mit einer Auflösung von 1.0 Å zu erhalten (Abbildung 15).^[71, 72] Aufgrund der äußerst komplex aufgebauten, Labyrinth-artigen Struktur, wurde die Verbindung Labyrinthopeptin A2 (LabA2) genannt. Das insgesamt 5-fach verbrückte Labyrinthopeptin A2 besitzt eine globuläre Form und besteht hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäuren. LabA2 kann formal in zwei Nonapeptide aufgeteilt werden, welche über eine Disulfidbrücke, die von den C-terminalen Cysteinen ausgebildet wird, miteinander verbunden sind. Jedes Nonapeptid kann man wiederum in ein Tetrapeptid (A-Ring) und ein Pentapeptid (B-Ring) gliedern. Ein gemeinsames quartäres α C-Atom verbindet beide Ringsysteme miteinander. Die beiden A-Ringe in Labyrinthopeptin A2 werden durch eine Methylengruppe zwischen den α C-Atomen von Lab1 und Lab4 bzw. Lab10 und Lab13 ausgebildet. Diese als Labionin (Lab) bezeichnete carbazyklische Seitenkettenverknüpfung stellt eine neuartige, zuvor in Peptiden und Proteinen noch nicht gefundene, posttranslationale Modifikation dar (vgl. Abbildung 18).^[72]

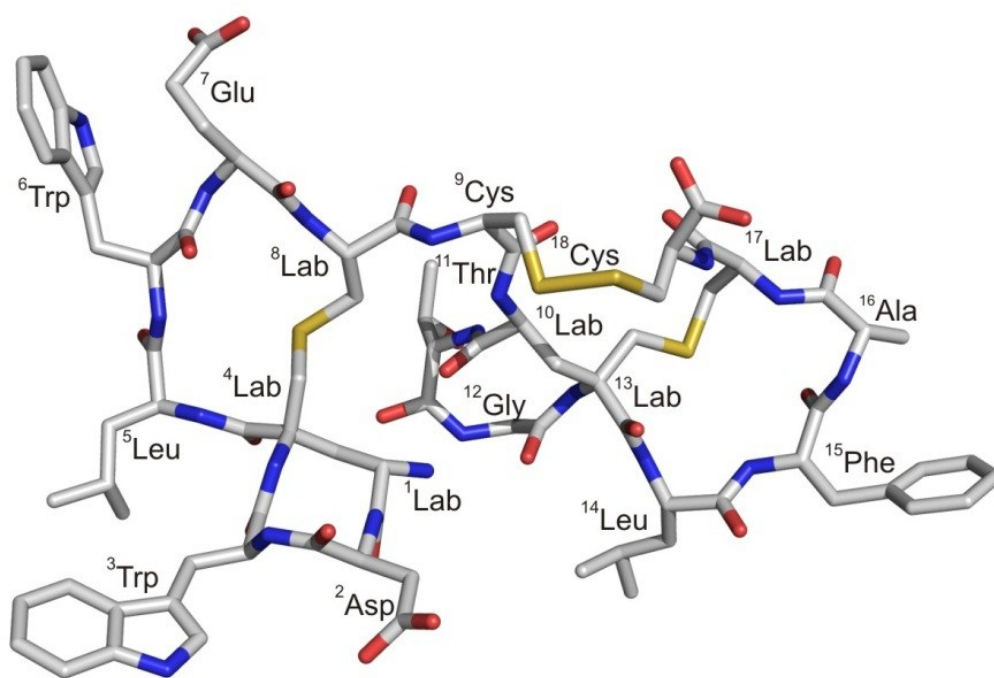


Abbildung 15: Kristallstruktur von Labyrinthopeptin A2.^[72]

Der doppelt im Peptid vorkommende Labionin-Baustein (Lab) besitzt eine 2*S*,4*S*,8*R*-Konfiguration (Abbildung 18). Weiterhin ist hervorzuheben, dass die beiden A-Ringe von Labyrinthopeptin A2 zwischen Asp2–Trp3 und Thr11–Gly12 in eine lokale Konformation mit *cis*-Amidbindungen gezwängt werden (Abbildung 16).

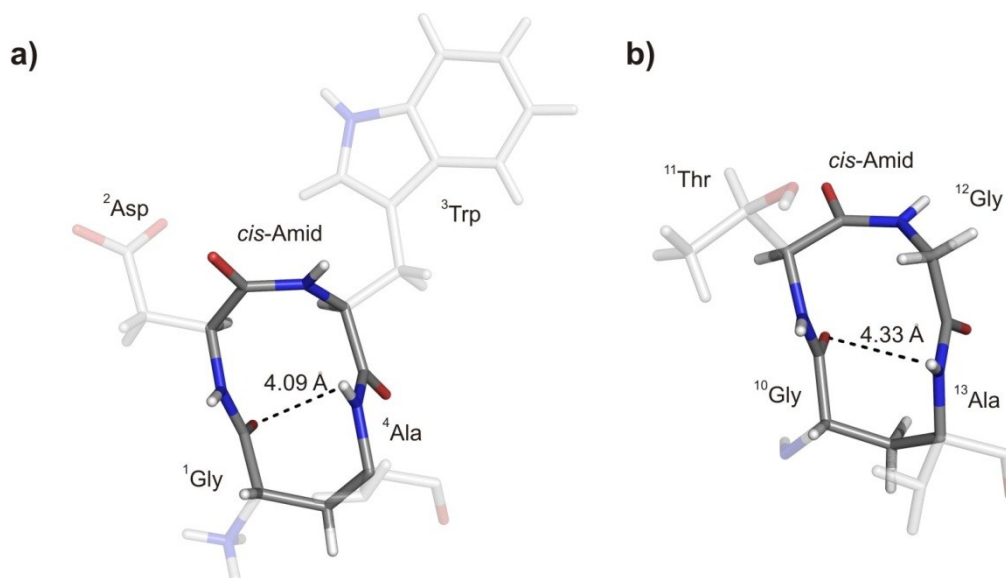


Abbildung 16: Struktur der A-Ringe von Labyrinthopeptin A2 mit *cis*-Amidbindungen.^[72]

In Zusammenhang mit der vorkommenden Disulfidbrücke ist weiterhin erwähnenswert, dass diese Modifikation bei Lantibiotika bisher ausschließlich in Sublancin 168 aus *B. subtilis* gefunden wurde.^[73] Eine aktuelle Studie zur Strukturaufklärung dieses Peptids zeigte jedoch, dass es sich hierbei nicht um ein Lantibiotikum, sondern vielmehr um ein Glycopeptid handelt.^[74] Somit sind die Labyrinthopeptine die bisher einzigen Lantibiotika die eine Disulfidbrücke als posttranslationale Modifikation besitzen.

Die eigentliche Zuordnung zu den Klasse III-Lantibiotika erfolgte mit der Identifizierung des Biosynthesegenclusters der Labyrinthopeptine im Arbeitskreis von Professor Süßmuth (TU Berlin). Hierbei konnte das 6.4 kb große Gencluster durch *Screening* einer Cosmidbank von *Actinomadura namibiensis* mithilfe von degenerierten Primersonden identifiziert werden.^[72] Die Architektur des Labyrinthopeptin-Genclusters (*lab*-Cluster) zeigt dabei eine große Ähnlichkeit zum Cluster des SapB-Morphogens aus *Streptomyces coelicolor* (Abbildung 4). Bei der Zuordnung der kodierenden DNA-Sequenz wurden insgesamt fünf Gene identifiziert, die an der Biosynthese beteiligt sind. Für die aus dem Kulturüberstand von *A. namibiensis* isolierten Peptide konnten zwei zugehörige Strukturgene identifiziert werden, wobei die Verbindungen LabA1 und LabA3 aus einem gemeinsamen Vorläuferpeptid hervorgehen. Beide Strukturgene enthalten zudem ein konserviertes Motiv, welches für die Vorläuferamino-säuren mit der Konsensussequenz Ser-Xxx-Xxx-Ser-Xxx-Xxx-Xxx-Cys-Motiv für den Labioninbaustein kodiert. Mit 18 Aminosäuren für LabA2 und 20 bzw. 21 Aminosäuren für LabA1 bzw. LabA3 sind die entsprechenden Strukturpeptide im Vergleich zu Klasse I und II Lantibiotika relativ kurz (Abbildung 17). Die beiden Leadersequenzen haben eine identische Länge mit 20 Aminosäuren und zeigen vor allem im *N*-terminalen Bereich eine sehr hohe Sequenzhomologie.

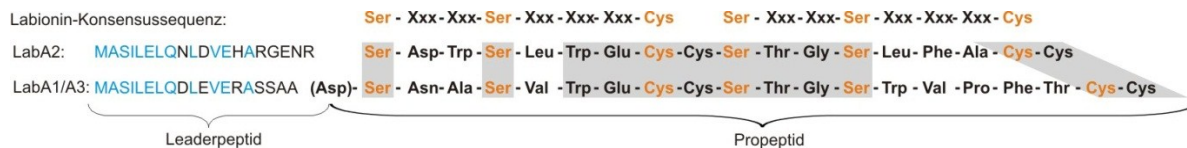


Abbildung 17: Sequenzvergleich der Labyrinthopeptin-Präpropeptide mit Konsensussequenz des Labioninvorläufers. Im Leaderpeptid konservierte Aminosäuren sind blau hervorgehoben.^[72]

Weiterhin codieren stromabwärts im Gencluster zwei Gene für ATP-abhängige ABC-Transporter (*labT1* und *labT2*).^[75] Beide Transporter könnten beim Export der Labyrinthopeptine synergistisch wirken, wie es im Falle der Klasse I-Lantibiotika gezeigt werden konnte. Schließlich findet sich stromaufwärts der beiden Strukturgene eine Sequenz für das mutmaßliche Enzym, welches für die posttranslationale Modifizierung der ribosomal synthetisierten Peptide verantwortlich ist. Auf den Aufbau dieses als LabKC bezeichneten Enzyms mit Ser/Thr-Kinase-Funktion und einer C-terminalen Homologie zu Lanthionin-Zyklasten soll im Abschnitt 5.1 näher eingegangen werden. Gene, welche auf eine enzymatische Einführung der Disulfidbrücke in LabA2 hinweisen würden, z.B. eine Thioldisulfid-Oxidoreduktase, sind im Gencluster nicht enthalten.^[73] Weiterhin konnten im Gegensatz zu den Clustern von Klasse I- und II- Lantibiotika keine Gene mit Funktion für Immunität oder Regulation gefunden werden, ebenso keine Protease für die Abspaltung des Leaderpeptids.

Aufgrund der Röntgenstrukturanalyse für Labyrinthopeptin A2, sowie der Identifizierung des Genclusters mit den entsprechenden Sequenzen codierend für die Vorläuferpeptide, konnten für die beiden weiteren im Kulturfiltrat von *A. namibiensis* gefundenen Peptide LabA1 und LabA3 Strukturvorschläge abgeleitet werden. Beide Peptide besitzen demnach analog zu LabA2 5 Ringsysteme mit jeweils zwei Labionin-Verbrückungen, wobei sich LabA3 um einen zusätzlichen Aspartat-Rest am N-Terminus von LabA1 unterscheidet (Abbildung 3). Es wurde jedoch beobachtet, dass sich LabA3 bei längeren Fermentationszeiten in LabA1 umwandelt, was mit der Einwirkung unspezifischer Proteasen erklärbar wäre.^[71] Der Hauptunterschied zu LabA2 liegt in dem zu einem Heptapeptid erweiterten B'-Ring mit einem Didehydrobutyrin-Rest, welcher aus der Dehydratisierung von Threonin hervorgeht.

Neben der anfangs gefundenen antiviralen Aktivität konnte im Zuge weiterführender Experimente *in vivo* in einem Nervenverletzungsmodell (*spared nerve injury*) in der Maus eine Aktivität gegen neuropathische Schmerzen festgestellt werden.^[76] Durch intravenöse Verabreichung von LabA2 wurde eine signifikante Senkung taktiler Allodynie mit einem ED₅₀-Wert von 50 mgkg⁻¹ beobachtet.^[72] Dabei handelt es sich um ein erhöhtes Schmerzempfinden gegenüber einem Druckreiz. Aufgrund dieser Aktivität gegen

neuropathischen Schmerz sowie der auffälligen Disulfidbrücke in der Struktur der Labyrinthopeptide kann man eine Verbindung zu den Conotoxinen, den Nervengiften der Kegelschnecken, herstellen.^[77] Eines der bekanntesten Beispiele für diese Wirkstoffklasse ist das Ziconotid, welches zur Behandlung schwerer chronischer Schmerzen eingesetzt wird.^[78]

Ein möglicher Biosyntheseweg für die Bildung des Labionin-Motives könnte unter Berücksichtigung bisheriger Erkenntnisse von Klasse I- und Klasse II- Lantibiotika wie folgt verlaufen. Für die Ausbildung des Labionin-Motives werden zwei Serine sowie ein Cystein als Vorläuferaminoacids benötigt. Der für die Labionin-Bildung zugrundeliegende enzymatische Mechanismus könnte analog zu den Klasse I- und Klasse II- Lantibiotika zunächst mit der Dehydratisierung der beiden Serinseitenketten beginnen. Anschließend könnte die zum Thiolat aktivierte C-terminale Cysteinseitenkette das benachbarte Didehydroalanin unter Ausbildung einer Thioetherverbrückung nukleophil angreifen. Anstelle einer Reprotonierung am α C-Atom würde über die verbliebene negative Ladung in einem konzertierten Mechanismus wiederum ein Angriff auf das Michael-System des N-terminalen Dha erfolgen unter Ausbildung der fertigen Labioninstruktur (Abbildung 18).^[72]

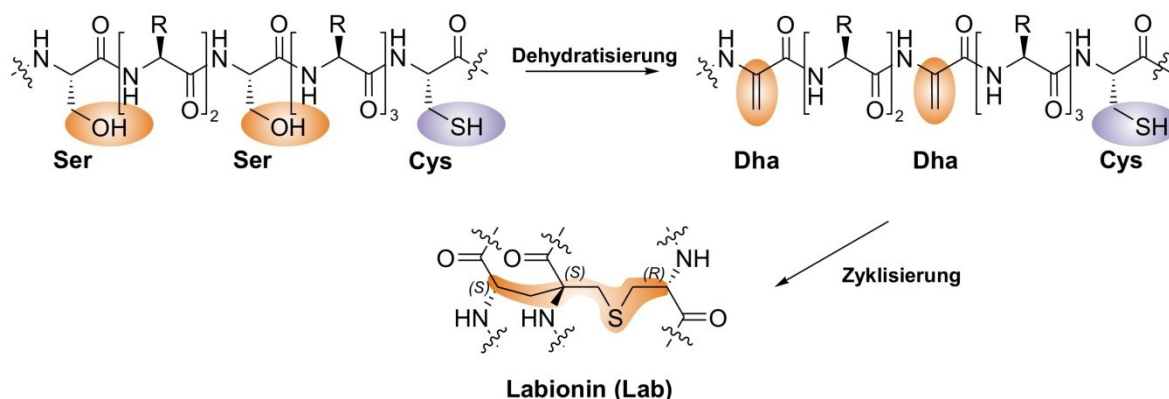


Abbildung 18: Postulierter Mechanismus für die Bildung der Aminosäure Labionin. Nach Dehydratisierung beider Serin-Seitenketten entstehen zunächst zwei Didehydroalanine im Peptid. Anschließend erfolgt der nukleophile Angriff der zum Thiolat aktivierten Cystein-Seitenkette auf das erste Dha unter Ausbildung der Lanthionin-Brücke. Durch eine weitere Michael-Addition wird der Labionin-Baustein bestehend aus A- und B-Ring vollendet.

2 Zielsetzung

Die Aufklärung der Röntgenkristallstruktur von Labyrinthopeptin A2 erbrachte einzigartige, detaillierte Einblicke in die bis dato noch relativ unbekannte Klasse III-Lantibiotika. Eine zentrale Erkenntnis war vor allem die Entdeckung der neuartigen Labioninverbrückung. Mit der Identifizierung des Genclusters der Labyrinthopeptine wurde zudem der Grundstein für die weitere Untersuchung der Biosynthese gelegt. Damit waren bereits wichtige Ausgangsinformationen für die zugrunde liegende Arbeit gegeben. Das Hauptziel des Projektes war zunächst die Etablierung eines *in vitro*-Enzym-Assays zur Untersuchung der Labyrinthopeptin-Biosynthese. Damit sollte eine detaillierte Charakterisierung und Funktionsweise des LabA2 prozessierenden Enzyms, LabKC ermöglicht werden. Ein entsprechender Assay konnte bisher lediglich für die Klasse II-Lantibiotika Lacticin481 und Haloduracin etabliert werden.

Für den *in vitro*-Assay musste zunächst das modifizierende Enzym LabKC erfolgreich kloniert, exprimiert und gereinigt werden. Weiterhin war es erforderlich ein geeignetes Peptidsubstrat mit Hilfe rekombinanter Expression oder alternativ durch chemische Peptidsynthese bereitzustellen. Sollte dies sowohl für das Enzym als auch für das Substrat gelingen, war der nächste Schritt die Etablierung der *in vitro*-Assay Bedingungen sowie der entsprechenden Analytik zur Beobachtung der erfolgten enzymatischen Reaktion. Hierfür sollten vor allem LC-MS gestützte Methoden zum Nachweis der Dehydratisierungs- und Zyklisierungsreaktion zum Einsatz kommen.

Im Mittelpunkt der fortführenden Arbeiten stand im Fall einer erfolgreichen Etablierung der enzymatischen Umsetzung, die Untersuchung des katalytischen Mechanismus von LabKC unter Anwendung von Mutagenese-Methoden. Durch Austausch konservierter Aminosäuren in den einzelnen LabKC-Domänen sollten wichtige katalytische Reste identifiziert werden. Der Reaktionsablauf der Labyrinthopeptin Biosynthese sollte zudem durch Synthese verschiedener Präpropeptid-Varianten mit anschließender Testierung auf Umsetzung durch LabKC untersucht werden. Ein weiteres Ziel war die Aufklärung der Rolle des Leaderpeptids für die Biosynthese der Labyrinthopeptine. Für Klasse I- und Klasse II- Lantibiotika wurden diesbezüglich schon umfangreiche Untersuchungen gemacht, welche die Wichtigkeit des Leaderpeptids für die Prozessierung, Transport und Immunität des Produzenten heraus stellten. Für Klasse- III Lantibiotika fehlten entsprechende Studien bisher gänzlich. Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb die Wichtigkeit des Leaderpeptids für die Prozessierung durch LabKC anhand von LabA2-Leaderpeptidvarianten eingehend untersucht werden.

3 Materialien

3.1 Geräte

Agarosegelkammern:	Mini-Sub Cell GT; Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Autoklav:	Varioklav Dampfsterilisator, HP Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Blot-Apparatur für	
Western-Blot:	Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell; Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Brutschrank:	BD 53; Binder, Tuttlingen
CD-Spektrometer J715	JASCO, Gross-Umstadt
Eismaschine:	AF 80 AS; Scotsman Europe, Mailand, Italien
Evaporator	Personal Evaporator E Z2, Genevac Ltd, Ipswich, Großbritannien
French Press:	SIM-AMINCO; SLM Instruments, Inc. Rochester, New York, USA
FPLC:	Äkta Purifier 10, GE Healthcare, Uppsala, Schweden
	verwendete Säulen:
	HisTrap TM FF-crude, 1 mL
	GSTrap TM 4B, 5 mL
	Superdex TM 200, 10/300 GL
	Superdex TM Peptide 10/300 GL
	alle GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Gefriertrocknungsanlage:	VirTis AdVantage Plus, SP Scientific, Warminster, PA, USA
Geldokumentation:	GelSystem Flexi 5020 S; Biostep GmbH, Jahnsdorf
Heizblock:	Thermomixer comfort; Eppendorf AG, Hamburg
HPLC-Geräte:	1100-, 1200- sowie 1290-Serie; Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn
HPLC-Säulen:	Grom-Sil 120 ODS-5 ST, 3 µM, 100 x 2 mm; Alltech Grom GmbH, Rottenburg-Hailfingen

	Eclipse Plus C18 1.8 μm , 2.1 x 50 mm; Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn
	Luna 3u C18(2) 100A 3 μm , 1 x 50 mm, Phenomenex, Aschaffenburg
	Grom-Sil 120, ODS-5 ST, 10 μm , 20 x 250 mm; Grom, Rottenburg-Hailfingen
	Luna 5u C18(2) 100A-Säule, 5 μm , 4.6 x 100 mm; <i>Phenomenex</i> , Aschaffenburg
Massenspektrometer:	QTRAP 2000; Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH, Darmstadt
	QTOF-2; Waters GmbH, Eschborn
	Orbitrap LTQ XL LC-MS; Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen
	Exactive Orbitrap LC-MS; Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen
	6460 Triple Quad LC-MS; Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn
	Agilent 7890A GC System; Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn
Magnetrührer:	MR3000, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Thermocycler:	Labcycler, SensoQuest GmbH, Göttingen
	Primus 96 advanced Gradient; PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
pH-Meter:	pH/Ion 510; Eutech Instruments Pte Ltd, Singapur
Proteingelkammern:	Mini-Protean 3; Bio-Rad Laboratories GmbH, München
	Mini-Protean TetraCell, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Schüttelinkubatoren:	MULTITRON II; Infors GmbH, Einsbach
Spannungsquellen:	PowerPac Basic; Bio-Rad Laboratories GmbH, München
	PowerPac HC; Bio-Rad Laboratories GmbH, München
	PowerPac 1000; Bio-Rad Laboratories GmbH, München
SPE-Säulen	Chromabond C8, 1mL; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

Spülmaschine	Miele Professional G7883, Miele & Co. KG, Gütersloh
Sterilbank:	Holten Safe 2010; Thermo Electron, Dreieich
Tischautoklav:	Sanoclav, LaM-201; Wolf-Sanoclav, Bad Überkingen-Hausen
Taumeltisch:	Polymax 1040 Neigungswinkel 5°; Heidolph, Schwabach
Photometer:	Ultrospec 2100 pro Classic; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Plattenreader	Infinite M200; Tecan, Männedorf, Schweiz
Waagen:	EW 6000-1M; Kern & Sohn GmbH, Balingen XR 125SM; Precisa Instruments AG, Dietikon, Schweiz
Zentrifugen:	Z233MK-2; HERMLE GmbH, Wehingen Tischkühlzentrifuge Z383K; HERMLE GmbH, Wehingen Eppendorf 5810R, Rotoren A-4-81 (4000 rpm, 3220 g); F-34-6-38 (12000 rpm, 18514 g); Eppendorf AG, Hamburg 5415D (Rotor F45-24-11), 5415R (F45-24-11); Eppendorf AG, Hamburg
Zellhomogenisator	Emulsiflex-B15; AVESTIN, Inc, Ottawa, Ontario, Kanada

3.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Adenosine 5'-triphosphat (ATP):	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Acetonitril (<i>HPLC grade</i>):	Acros Organics, Geel, Belgien
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 % / 0.8 %):	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Agarose Broad Range	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ameisensäure (HFO):	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Amicon Ultra -30 K	Millipore GmbH, Schwalbach
Ammoniumperoxodisulfat (APS):	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
5-Brom-4-Chlorindolylphosphat (BCIP):	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Bromphenolblau:	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Cytidin 5'-triphosphat (CTP):	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dinatriummethylenediamintetraessigsäure (EDTA):	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

dNTP-Mix:	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Dithiothreitol (DTT):	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethanol (mit Methylethylketon vergällt):	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethidiumbromid:	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Filterpapier für Western-Blot:	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glukose (D+) wasserfrei:	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Glycerin:	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Glycin (Gly):	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Guanosine 5'-triphosphat Na-Salz (GTP):	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Guanosine 5'-[γ -thio]triphosphate (γ -S-GTP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutathion reduziert	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Hefe-Extrakt:	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
His-Buster Affinity Gel	Amocol Bioprocedures, Teltow
dH ₂ O:	hausinterne Wasserentsalzungsanlage
ddH ₂ O:	membraPure, Bodenheim
Imidazol:	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Isopropanol:	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Methanol (<i>gradient grade</i>):	Acros Organics, Geel, Belgien
Natriumdodecylsulfat (SDS):	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
4-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT):	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED):	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
vorgefärbte Proteinleiter, 10-180 kDa (#SM0671):	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Proteinleiter, 10-200 kDa (#SM0661):	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Protran® Nitrozellulose Transfer	
Membran BA85, 0.45 μ m:	Schleicher & Schuell BioScience, Dassel
Rinderserumalbumin (BSA):	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

ROTIPURAN [®] Eisessig:	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Spectra/Por [®] - MWCO 2000:	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Spectra/Por [®] - MWCO 12-14000:	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Sterilfilter 0.2 µM für Pufferfiltration:	Millipore GmbH, Schwalbach
Thymidin 5'-triphosphat (TTP):	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trichloressigsäure (p.A.) (TCA):	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
TriDye 100 bp DNA Leiter:	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
TriDye 2-log DNA Leiter:	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris):	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Triton X 100:	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Trypton/Pepton aus Casein:	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tween [®] 20:	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien waren analysenreine Reagenzien der Firma Carl-Roth & Co, Karlsruhe.

3.3 Enzyme und Antikörper

Verwendete Enzyme:

DNA-Polymerasen:

Taq-DNA-Polymerase

Herculase II-DNA-Polymerase

RNase A

DNase I

Herkunft:

Qiagen GmbH, Hilden

Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn

Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen

Restriktionsendonukleasen:

NheI, NotI, HindIII, EcoRI

T4- DNA-Ligase

Antarktische Phosphatase

Trypsin

Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

New England Biolabs GmbH, Frankfurt

New England Biolabs GmbH, Frankfurt

New England Biolabs GmbH, Frankfurt

Verwendete Antikörper:

Anti-polyHis-Antikörper

(monoklonaler Antikörper aus der Maus):

Anti-Maus-IgG-Antikörper aus der Ziege

(mit alkalischer Phosphatase konjugiert):

Mouse monoclonal IgM p-Ser-Antikörper

Goat anti-mouse IgM –AP (mit alkalischer

Phosphatase konjugiert):

Herkunft

Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen

Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen

Santa Cruz, Biotechnology, Heidelberg

Santa Cruz, Biotechnology, Heidelberg

3.4 Kit-Systeme

GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit:	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
QIAEX®II Gel Extraction-Kit:	Qiagen GmbH, Hilden
GeneJET™ Gel Extraction Kit:	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
A-Addition-Kit:	Qiagen GmbH, Hilden
pDrive PCR Cloning-Kit:	Qiagen GmbH, Hilden
TOPO TA Cloning®-Kit:	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis-Kit:	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn

3.5 Verwendete Vektoren

Die in dieser Arbeit für die Klonierung und Expression von LabKC verwendeten Vektoren sind in Tabelle 2 aufgelistet. Dabei handelt es sich bis auf den TA-Klonierungsvektor pDrive um Expressionsvektoren, die unter der Kontrolle des T7 Promotors stehen. Nach Insertion eines Gens in die multiple Klonierungsstelle (MCS), erfolgt deren Transkription durch die RNA-Polymerase des Phagen T7. Hierfür sind spezielle *E. coli*-Stämme erforderlich, die eine chromosomale Kopie der T7 RNA-Polymerase besitzen. Die Expression des T7 RNA-Polymerasegens erfolgt unter der Kontrolle eines *lacUV5*-Promotor-Operators und wird durch die Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert. Das zur Unterdrückung der Expression erforderliche Gen für den *lac*-Repressor (*lacI*) liegt auf dem Plasmid und wird konstitutiv exprimiert.^[79]

Tabelle 2: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren.

Vektor	Größe [bp]	Resistenz	Affinitätstag	Beschreibung
pDrive	3851	Amp, Kan	-	TA-Klonierung
pRSET	2803	Amp	<i>N</i> -term. His ₆ -tag	Expression
pET24a(+)	5310	Kan	<i>N</i> -term. T7 Tag <i>C</i> -term. His ₆ -tag	Expression
pET28a(+)	5369	Kan	<i>N</i> -term. His ₆ -tag plus <i>C</i> -term. His ₆ -tag	Expression
pETSumo	5643	Kan	<i>N</i> -term. His ₆ -tag mit Sumo-Domäne	Expression
pGEX-4T-1	~4900	Amp	GST, <i>N</i> -term.	Expression

3.6 Verwendete Größenmarker

Für die Größenabschätzung von DNA-Fragmenten die über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt wurden, wurde der 2-Log Längenstandard der Firma New England Biolabs verwendet (Abbildung 19).

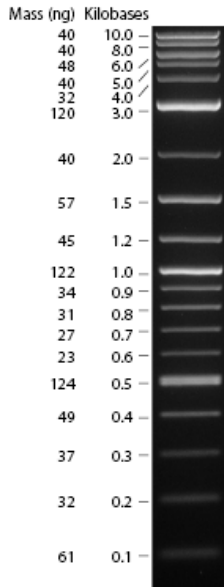


Abbildung 19: Verwendeter 2-Log DNA-Längenstandard.

Als Protein-Marker wurden der *PageRuler™ Unstained Protein Ladder* sowie der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* der Firma Fermentas eingesetzt (Abbildung 20).

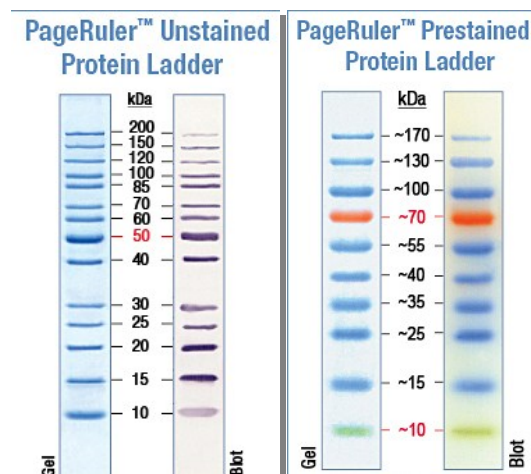


Abbildung 20: Verwendete Proteingrößenmarker.

3.7 Puffer und Lösungen

Die Fertigung von Puffern und Lösungen, die nicht von Firmen bezogen wurden, ist im Folgenden beschrieben. Soweit nicht anders vermerkt, wurden wässrige Lösungen hergestellt, autoklaviert (120 °C, 2 bar, 20 min) und bei Raumtemperatur gelagert. Es wurde stets ddH₂O für die Herstellung verwendet. Puffer für die FPLC-Chromatographie wurden filtriert und bei 5 °C gelagert.

3.7.1 Lösungen für Arbeiten mit DNA

10x DNA-Probenauftragspuffer:	10 mM Tris 5 % Saccharose 0.02 % SDS 0.01 % Bromphenolblau
Ethidiumbromidfärbelsg.:	1 Spatelspitze Ethidiumbromid 200 mL H ₂ O
TAE-Elektrophoresepuffer:	40 mM Tris/HCl 20 mM Natriumacetat 1 mM EDTA pH 7.8
Agarose (1%)	1 % (w/v) Agarose wird in TAE Puffer gelöst, aufgekocht und bei 65 °C aufbewahrt

3.7.2 SDS-PAGE nach Lämmli

Trenngelpuffer:	1.5 M Tris/HCl; pH 8.8
Sammelgelpuffer:	0.25 M Tris/HCl; pH 6.8
10 x Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris 1.9 M Glycin 1 % SDS pH Wert ergibt sich zu 8.9

Probenauftragspuffer: 3.75 mL 1 M Tris/HCl; pH 6.8
 1.2 g SDS
 6 mL Glycerin
 6 mg Bromphenolblau
 ad 13.5 mL H₂O
 kurz vor Verwendung wird 1.5 mL 1 M DTT zugesetzt

APS-Lösung: 100 mg/mL

SDS-Stammlösung: 10 % SDS

Tabelle 3: Zusammensetzung der Gele.

Komponente	Sammelgel (5 %)	Trenngel (12 %)	Trenngel (8 %)
Sammelgelpuffer	3.15 mL	-	-
Trenngelpuffer	-	2.87 mL	5 mL
Acrylamid/Bisacrylamid	1.03 mL	3.8 mL	5.3 mL
dH ₂ O	1.5 mL	4.5 mL	9.3 mL
10% SDS-Stammlösung	60 µL	57.5 µL	200 µL
TEMED	15 µL	28.78 µL	20 µL
APS-Stammlösung	40 µL	230 µL	100 µL

Fixierlösung: 25 mL Isopropanol
 10 mL Essigsäure
 ad 100 mL dH₂O

3.7.3 Gelfärbung mit Coomassie Brilliant Blau

Färbe-Lösung: 0.85 g Coomassie Brilliant Blau G 250
 250 mL Ethanol
 50 mL Eisessig
 ad 500 mL ddH₂O

Entfärbe-Lösung: 100 mL Ethanol
100 mL Eisessig
ad 1 L dH₂O

3.7.4 Western-Blotting

Blot-Puffer: 25 mM Tris
192 mM Glycin
20 % MeOH

Tris-Natriumchlorid-Tween-Puffer

(TNT-Puffer): 20 mM Tris/HCl
500 mM NaCl
0.05 % Tween 20
pH 7.5

Für die Immunodetektion über Alkalische Phosphatase:

Alkalische Phosphatase Puffer

(AP-Puffer): 0.1 M Tris/HCl
0.1 M NaCl
5 mM MgCl₂
pH 9.5

4-Nitrotetrazoliumblau-Lösung

(NTB-Lsg.): 50 mg/mL in 70 % DMF

5-Brom-4-Chlorindolylphosphat-Lösung

(BCIP-Lsg.): 10 mg/mL in 100 % DMF

Färbe-Lösung: 135 µL 4-Nitrotetrazoliumblau-Lösung
300 µL 5-Brom-4-Chlorindolylphosphat-

Lösung

ad 15mL AP-Puffer

Ponceau S-Färbelösung:

0.25 g Ponceau S

0.5 mL Essigsäure

ad 50 mL ddH₂O

3.7.5 Lösungen für Arbeiten mit Proteinen

Puffer für IMAC-Reinigung:

Phosphatpuffer

Lyse-/ Waschpuffer:

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

20 mM Imidazol

1 mM DTT

pH 7.5

Elutionspuffer:

50 mM NaH₂PO₄

300 mM NaCl

250 mM Imidazol

1 mM DTT

pH 7.5

Tris-Puffer

Lyse-/Waschpuffer:

20 mM Tris/HCl; pH 8.2

1 M NaCl

20 mM Imidazol

1 mM DTT

1 mM PMSF

(Anmerkung: Pufferbedingungen wurden in Versuchen variiert, falls nicht anders angegeben wurden obige Parameter verwendet)

Elutionspuffer:

20 mM Tris/HCl; pH 8.2

	1 M NaCl
	250 mM Imidazol
	1 mM DTT
	1 mM PMSF
Puffer für GST-Reinigung:	
Lyse-/Waschpuffer:	1x PBS
Elutionspuffer:	50 mM Tris; pH 8.0
	30 mM GSH reduziert
	100 mM NaCl
	1 mM DTT
Gelfiltrationspuffer	20 mM Tris/HCl (pH je nach Anwendung)
	200 mM NaCl
	1 mM DTT
Dialysepuffer	50 mM Tris/HCl (pH je nach Anwendung)
	200 mM NaCl
	20 % Glycerin
	1 mM DTT
Bradford-Lösung:	100 mg Coomassie Brillant Blau G 250
	100 mL Phosphorsäure (85 %)
	50 mL Ethanol
	ad 1L H ₂ O
10× PBS:	1.4 M NaCl,
	27 mM KCl,
	100 mM Na ₂ HPO ₄
	18 mM KH ₂ PO ₄
	pH 7.3
5 M NaCl	in Wasser gelöst, sterilfiltriert, bei RT gelagert
Tris-HCl (1 M)	1 M Tris HCl mit den pH-Werten 8.0 und 7.5 und 7.0 autoklaviert

3.7.6 Lösungen für Arbeiten mit *E. coli*

IPTG-Stammlösung 1 M IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) in ddH₂O gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert

Für Kryo-Stocks:

Glycerin 87 % Glycerin, autoklaviert

DMSO 10 % DMSO, sterilfiltriert

Lösungen für die Herstellung kompetenter Zellen:

50 und 100 mM CaCl₂, autoklaviert und bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.8 Bakterienstämme

Für die Klonierung und Expression von LabKC wurden die in Tabelle 4 aufgelisteten *E. coli* Stämme verwendet.

Tabelle 4: Zusammenfassung der verwendeten Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ -	Hanahan, 1983 ^[80]
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])	Invitrogen
<i>E. coli</i> Rosetta-gami(DE3)pLysS	Δ (ara-leu)7697 Δ lacX74 Δ phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F' ⁺ [<i>lac</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>pro</i>] gor522::Tn10 trxB pLysSRARE (Cam ^R , Str ^R , Tet ^R)	Novagen

3.9 Nährmedien und Antibiotika

Nährmedien für *E. coli*

Luria-Bertani Medium (LB-Medium)

Trypton/Pepton aus Casein	10.0 g
Hefe-Extrakt	5.0 g
NaCl	10.0 g
	ad 1 L dH ₂ O

TB-Medium

Trypton	12 g
Hefeextrakt	24 g
Glycerin	4 mL
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	12.54 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	2.13 g
	add 1 L dH ₂ O

Sollte für die Selektion plasmidtragender Klone dem Medium noch ein Antibiotikum zugefügt werden, wurden zu 1 L LB-Medium 1 mL einer sterilfiltrierten Stammlösung gegeben. Die Antibiotika-Stammlösungen waren stets 1000-fach konzentriert und wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 5: Zusammenfassung der verwendeten Antibiotika zur Selektion.

Antibiotikum	Abkürzung	Endkonz. [µg/mL]	Lösungsmittel	Hersteller
Ampicillin	Amp	100	H ₂ O	Carl Roth GmbH
Kanamycin	Kan	50	H ₂ O	Carl Roth GmbH
Tetracyclin	Tet		H ₂ O	Carl Roth GmbH
Chloramphenicol	Cm	30	EtOH	Carl Roth GmbH

Alle Antibiotika-Lösungen wurden 1000-fach konzentriert angesetzt, steril filtriert, aliquotiert und bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert.

LB-Agarplatten

Zu 1000 mL LB-Medium wurden 15 g Agar gegeben und autoklaviert. Für das Gießen von Selektivplatten wurde nach dem Autoklavieren gewartet, bis das Medium auf etwa 50 °C abgekühlt war. Anschließend wurden Antibiotika in der entsprechenden Konzentration zugegeben, gemischt und die Platten gegossen.

3.10 Oligonukleotid-Primer

Für die Amplifikation von LabKC Sequenzen mittels PCR wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Primer verwendet.

Tabelle 6: Liste der verwendeten Oligonukleotid-Primer. Eingeführte Änderungen sind Unterstrichen

Name	Sequenz (5'→3')	Kommentar
<i>Klonierung von LabKC in pET24a(+)</i>		
5'STKpET24	TACGA <u>AATTC</u> ATGGATCTGCGGTACCACGC	EcoRI-Schnittstelle
3'STKpET24	ATATCTCGAGCCTCCTCCCCGGGGTCGCGT	XhoI-Schnittstelle
<i>Klonierung von LabKC in pRSET</i>		
5'ST_BglII_N	AGTCAGATCTATGGATCTGCGGTACCACGCCTATG	BglII-Schnittstelle
3'ST_BglII_N	CAGTAGATCTTGCCATGGTGGATGTTACCTCCTC	BglII-Schnittstelle
<i>Klonierung von LabKC in pGEX-4T-1</i>		
5'STKpET24	TACGA <u>AATTC</u> ATGGATCTGCGGTACCACGC	EcoRI-Schnittstelle
3'- LabKC_NotI	AAATATGCGGCCGCGCTCCTCCCCGGGGTCGCGT	NotI-Schnittstelle
<i>Klonierung von Lyase+STK in pET28a(+), pETSumo</i>		
5'LabKC_sumo	TCAGCTAGCATGGATCTGCGGTACCACGCCTATG	NheI-Schnittstelle
3'STK_xho1 stop	<u>CTCGAGTC</u> AGGCGCGCTCGGGCGTGGCCGTGTCG AGGAT	XhoI-Schnittstelle mit Stop-Codon
<i>Primer für ortsgerichtete Mutagenese STK-Domäne</i>		
5'D364N	GTGGTCTTCGGCA <u>AAC</u> CTGCACCCCGGC	Austausch D364N
3'D364N	GCCGGGGTGCAGGTTGCCGAAGACCAC	
5'D382N	ATCGTGTTCTGTC <u>AACT</u> TCGAGCTGGTC	Austausch D382N
3'D382N	GACCAGCTCGAAGTTGACGAACACGAT	
5'N369A	CTGCACCCCGGC <u>GCG</u> ATCATCGTCCGG	Austausch N369A
3'N369A	CCGGACGATGATCGCGCCGGGGTGCAG	
<i>Primer für ortsgerichtete Mutagenese Lyase-Domäne</i>		
K63M_Fw	GACCAGGGCTGGATGATCCATGTGTC	Austausch K63M
K63M_Rv	GACACATGGATCATCCAGCCCTGGTC	
K92M_Fw	GGAAATGCCTTTCATGTTCTGCGCAGC	Austausch K92M
K92M_Rv	GCTGCGCAGGAACATGAAAGGCATTTCC	
R95M_Fw	GAAATGCCTTTCAAGTTCCTGATGAGCAGAAGGA CGTTGCTGGC	Austausch R95M
R95M_Rv	GCCAGCAACGTCCTTCTGCTCATCAGGAACTTGAA AGGCATTTCC	

4 Methoden

4.1 Mikrobiologische Methoden

4.1.1 Vorbereitung von Geräten und Lösungen

Hitzestabile Lösungen, sowie alle Medien wurden 20 min bei 121 °C autoklaviert. Hitzelabile Lösungen hingegen wurden mit einem Spritzenfilter der Porengröße 0.22 µm sterilfiltriert. Glaswaren wurden zur Sterilisation für mindestens vier Stunden bei 160 °C ausgebacken.

4.1.2 Anzucht und Lagerung von *E. coli*-Stämmen

E. coli-Stämme wurden, falls nicht anders angegeben, bei 37 °C in LB-Medium unter Schütteln (150–200 rpm) angezogen. Bei vorhandenem plasmidkodiertem Selektionsmarker wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum aus einer tausendfach konzentrierten Stammlösung zugegeben. Das Wachstum der Zellen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) gegen LB Medium am Photometer verfolgt. Eine OD_{600} von 1 entspricht dabei ca. $3.2 \cdot 10^8$ Zellen/ml. Zur Anzucht von Einzelkolonien wurde die Zellsuspension, z.B. von einem Transformationsansatz, auf den entsprechenden Selektivagarplatten ausgestrichen und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die dauerhafte Lagerung von *E. coli*-Stämmen erfolgte als Glycerinkultur bzw. DMSO-Stock bei -80 °C. Dazu wurden 500 µl einer Übernachtskultur in einem Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel mit 500 µl 87 % Glycerin gemischt und bei -80 °C aufbewahrt. Alternativ wurden 900 µL Zellkultur mit sterilfiltriertem, 10 %igem DMSO versetzt.

4.1.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde auf die $CaCl_2$ -Methode zurückgegriffen. Dabei werden Bakterienzellen mit einer hohen Konzentration an divalenten Kationen bei Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt inkubiert wodurch die Zellwand porös gemacht und damit die Aufnahme von Plasmid-DNA ermöglicht wird. Die genauen molekularen Mechanismen der Porenbildung konnten bisher noch nicht aufgeklärt werden.^[81, 82] Zur Herstellung kalziumkompetenter *E. coli* wurde 100 mL LB-Medium mit einer 16 h alten Vorkultur (1 %) des gewünschten Stammes beimpft und bis zu einer OD_{600} von etwa 0.5 – 0.8 kultiviert (37 °C). Anschließend wurde die Kultur steril auf 50 mL

Falcon-Gefäße aufgeteilt und durch Zentrifugation (10 min; 4200 g) bei 4 °C pelletiert, wobei der Überstand quantitativ verworfen wurde. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis, mit gut vorgekühlten Lösungen durchgeführt. Das Pellet wurde durch vorsichtiges Titrieren in steriler CaCl_2 -Lösung (5 mL; 100 mM) resuspendiert und erneut pelletiert. Nach nochmaliger Resuspension in steriler CaCl_2 -Lösung (40 mL; 50 mM) und 30 minütiger Inkubation auf Eis schloss sich erneut eine Zentrifugation (10 min; 4200 g) bei 4 °C an. Das Pellet wurde schließlich in steriler CaCl_2 -Lösung (1.85 mL; 100 mM) aufgenommen und nochmals für 16 h auf Eis im Kühlraum inkubiert, um so die Kompetenz der Zellen zu verbessern und die Transformationseffizienz zu erhöhen. Anschließend wurden die kompetenten *E. coli* entweder direkt zur Transformation eingesetzt oder nach Zugabe von Glycerin-Lösung (60 %) und Aliquotieren zu je 100 µL zur Lagerung bei -80 °C eingefroren.

4.1.4 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen mit Plasmiden für die Klonierung und Expression verschiedener LabKC-Varianten, wurde in dieser Arbeit auf das Protokoll von Sambrook und Russell zurückgegriffen.^[83] Dabei wurde ein Aliquot chemisch kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2-10 µL eines Ligationsansatzes bzw. 100 ng gereinigter Plasmid-DNA versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 45 s bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen, wodurch der Transfer der Fremd-DNA, der bei 0 °C stattfindet, beendet wird. Nach weiteren 5 min auf Eis folgte die Zugabe von 900 µL LB-Medium ohne Antibiotikum. Zur Ausbildung der Antibiotika-Resistenz wurden die Zellen unter Schütteln für 40 min bei 37 °C inkubiert („kuren“). Anschließend wurden 200 µL einer 1:10 Verdünnung, 200 µL der unverdünnten Zellsuspension sowie die durch Zentrifugation (1 min; 21000 g) pelletierten restlichen Zellen auf LB-Selektivagarplatten ausplattiert und bei 37 °C für 16 h im Brutschrank inkubiert.

4.1.5 Entsorgung von Mikroorganismen

Nicht mehr benötigte *E. coli*-Kulturen, sowie damit in Kontakt gekommene Lösungen und Materialien wurden vor der Entsorgung autoklaviert (20 min bei 121°C).

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

DNA-Konzentrationen in wässrigen Lösungen wurden spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm bestimmt, was dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren entspricht. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die Konzentration von DNA in wässrigen Lösungen proportional zur Absorption bei $\lambda = 260$ nm, eine Absorption von 1 AU entspricht dabei einer Schichtdicke von 1 cm, einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA. Dies ist auch das Maximum des linearen Messbereichs dieser Methode, höher konzentrierte DNA-Lösungen wurden entsprechend verdünnt. Die DNA-Konzentration lässt sich wie folgt berechnen:

$$cdsDNA [\mu\text{g}/\mu\text{L}] = \frac{OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50}{1000}$$

cdsDNA : Konzentration doppelsträngiger DNA

OD_{260} : Absorption bei $\lambda = 260$ nm

Formel 1: Bestimmung der DNA-Konzentration aus der OD_{260}

Die Bestimmung der optischen Dichte kann auch zur Reinheitskontrolle herangezogen werden. Eine reine DNA-Lösung absorbiert dabei nicht oberhalb von 300 nm und weist einen $OD_{260/280}$ -Quotienten von mindestens 1.8 auf. Da Proteine bei $\lambda = 280$ nm ein Absorptionsmaximum haben, wird dieser Quotient bei Proteinkontaminationen deutlich verringert. Neben diesem Quotienten dient auch der $OD_{260/230}$ -Wert zur Charakterisierung der Reinheit der DNA-Lösung, da neben Peptidbindungen auch Tris, EDTA und andere Salze eine Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 230$ nm zeigen. In der Praxis wird außerdem die OD_{320} bestimmt, die zur Hintergrundkompensation verwendet wird. Die Wellenlänge $\lambda = 320$ nm ist hierfür geeignet, da sie weit von den Absorptionsmaxima von DNA und Protein bei $\lambda = 260$ nm bzw. $\lambda = 280$ nm entfernt ist.

Eine grobe Abschätzung der DNA-Konzentration konnte alternativ auch durch Vergleich der Bandenintensität nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA im Agarosegel mit den Banden des DNA-Größenstandards (Abschnitt 4.2.6) erfolgen.

4.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine *in vitro*-Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente.^[84] Sie ermöglicht die selektive

Vervielfachung einer Matrize, auch aus einem komplexen DNA-Gemisch heraus und basiert auf der Anlagerung (*annealing*) und Elongation (*extension*) zweier Primer, die auf gegenüberliegenden Strängen in entgegengesetzter Richtung die Zielregion einer Doppelstrang-DNA flankieren. Die Reaktion besteht je nach Anwendung aus etwa 35 Amplifikationszyklen, die jeweils durch drei Phasen unterschiedlicher Temperatur charakterisiert sind. In der ersten Phase, der Denaturierungsphase, wird die Doppelstrang-DNA durch Erhitzen aufgeschmolzen und somit in Einzelstrang-DNA überführt. Durch das anschließende Absenken der Temperatur in der *annealing*-Phase kommt es zur Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die komplementären Zielregionen der denaturierten Matrizen-DNA. In der Elongationsphase werden dann bei höherer Temperatur die Primer durch eine thermostabile DNA-Polymerase komplementär zur Matrize verlängert. In den aufeinanderfolgenden Amplifikationszyklen kommt es schließlich zu einer exponentiellen Akkumulation der durch die beiden Primer flankierten DNA-Sequenz. Die PCR-Bedingungen wurden im Zuge dieser Arbeit je nach Anforderungen, z.B. Länge und GC-Gehalt der Primer, sowie bei Verwendung unterschiedlicher DNA-Polymerasen, variiert. Da es sich bei den zu amplifizierenden Genen oft um sehr GC-reiche Sequenzen handelte, wurden meist zusätzlich noch Additive in den PCR-Ansatz gegeben, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten zu Klonierungs- und Expressionszwecken wurde die Herculase II DNA-Polymerase eingesetzt. Diese Polymerase besitzt zusätzlich eine 3'→5'-Exonuklease- oder auch *proof-reading*-Aktivität, wodurch fehlerhaft eingebaute Nukleotide wieder korrigiert werden. Diente die PCR lediglich zur Überprüfung erfolgreicher DNA-Integrationen in Vektoren oder zur Kolonie-PCR, so wurde die günstigere Taq-Polymerase verwendet, der die *proof-reading*-Aktivität fehlte.

Repräsentative Reaktionsansätze für die Taq- und Herculase II- Polymerasen sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Standard-PCR-Ansätze mit Taq-Polymerase und Herculase II.

Reagenz	Taq-Polymerase	Herculase II
Puffer	5 µL 10x Puffer	10 µL 5x Puffer
Additiv für GC-reiche Sequenzen	10 µL Q-Solution	1 µL DMSO
Templat	1 µL	1 µL
dNTPs	1 µL	0.8 µL
Primer	je 1 µL	je 1.2 µL
Polymerase	0.25 µL	0.8 µL
H₂O	ad 50 µL	ad 50 µL

Der Ablauf eines Standard-PCR Protokolls ist in Tabelle 8 zusammengefasst. Einzelne Parameter wurden je nach verwendetem Primerpaar und Länge der DNA-Matrize angepasst.

Tabelle 8: Protokoll einer Standard-PCR.

Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1
Denaturierung	95 °C	45 s	} 35
Annealing	je nach Primerpaar	45 s	
Elongation	72 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	72 °C	7 min	1
Lagerung	4 °C	∞	

Die Schmelztemperatur (T_M) und die optimale *annealing*-Temperatur (T_A) eines Primers lässt sich unter Berücksichtigung des GC-Gehalts und der Länge der Primer folgendermaßen berechnen.^[85]

$$T_M = [69,3 + 0,41 \times (\% GC)] - \frac{650}{n}$$

T_M : Schmelztemperatur des Primers [°C]

%GC: relativer molarer GC-Gehalt des Primers

n: Anzahl der Nukleotide des Primers

Formel 2: Berechnung der Schmelztemperatur T_M .

$$T_A = \frac{T_{M1} + T_{M2}}{2} - 3$$

T_A : optimale *annealing*-Temperatur [°C] der Primer 1 und 2

Formel 3: Berechnung der Annealingtemperatur T_A .

Ergaben sich für die einzelnen Primer stark unterschiedliche *annealing*-Temperaturen, so konnte mit Hilfe einer Gradienten-PCR die optimale *annealing*-Temperatur gefunden werden. Dabei wurden in einem PCR-Cycler mit Gradientenfunktion bis zu 12 Ansätze gleichzeitig bei verschiedenen *annealing*-Temperaturen im Bereich des berechneten T_A

amplifiziert. Die Analyse der Produkte auf einem Agarosegel zeigte dann die optimale *annealing*-Temperatur.

Als Alternative zur Gradienten-PCR wurde die Touch-Down PCR verwendet. Hier wird in einem einzigen PCR-Ansatz die *annealing*-Temperatur schrittweise abgesenkt, bis sich bei einer bestimmten Temperatur die Primer an die Template-DNA anlagern können und somit die Zielsequenz in den folgenden Schritten amplifiziert wird.

4.2.3 Kolonie-PCR

Diese analytische Methode diente der Identifizierung von positiven Klonen nach einer Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA. Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR wurden hier ganze Zellen aus Einzelkolonien dem PCR-Ansatz hinzugefügt, welche durch einen auf 10 min verlängerten initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C aufgeschlossen wurden. Dabei wurden die Zellen einer Einzelkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von der Platte genommen und kurz in das PCR-Gefäß mit dem fertigen Ansatz eingetaucht. Die freigesetzte DNA diente im folgenden Amplifikationszyklus als Matrize. Als Oligonukleotide wurden für den pET24a(+)- und pET28a(+)-Vektor die genflankierenden Plasmidprimer T7-Promotor und T7-Terminator. Alternativ konnten auch spezifische Klonierungsprimer verwendet werden.

4.2.4 Ortsgerichtete Mutagenese PCR

Für die Generierung von LabKC-Mutanten mit gezielten Austauschen einzelner Aminosäuren in der Sequenz wurde die ortsgerichtete Mutagenese PCR verwendet. Dabei wurde auf das QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis-Kit der Firma Stratagene, Amsterdam verwendet bzw. dieses Protokoll in abgewandelter Form unter Einsatz der Herculase II-DNA-Polymerase durchgeführt. Die Einführung der gewünschten Mutation erfolgt dabei in einem dreistufigen Prozess auf Nukleotidebene (Abbildung 21).

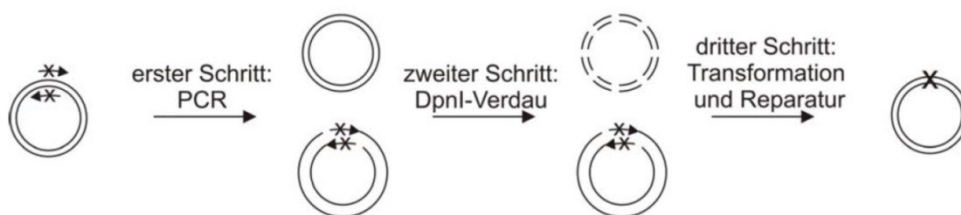


Abbildung 21: Schematische Darstellung zur ortsgerichteten Mutagenese mittels QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis-Kit.^[49]

Im ersten Schritt wird eine Amplifikation des gesamten DNA-Konstruktes unter Verwendung von komplementären Primern die mittig die gewünschte Mutation tragen durchgeführt. Für das optimale Design der Mutagenese-Primer wurde das Programm PrimerX verwendet.^[86] Nach der PCR mit dem mutierten Primerpaar liegen die Einzelstränge um den Primer versetzt vor, was nach der finalen Renaturierung zu einem „Knick“ in den linearen aber trotzdem pseudozirkulär-doppelsträngig vorliegenden Plasmiden führt.^[49] Durch den Verdau mit dem Restriktionsenzym DpnI werden selektiv die methylierten ursprünglichen Plasmide, welche keine Mutation tragen, eliminiert. Anschließend erfolgt die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen mit den pseudozirkulären Plasmiden, welche dann durch cytosolische Enzyme „repariert“ und erneut amplifiziert werden (Abschnitt 4.1.4). Bei erfolgreicher Amplifikation ist in dem so erhaltenen Plasmid der durch den Mutagenese Primer erwünschte Austausch in der Sequenz enthalten. Für die Überprüfung der erfolgreichen Mutagenese wurde Plasmid-DNA isoliert und sequenziert (Abschnitte 4.2.5 und 4.2.11).

Die für diese Arbeit verwendeten Mutagenese-Primer sind in Tabelle 6 aufgeführt. Die Zusammensetzung eines Standard-Mutagenese-Ansatzes sowie der PCR-Reaktionsablauf sind in Tabelle 9 und Tabelle 10 gezeigt.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Mutagenese PCR-Ansätze mit der PfuUltra HF Polymerase.

Reagenz	Volumen
10x Reaktionspuffer	5 µL
Templat	1 µL
dNTPs	1 µL
Primer	1.25 µL
Polymerase	1 µL
H₂O	ad 40.5 µL

Tabelle 10: PCR-Programm für die ortsgerichtete Mutagenese mit mutierten Primern.

Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	30 s	1
Denaturierung	95 °C	30 s	
Annealing	je nach Primerpaar	60 s	12
Elongation	68 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	68 °C	7 min	1
Lagerung	4 °C	∞	

4.2.5 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte in dieser Arbeit mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit der Firma Fermentas. Die Mengen an Zellmaterial die hierbei verwendet wurde, resultierten aus 16 h inkubierten Kulturen und variierten dabei je nach Art des Vektors (*low*- oder *high copy*) und gewünschter Menge. Zu Beginn jeder Reinigung wurden die Zellkulturen standardgemäß mittels Zentrifugation (10 min, 4200 g) bei 4 °C geerntet und der Kulturüberstand verworfen. Die weiteren Schritte zur Isolierung der DNA aus den Zellpellets orientierten sich an den Angaben des Herstellers. Das dabei zugrundeliegende Prinzip beruht auf der alkalischen Lyse von Bakterienzellen, welche durch Zugabe von SDS und NaOH erreicht wird.^[87] Mit Hilfe von RNaseA wird zudem einzelsträngige RNA verdaut und entfernt. Durch die alkalischen Bedingungen kommt es zur vollständigen Denaturierung der genomischen DNA, wobei die doppelsträngige zirkuläre Plasmid-DNA aufgrund seiner Topologie jedoch nicht vollständig voneinander getrennt wird. Nach der Neutralisation durch Zugabe einer sauren Natriumacetat-Lösung wird die zirkuläre Plasmid-DNA wieder renaturiert, im Gegensatz zur genomischen DNA, welche unter Ausbildung von unspezifischen DNA-Knäulen präzipitiert. Durch Zentrifugation kann somit die genomische DNA abgetrennt werden, zusammen mit den aufgrund der hohen Konzentration an Natriumacetat ausgefallenen Protein-SDS-Komplexen. Die weitere Reinigung der Plasmid-DNA beinhaltet die Adsorption der DNA an Silikasäulchen, mehrmaliges Waschen mit entsprechenden Puffer und schließlich die Elution mit 50 µL entionisiertem Wasser, das zuvor bei 65 °C inkubiert wurde. Nach Ermittlung der DNA-Konzentration wurde die Plasmidpräparation anschließend bei -20 °C gelagert.

4.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Analyse und Reinigung von DNA-Fragmenten nach erfolgter PCR, Plasmid-Präparation oder Restriktionsverdau, wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Zur Herstellung der Gele wurde 1 %ige Agarose, in TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und in eine Gelapparatur gegossen. Beim Abkühlen polymerisiert dabei das Polysaccharid unter Ausbildung einer netzartigen Struktur. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden zunächst mit einem Probenpuffer versetzt, der neben einem Farbmarker außerdem zur Erhöhung der Dichte noch Saccharose enthielt. Dadurch sollten mögliche Verluste durch Diffusion in den TAE-Laufpuffer beim Pipettieren in die Geltaschen vermieden werden. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 70 V mit einer Laufzeit von 60 min durchgeführt. Kleine DNA-Fragmente wandern aufgrund ihrer geringen Molekülgröße dementsprechend als erste in Richtung Anode. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen besitzt die DNA ein konstantes Molekulargewicht-zu-Ladungs-Verhältnis. Die Wanderungsgeschwindigkeit in der Agarosegelmatrix ist dabei von der Molekülgröße und der Form (superhelikal, relaxiert, doppelsträngig-linear oder einzelsträngig) der DNA abhängig.^[49] Für die Detektion wurde nach erfolgter Elektrophorese das Gel für 5 bis 10 min in einem Ethidiumbromid-Bad inkubiert. Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes zwischen die Basen der DNA kann diese mittels UV-Licht sichtbar gemacht und analysiert werden. Durch Vergleich mit einem DNA-Längenstandard kann ein Abgleich mit der aufgetrennten DNA durchgeführt werden.

4.2.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel wurden die entsprechenden Banden mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Um Schäden an der DNA zu vermeiden wurde hierbei das Agarosegel nur leicht mit Ethidiumbromid angefärbt und die Zeit der Exposition mit UV-Licht möglichst kurz gehalten. Für die Extraktion der DNA aus der Gelmatrix wurden der QIAEX[®] II Gel Extraction-Kit (Qiagen) und der GeneJET[™] Gel Extraction Kit (Fermentas) verwendet. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden nach den Angaben der Hersteller durchgeführt.

4.2.8 Spaltung von dsDNA durch Restriktionsendonukleasen

Für die spezifische Spaltung von dsDNA wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet, die in der Ziel-DNA innerhalb einer palindromischen Erkennungssequenz schneiden und einzelsträngige Überhänge, so genannte *sticky-ends* mit 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden, erzeugen.^[83, 88] Im analytischen Restriktionsverdau wurden etwa 1 µg

DNA mit 2-10 U Enzym für 2-3 h bei 37 °C inkubiert. Bei einem präparativen Restriktionsverdau wurden 3-10 µg DNA und 10-30 U Enzym eingesetzt. Hier erfolgte die Inkubation über Nacht bei 37 °C. Die käuflich erhältlichen Restriktionsenzyme liegen vorwiegend in einer Konzentration von 10 U/µl vor, wobei ein U definiert ist als die Enzymmenge, die 1 µg DNA in 1 h bei der angegebenen Temperatur in einem 50 µl Ansatz vollständig verdaut. Die Reaktionen wurden in dem jeweils vom Hersteller empfohlenen Puffer durchgeführt. Der Anteil der Restriktionsenzyme im Reaktionsansatz sollte nicht mehr als 10 % des Volumens betragen, da die glycerinhaltige Lösung, in der die Enzyme gelagert werden, deren Aktivität beeinflussen kann. Die Verdauansätze wurden anschließend über Agarosegelelektrophorese analysiert und im Falle einer Klonierung aufgereinigt und für die Ligation eingesetzt. Neben der Kolonie-PCR (Abschnitt 4.2.3) wurde Klonierungen auch über einen analytischen Verdau der präparierten Plasmide überprüft.

4.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Unter Ligation versteht man das Verknüpfen von DNA-Strängen, katalysiert durch das Enzym T4-DNA-Ligase. Hierfür wurden die zuvor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdauten Vektoren und Fragmente in einem abgeschätzten molaren Verhältnis von 1 zu 3 eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 2 U T4-DNA-Ligase und dem entsprechenden Ligationspuffer über 10 h bei 16 °C im Thermocycler. Die T4-DNA-Ligase katalysiert hierbei unter ATP-Verbrauch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'-OH- und den 5'-Phosphat-Enden. Die Ligationsansätze konnten anschließend direkt zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen eingesetzt werden (Abschnitt 4.1.4).

4.2.10 TA-Klonierung und A-Addition

Mittels TA-Klonierung können PCR-Produkte mit A-Überhang direkt in einen bereits linearisierten Vektor mit T-Überhang kloniert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Technik zur Klonierung des *labKC*-Gens in den Klonierungsvektor pDrive sowie in den pETSumo-Vektor für die rekombinante Expression eingesetzt. Während DNA-Polymerasen ohne 3'→5'-Exonukleaseaktivität meist diesen unspezifischen A-Überhang synthetisieren, erzeugen DNA-Polymerasen mit *proofreading*-Aktivität ausschließlich glatte Enden (*blunt ends*). Um die dabei erzeugten PCR-Produkte für die TA-Klonierung auch anwenden zu können, muss man zunächst einen *A-Addition*-Schritt durchführen. In dem verwendeten Kit der Firma Qiagen werden über ein Klenow-Enzym mit dATP die

gewünschten A-Überhänge erzeugt. Die Reaktion wurde gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

Die so erzeugten PCR-Produkte mit A-Überhängen wurden anschließend für die Ligation mit den pDrive- und pETSumo-Vektoren eingesetzt. Zur Berechnung der einzusetzenden DNA-Menge des Inserts wurde Formel 4 herangezogen wobei von 50 ng des Vektors und in der Regel von einem fünffachen molaren Überschuss an Insert ausgegangen wurde.

$$\text{ng Insert} = \frac{50\text{ng} \times \text{Insertgröße bp} \times 5}{\text{Vektorgröße bp}}$$

Formel 4: Berechnung der einzusetzenden Insert-DNA Menge für die TA-Klonierung.

Nach Durchführung der Ligation gemäß Herstellerangaben erfolgte die Transformation von *E. coli* DH5 α -Zellen mittels CaCl₂-Methode (Abschnitt 4.1.4). Bei den Klonierungen in den pDrive-Vektor konnte zum Nachweis einer erfolgreichen Insertion eine Blau-Weiß-Selektion herangezogen werden. Dabei wurde den LB-Agarplatten IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid) und X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galaktosid) zugesetzt. Das Prinzip dieser Selektion beruht darauf, dass die Klonierungsstelle für das Insert in dem lacZ'-Gen des Plasmids liegt, welches für das N-terminale α -Fragment der β -Galaktosidase kodiert. Bei Plasmiden bei denen die Insertion des PCR-Fragments nicht erfolgreich war kommt es zu einer Wechselwirkung mit dem vom Bakterienstamm exprimierten ω -Fragment LacZ Δ M15. Dadurch wird die β -Galaktosidaseaktivität wieder hergestellt. Der Medienzusatz von IPTG zur Induktion und X-Gal als Substrat führen dann zu einer enzymatischen Hydrolyse von X-Gal in Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl, wobei letzteres vom Luftsauerstoff zum tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert wird. Wurde das lacZ'-Gen allerdings durch Insertion eines PCR-Produktes inaktiviert, so bleiben die Klone farblos.^[89] Zusätzlich wurden zur Kontrolle auf eine erfolgreiche Insertion eine Kolonie-PCR und zur Überprüfung der richtigen Orientierung des DNA-Inserts ein Restriktionsverdau mit entsprechenden Endonukleasen durchgeführt (Abschnitt 4.2.3 und 4.2.8).

4.2.11 DNA-Sequenzierung

Die Verifizierung von Nukleotidsequenzen klonierter und mutagenisierter Gene erfolgte über Auftragssequenzierung bei der Firma GATC (Konstanz) bzw. Agowa (Berlin). Zur Auswertung der Sequenzierergebnisse und Abgleich mit der Originalsequenz wurden die Programme Clonemanager und BioEdit verwendet.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Proteinexpression im analytischen Maßstab

Für jede Proteinexpression in *E. coli* wurde zunächst eine Testexpression im analytischen Maßstab in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum als Selektionsmarker durchgeführt. Dazu wurden 5 mL LB-Medium mit einem frisch erzeugten Klon einer Transformation angeimpft und über Nacht bei 160 rpm und 37°C inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurden anschließend 50 mL LB-Selektivmedium auf eine OD₆₀₀ von etwa 0.1 inokuliert und bei 160 rpm und 37 °C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ zwischen 0.6 und 0.8 wurden die Zellen mit anfangs 1 mM IPTG induziert und anschließend bei 37 °C weiter inkubiert. Zur Optimierung der löslichen Expression des rekombinanten Proteins wurden Induktionsmenge, sowie Kultivierungstemperatur und Dauer entsprechend variiert. Nach Ende der jeweiligen Expressionszeit wurden die Kulturen durch Zentrifugation (4200 g, 4 °C, 10 min) geerntet. Das Zellpellet wurde anschließend in Aufschlusspuffer resuspendiert und mittels einer French Press bei einem konstanten Druck von 1000 psi und unter ständiger Kühlung auf Eis aufgeschlossen. Zur Abtrennung der löslichen Fraktion wurde 1 mL des Zellsafts erneut zentrifugiert (20000 g, 4 °C, 20 min) und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 1 ml Aufschlusspuffer gelöst, Aliquots beider Fraktionen mit 2-fach SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Analyse mittels SDS-PAGE (Abschnitt 4.4.1) bzw. Western-Blotting (Abschnitt 4.4.3) erlaubte es, den löslichen und unlöslichen Anteil des rekombinanten Proteins, sowie dessen Integrität abzuschätzen. Sofern die Proben nicht sofort für SDS-PAGE oder Western-Blotting verwendet wurden, erfolgte deren Lagerung bei -20°C.

4.3.2 Proteinexpression im präparativen Maßstab

Zur präparativen Expression wurden je 5 L, auf 37 °C vorgewärmtes LB- bzw. TB-Selektivmedium, mit einer über Nacht angezogenen Vorkultur auf eine OD₆₀₀ von 0.1 angeimpft und bei 37 °C und 160 rpm unter Beobachtung der Zelldichte inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von etwa 0.6 wurden die Zellen durch Zugabe von 0.1 mM IPTG induziert und bei 14 °C im Kühlraum über einen Zeitraum von bis zu 48 h weiter inkubiert. Nach Beendigung der Expression wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (4200 g, 20 min, 4 °C). Nach Verwerfung des Kulturüberstandes wurde das Zellpellet entweder bei -20 °C gelagert oder sofort weiterverarbeitet. Für den Zellaufschluss wurde das Zellpellet in Aufschlusspuffer sorgfältig resuspendiert, wobei jeweils 8 g Pellet in 40 mL Puffer gelöst wurden. Der Lysepuffer enthielt 20 mM Tris, 1 M NaCl, 20 mM Imidazol, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF und pH 8.2. Um die Viskosität nach dem Zellaufschluss aufgrund der freigesetzten genomischen DNA zu verringern, wurde zu 40 mL Zellsuspension eine

Spatelspitze DNase I zugefügt. Der Aufschluss wurde anschließend mit einem Zellhomogenisator der Firma Avestin bei einem konstanten Druck von 1400 bar im Kühlraum durchgeführt. Pro Zyklus konnten 15 mL Zellsuspension aufgeschlossen werden, wobei darauf geachtet wurde, dass alle Materialien und Lösungen eisgekühlt waren. Nach zwei Aufschlussschritten wurde die Suspension anschließend für 20 min bei 20000 g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend für die Proteinreinigung verwendet.

4.3.3 Reinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie basiert auf der spezifischen, reversiblen Wechselwirkung von Proteinen mit an der Säulenmatrix gebundenen, funktionellen Gruppen. Die Elution erfolgt durch kompetitive Verdrängung des Proteins vom matrixgebundenen Liganden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) sowie die GST-Affinitätschromatographie eingesetzt.

4.3.3.1 Glutathion-S-Transferase (GST)-Affinitätschromatographie

Das Reinigungsprinzip der GST-Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen Bindung des mit einer Glutathion-S-Transferase (GST, 26 kDa) fusionierten rekombinanten Proteins an Sepharose-Matrix immobilisiertem Glutathion. Die Elution erfolgt dabei mit reduziertem Glutathion, welches den Liganden aus der Enzymbindetasche verdrängt.

Als GST-Fusionsprotein exprimiertes LabKC wurde nach folgendem Protokoll mit Hilfe eines Äkta Purifier 10 unter Verwendung einer GSTrapTM4B (5 mL) bei 4 °C aufgereinigt.

Verwendete Puffer:

A: Waschpuffer	1x PBS
B: Elutionspuffer	50 mM Tris (pH 8.0); 30 mM GSH reduziert, 100 mM NaCl, 1 mM DTT

Reinigungsschritte:

Äquilibrierung:	4 CV A , Flussrate 0.5 mL/min
Beladen über den <i>Superloop</i> :	10 ml Zelleextrakt, Flussrate 0.1 mL/min
Waschen:	5 CV A ; Flussrate 0.2 mL/min
Elution:	2 CV 5 % B ; Flussrate 0.2 mL/min 5 CV 100 % B ; Flussrate 0.2 mL/min

Es wurden 0.5 ml Fraktionen gesammelt. Die Elution des rekombinanten Proteins wurde über die Absorptionsmessung bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ verfolgt. Die weitere Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte über SDS-PAGE (Abschnitt 4.4.1).

4.3.3.2 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Das Prinzip der IMAC basiert auf der Wechselwirkung von immobilisierten divalenten Kationen mit den Histidin-Seitenketten des His₆-Tags eines rekombinanten Proteins (Abbildung 22).^[90, 91] Am häufigsten werden dabei Ni²⁺-Ionen eingesetzt, die Reinigung kann jedoch im Einzelfall je nach Art des exprimierten Proteins durch Verwendung anderer Kationen wie Co²⁺ oder Cu²⁺ verbessert werden.

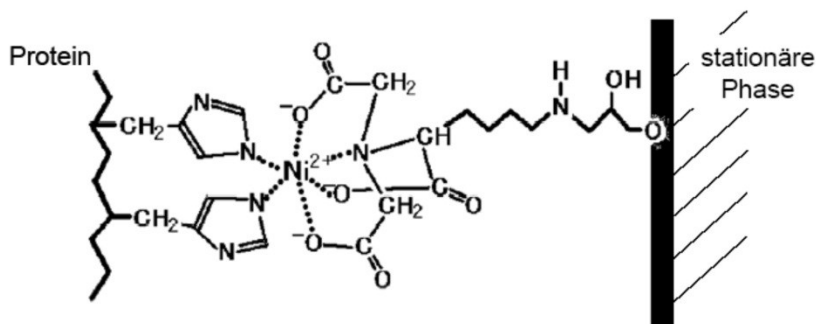


Abbildung 22: Prinzip der IMAC. Über Nitrilotriessigsäure immobilisierte Ni²⁺-Ionen binden die Seitenketten des His-Tags eines rekombinanten Proteins.^[49]

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Reinigung des rekombinant in *E. coli* exprimierten LabKC_{His6}-Proteins zunächst unter Verwendung eines Äkta Purifier 10 Systems und einer HisTrapTMFF-crude Säule (1 mL), wobei sich die Anlage in einem bei 5 °C temperierten Kühltank befand. Der nach dem Zellaufschluss erhaltene lösliche Überstand konnte nach erneuter Zentrifugation bei 20000 g für 20 min direkt auf die Säule geladen werden. Das Reinigungsprogramm wurde dabei von Fall zu Fall angepasst, erfolgte aber generell wie folgt:

Die verwendeten Pufferbedingungen wurden während der Arbeit optimiert, gezeigt sind hier die am häufigsten verwendeten Puffer:

A: Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 1 mM DTT, pH 7.5
B: Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7.5), 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 1 mM DTT

Reinigungsschritte:

Äquilibration:	5 CV A , Flussrate 0.5 mL/min
Beladen über den <i>Superloop</i> :	10 ml Zelleextrakt, Flussrate 0.5 mL/min
Waschen:	10 CV A ; Flussrate 0.5 mL/min
Elution:	2 CV 2 % B ; Flussrate 0.5 mL/min
	2 CV 4 % B ; Flussrate 0.5 mL/min
	5 CV 100 % B ; Flussrate 0.5 mL/min

Nach erfolgter Reinigung wurde die Säule wieder für einen neuen Lauf äquilibriert bzw. in dH₂O, für einen längeren Zeitraum in 20 % EtOH, gelagert.

Da sich die Reinigung von LabKC_{His6} mittels Äkta Purifier als nicht sehr effektiv erwies und die Elutionsfraktionen noch viele Verunreinigungen enthielten, wurde im Laufe dieser Arbeit eine alternative Reinigungsmethode entwickelt.

Im Prinzip sollte durch den Einsatz von Ni-NTA Agarose (His-Buster Affinity Gel, Amocol, Berlin) die Interaktionsdauer der Proteinlösung mit dem Säulenmaterial verlängert werden. Weiterer Vorteil dieser Methode war die Anpassung des Verhältnisses der Menge an Zelleextrakt zur Affinitätsmatrix. Dadurch konnte die unspezifische Bindung von Fremdproteinen verringert werden.

Der Ablauf des sukzessiv optimierten Reinigungsprotokolls beinhaltete folgende Schritte:

Verwendete Puffer:

A: Waschpuffer	20 mM Tris, 1 M NaCl, 20 mM Imidazol, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF, pH 8.2
B: Elutionspuffer	20 mM Tris, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, 0.5mM DTT, 1 mM PMSF, pH 8.2

Reinigungsschritte:

Waschen der Ni-NTA-Agarose:	1x 1.5 mL ddH ₂ O Zentrifugation (2 min, 4000 g)
Äquilibration:	3x 1.5 mL A dazwischen Zentrifugation (2 min, 4000 g)
Inkubation:	40 mL Zellextrakt + 250 µL Ni-NTA-Agarose, 4 h Zentrifugation (2000 g, 2 min, 4 °C)
Waschen:	4x 40 mL A Zentrifugation (2000 g, 2 min, 4 °C)
Elution:	jeweils 200 µL B Zentrifugation (2 min, 4000 g)

Die Inkubation des Zellextraktes mit der Ni-NTA-Agarose erfolgte in einem 50 mL Reaktionsgefäß bei 4 °C im Kühlraum. Der Inkubationsansatz wurde dabei über einen Reagenzglasrotator durchmischt, um eine Sedimentation der Affinitätsmatrix zu unterbinden. Für die Elution des gebundenen Proteins wurde das Säulenmaterial aufgrund der leichteren Handhabung in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Hierbei wurde die Ni-NTA-Agarose jeweils direkt mit 200 µL Elutionspuffer durchmischt, abzentrifugiert und der Überstand mit dem eluierten Protein vorsichtig abpipettiert. Der Elutionsverlauf wurde dabei über einen Farbumschlag mittels Bradfordreagenz verfolgt. Hierzu wurden zu 10 µL Bradfordreagenz in einer Mikrotiterplatte je 10 µL der Elutionsfraktionen pipettiert. Fraktionen mit eluiertem Protein zeigten dabei eine tiefe Blaufärbung. Proben der einzelnen Elutionsfraktionen sowie des Zelllysates wurden zudem mittels SDS-PAGE analysiert (Abschnitt 4.4.1).

Bei Aufreinigungen im analytischen Maßstab, z.B. für die Optimierung der Pufferauswahl, wurden die Volumina entsprechend den Mengen an Zelllysate angepasst.

4.3.4 Dialyse von Proteinlösungen

Die vereinigten Elutionsfraktionen wurden nach der chromatographischen Reinigung gegen mindestens ein 100-faches des Probenvolumens an gewähltem Puffer dialysiert. Vor allem nach der Verwendung der IMAC-Affinitätschromatografie ist eine Dialyse zur Entfernung des überschüssigen Imidazols notwendig. Dazu wurden die Proben in einem zuvor mit EDTA ausgekochten und in Pufferlösung äquilibriertem Dialyseschlauch (Carl Roth) mit einer molekularen Ausschlussgrenze von 14 kDa unter Rühren für ca. 16 h bei 4 °C dialysiert. Die in der Probe als Verunreinigungen vorhandenen niedermolekularen Substanzen können dabei die semipermeable Membran passieren, während das rekombinante Protein zurückgehalten wird.

4.3.5 Einkonzentrieren von Proteinlösungen

Aufgereinigte Proteinlösungen wurden mit Hilfe der Amicon Ultra-30K Zentrifugenröhrchen (Millipore) über eine semipermeable Membran nach Herstellerangaben durch Zentrifugation (4200 g, 4 °C) einkonzentriert. Die Dauer der Zentrifugation richtete sich nach dem Ausgangsvolumen, der zu konzentrierenden Proteinlösung und dem gewünschten Endvolumen.

4.3.6 Proteinreinigung mit Größenausschlusschromatographie (SEC)

Für die Reinigung von rekombinantem LabKC wurde die Größenausschlusschromatographie als zweiter Schritt nach der IMAC angewendet. Bei dieser Reinigungstechnik können Biomoleküle ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Während kleine Moleküle in die Poren des Gels diffundieren und dort verbleiben können, ist das Porenvolumen für größere Moleküle weniger zugänglich. Folglich eluieren Proteine mit einem hohen Molekulargewicht zuerst, gefolgt von Proteinen mit geringerer Größe. In Folge der Reinigung eines rekombinanten Proteins wird die SEC häufig als zweiter Reinigungsschritt verwendet, um noch vorhandene Verunreinigungen vom Zielprotein abzutrennen („*polishing*“). Für die Gelfiltrationsläufe mit LabKC wurde ein Äkta Purifier 10 System mit einer Superdex™200 Säule verwendet (GE Healthcare). Die bereits vorgereinigte Proteinlösung wurde kurz vor dem Lauf nochmals für 20 min (20000 g; 4 °C) abzentrifugiert, um noch vorhandene unlösliche Bestandteile zu entfernen.

Die Reinigung über SEC umfasste folgende Schritte:

Verwendete Puffer:

A: Gelfiltrationspuffer 20 mM Tris, 250 mM NaCl, 0.5 mM DTT, pH 7.5

Reinigungsschritte:

Entfernung von 20 % EtOH 2 CV ddH₂O

Äquilibration: 2 CV A, Flussrate 0.5 mL/min

Beladen über Probenschleife: 100 µL Proteinlösung, Flussrate 0.5 mL/min

Gelfiltrationslauf: 2 CV A; Flussrate 0.5 mL/min

Spülen: 2 CV ddH₂O; Flussrate 0.5 mL/min

Lagerung: 2 CV 20 % EtOH; Flussrate 0.2 mL/min

Es wurden Elutionsfraktionen nach Detektion des Proteins bei $\lambda = 280$ nm in Fraktionen von 0.5 mL gesammelt.

4.3.7 Reinigung von Peptiden mit Größenausschlusschromatographie

Analog zur Reinigung von Proteinen wurden auch chemisch synthetisierte Peptide mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie gereinigt. Hierfür wurde eine SuperdexTMPeptide 10/300 GL Säule, gekoppelt an ein Äkta Purifier 10 System, verwendet. Als Laufpuffer diente 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 8.5. Für jeden Lauf wurden zwischen 5 und 10 mg Peptid, gelöst in 50 mM Tris pH 8.5, eingesetzt. Die verwendeten Parameter entsprachen dem unter Abschnitt 4.3.6 aufgeführten Reinigungsprotokoll. Während des Laufes wurden Fraktionen zu je 0.5 mL gesammelt, wobei die Detektion bei $\lambda = 280$ nm erfolgte. In Fällen, in denen keine aromatischen Aminosäuren in der Sequenz vorhanden waren, wurde bei $\lambda = 214$ nm fraktioniert/detektiert.

4.3.8 Präparative RP-HPLC-Trennungen

Präparative RP-HPLC Trennungen wurden mit einer HPLC-Anlage der 1100-Serie von Agilent Technologies durchgeführt, ausgestattet mit einem DAD-Detektor und unter Verwendung einer RP-C₁₈-Säule (Grom-Sil 120, ODS-5 ST, 10 µm, 20 x 250 mm). Als Lösungsmittel wurden ddH₂O + 0.1 % HFo (LM A) und ACN + 0.1 % HFo (LM B) mit einer Flussrate von 15 ml/min eingesetzt. Der in Tabelle 11 aufgeführte standardmäßig verwendete Gradient, wurden in einzelnen Fällen je nach zu trennendem Peptid angepasst. Die Detektion und Fraktionierung erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm bzw. bei $\lambda = 210$ nm bei Peptiden ohne aromatische Aminosäuren.

Tabelle 11: Verwendeter Gradient für präparative RP-HPLC Trennungen.

Zeit [min]	% LM B
0	20
30	50
30.1	100
36	100
36.1	20
40	20

4.4 Analytische Methoden

4.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (denaturierende PAGE) ist eine analytische Methode für die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülgröße im elektrischen Feld.^[92] Da Proteine im Gegensatz zur DNA ganz unterschiedliche Nettoladungen aufweisen können, bedient man sich des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS), welches sich über hydrophobe Wechselwirkungen an die Proteine anlagert und diese denaturiert. In einer 1 %-igen SDS-Lösung binden dabei 1.4 g SDS an 1 g Protein, resultierend in einem konstanten Masse-zu-Ladungs-Verhältnis. Somit ist es möglich, alle Proteine in Richtung Anode aufzutrennen, wobei die Trennung nur noch von der Größe des Proteins abhängt.

Polyacrylamidgele werden dabei durch die radikalische Co-Polymerisation zwischen Acrylamid und dem Quervernetzer *N,N'*-Methylenbisacrylamid erzeugt, gesteuert durch den Radikalstarter Ammoniumperoxodisulfat (APS) und den Radikalüberträger Tetramethylethyldiamin (TEMED). Die Größe der hierbei ausgebildeten Poren richtet sich nach den Anteilen des eingesetzten Acrylamid und *N,N'*-Methylenbisacrylamid. Somit kann über die Porengröße der gewünschte Trennbereich eingestellt werden, wobei mit dem Sammel- und Trenngel zwei verschiedene Gelzonen verwendet werden. Im Sammelgel liegt ein diskontinuierliches Puffersystem vor bestehend aus Tris/Chlorid (pH 6.8) und Tris/Glycin (pH 8.9) des Laufpuffers.

Nach dem Auftragen der Proben auf das Sammelgel und dem Anlegen der Spannung liegt Glycin im Sammelgel ungeladen vor, da der pH-Wert des Sammelgels seinem isoelektrischen Punkt in etwa entspricht und es dementsprechend mit geringer Mobilität im Gel wandert. Im Gegensatz dazu haben die Chlorid-Ionen unter diesen Bedingungen eine hohe elektrophoretische Mobilität und wandern entsprechend voraus. Die in der Probe enthaltenen Proteine wandern aufgrund ihrer elektrophoretischen Mobilität zwischen den Chlorid und Glycin-Ionen. Dadurch bildet sich ein Feldstärkegradient aus, wodurch die Protein-SDS-Komplexe in Richtung Anode sortiert und gestapelt werden. Bei Kontakt mit dem engmaschigeren Trenngel erfahren die Proteine augenblicklich einen großen Reibungswiderstand, der zu einer weiteren Aufkonzentrierung und Fokussierung führt (*stacking*). Glycin ist aufgrund seiner Größe davon nicht betroffen, überholt die Proteine und beendet damit das Elektrophoreseprinzip der Isotachophorese. Zudem liegen im Trenngel (pH 8.8) liegen die Glycin-Moleküle geladen vor und sorgen dadurch für eine konstante Feldstärke, so dass jetzt eine Auftrennung der Proteine nach dem Prinzip der Zonelektrophorese erfolgen kann. Durch die Verwendung von SDS besteht über einen weiten Größenbereich eine lineare Beziehung zwischen dem dekadischen Logarithmus ($\log_{10}$) des Molekulargewichts und der relativen Wanderungsdistanz im Gel.

Die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Gele ist in Abschnitt 3.7.2 aufgeführt. Der Zusammenbau der Gelapparatur erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dabei wurde das Trenngel zuerst gegossen und sofort mit Isopropanol überschichtet um eine Oxidation mit Luftsauerstoff zu vermeiden. Nach ausreichender Polymerisation wurde das Isopropanol zunächst quantitativ entfernt und anschließend das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet.

Daraufhin wurden die zu analysierenden Proteinproben zunächst 1:1 mit DTT-komplettierten Probenauftragspuffer versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Sollten direkt stark konzentrierte Zellextrakte aufgetrennt werden, so wurde die Inkubationsdauer auf 15 min erweitert. Die Elektrophorese erfolgte bei 15 mA/Gel im Sammelgel und 20 mA/Gel im Trenngel. Anschließend wurden die Gele entweder mittels Coomassiefärbung oder Western-Blotting ausgewertet.

4.4.2 Färbung der SDS-Gele mit Coomassie Brilliant Blue G250

Der am häufigsten eingesetzte Farbstoff zur Färbung von Proteingelen ist Coomassie Brilliant Blue G250 mit einer Nachweisgrenze zwischen 100 ng und 1 µg. Dabei bindet der Triphenylmethanfarbstoff unspezifisch an hydrophobe Seitenketten der Aminosäuren. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele hierzu für mindestens 1 h in der Färbelösung geschwenkt. Im Anschluss wurde unspezifische Färbung durch Inkubation mit Entfärbelösung bzw. dreimaliges Aufkochen in Wasser mittels einer Mikrowelle entfernt. Die Gele wurden anschließend gescannt und für eine längere Aufbewahrung getrocknet.

4.4.3 Western-Blotting und Immunodetektion

Unter Western-Blotting versteht man den Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine Membran mit anschließendem immunologischem Nachweis.^[93] In dieser Arbeit wurde ein *Semi-Dry*-Verfahren angewendet, wobei Proteine auf eine PVDF- bzw. Nitrozellulose-Membran mittels Elektroblob transferiert werden. Nach erfolgter SDS-PAGE (Abschnitt 4.4.1) wurde dazu das Gel zunächst für 20 min zusammen mit der Membran und den Filterpapieren in Blot-Puffer inkubiert. Anschließend wurde das Blot-Paket entsprechend Abbildung 23 aufgebaut und vorhandene Luftblasen durch Abrollen mit einer Pasteurpipette entfernt.

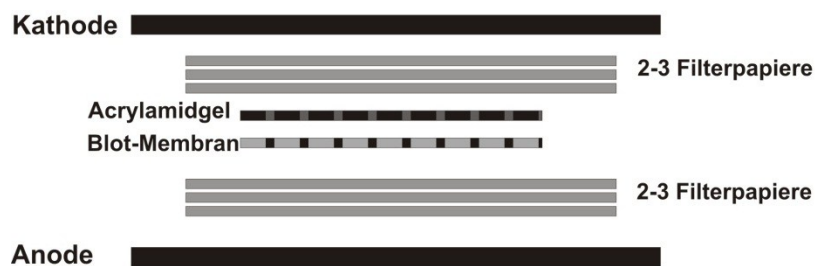


Abbildung 23: Schematischer Aufbau eines Semi-Dry-Blots.

Die Blotbedingungen wurden nach der Faustregel (0.8 mA/cm^2) abgeleitet und ergaben sich so zu einer konstanten Stromstärke $I = 50 \text{ mA}$ (Dauer 60 min). Nach Beendigung des Transfers wurde die Blotmembran im Falle einer anschließenden Analyse mittels *N*-terminaler Sequenzierung für 5 min mit Ponceau S gefärbt und mit ddH₂O wieder entfärbt. In den meisten Fällen folgte jedoch die Immundetektion mit einem spezifischen Antikörper. Um eine unspezifische Bindung des primären Antikörpers zu vermeiden, wurde die Membran zunächst für 1 h in mit BSA (0.8 g) komplettiertem TNT-Puffer (25 ml) gesättigt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte in einer Lösung mit 3 % BSA komplettiertem TNT-Puffer (30 ml) über einen Zeitraum von 16 h auf einem Taumeltisch bei 4 °C. Die Verdünnungen der eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Nach möglichst quantitativer Entfernung der Antikörperlösung wurde die Membran für 3x 10 min jeweils mit TNT-Puffer (30 ml) gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, ebenfalls in TNT-BSA-Puffer für 90 min bei RT.

Tabelle 12: Zusammenfassung der eingesetzten Antikörper und Konzentrationen.

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Anti-His-Antikörper	1:1000	Anti-Maus-IgG aus der Ziege	1:4000
Anti p-Ser-IgM	1:1000	Anti-Maus-IgM- aus der Ziege	1:4000

Nach Beendigung der Inkubation wurde die Lösung erneut entfernt und 3x mit TNT-Puffer (30 ml) für 5 min gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion über die an den Sekundär-Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase. Dieses Enzym dephosphoryliert dabei das Substrat BCIP, wobei in Verbindung mit NTB eine tiefblaue Indigo-Färbung entsteht. Hierzu wurde der Blot in 15 mL AP-Puffer auf einem Taumeltisch inkubiert. Der Fortschritt der Färbung wurde verfolgt und bei ausreichender Bandenintensität durch Zugabe von dH₂O gestoppt. Nach mehrmaligem Waschen mit dH₂O wurde die Blotmembran gescannt und dokumentiert.

4.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-Absorptionsspektroskopie

Die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, sowie Cysteine (Disulfidbrücken) absorbieren UV-Licht im Bereich von $\lambda = 250\text{-}300\text{ nm}$. Nach Pace *et al.* kann aus der Aminosäuresequenz der molare Extinktionskoeffizient bei $\lambda = 280\text{ nm}$ (ϵ_{280}) und bei bekanntem Molekulargewicht der spezifische Extinktionskoeffizient ($^{0.1\%}A_{280}$) berechnet werden:^[94]

$$\epsilon_{280} = \sum Trp \times 5500 + \sum Tyr \times 1490 + \sum Cystine \times 125$$

Formel 5: Berechnung des molaren Extinktionskoeffizienten.

$$^{0.1\%}A_{280} = \frac{\epsilon_{280}}{MW}$$

ϵ_{280} : molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]

$^{0.1\%}A_{280}$: spezifischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [$\text{cm}^2 \text{mg}^{-1}$]

MW : molare Masse des Proteins [$\text{g} \times \text{mol}^{-1}$]

Formel 6: Berechnung des spezifischen Extinktionskoeffizienten.

Unter Verwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes kann daraus die Proteinkonzentration berechnet werden:

$$c = \frac{A_{280}}{d \times ^{0.1\%}A_{280}}$$

c : Konzentration [$\text{mg} \times \text{ml}^{-1}$]

A_{280} : Absorption bei 280 nm

d : Schichtdicke der Küvette [cm]

Formel 7: Berechnung der Proteinkonzentration.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde ein Spektrum der Proteinlösung in einem Wellenlängenbereich von $\lambda = 240\text{-}340\text{ nm}$ aufgenommen, wobei das Absorptionsmaximum sich idealerweise bei $\lambda = 280\text{ nm}$ befindet. Der Quotient A_{280}/A_{250} sollte mindestens 1.8 betragen und es sollte keine Absorption oberhalb von $\lambda = 300\text{ nm}$ auftreten, da diese auf durch Aggregatbildung hervorgerufene Lichtstreuung hindeutet. In Tabelle 13 sind die molaren und spezifischen Extinktionskoeffizienten, sowie das berechnete Molekulargewicht verschiedener LabKC-Varianten aufgelistet. Die Parameter wurden mithilfe der servergestützten Software *Protparam* bestimmt.^[95]

Tabelle 13: Molekulargewicht, pI-Wert, Anzahl der Aminosäuren sowie molarer (ϵ_{280}) und spezifischer ($^{0.1\%}A_{280}$) Extinktionskoeffizient verschiedener LabKC-Varianten.

Konstrukt	MW	Aminosäuren	pI	ϵ_{280}	$^{0.1\%}A_{280}$
	[g mol ⁻¹]			[M ⁻¹ cm ⁻¹]	[cm ² mg ⁻¹]
LabK _{His6}	97787.3	886	5.77	139230	1.424
GST-LabKC	122031.6	1095	5.71	182090	1.492
Sumo-Lyase-STK	70621.6	628	5.31	95800	1.357
_{His6} Lyase-STK	59431.1	529	5.47	94310	1.587

4.4.5 Circular dichroismus-Spektroskopie

Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) ist eine spezielle Form der UV/Vis-Spektroskopie, die auf Wechselwirkungen von zirkular polarisiertem Licht mit optisch aktiven Substanzen, wie Proteinen, beruht. Diese besitzen unterschiedliche Brechungsindizes für rechts- und linkszirkular polarisiertes Licht, welche zu unterschiedlichen Verzögerungen beim Durchgang des Lichts durch die Lösung und somit zu einer Phasenverschiebung ϕ führen. Weiterhin unterscheiden sich bei optisch aktiven Verbindungen die Extinktionskoeffizienten für rechts- und linkszirkular polarisiertes Licht, wodurch beim Durchgang der Lösung elliptisch polarisiertes Licht entsteht. Diese Elliptizität (Θ_{obs}) wird bei CD-Messungen als Signal verwendet. Die CD-Spektroskopie eignet sich besonders für die Untersuchung von Proteinkonformationen. Die Absorption im Wellenlängenbereich von $\lambda = 170$ bis 250 nm (Fern-UV CD) wird hauptsächlich von den Peptidbindungen bestimmt, so dass dieser Teil des Spektrums Aussagen über die Sekundärstruktur ermöglicht. Die verschiedenen Sekundärstrukturelemente wie α -Helix, β -Faltblatt oder *random-coil* besitzen sehr deutlich ausgeprägte Fern-UV CD-Spektren.^[96, 97] Die Summe der Signale bildet das charakteristische Spektrum eines Proteins, wobei das Signal der α -Helices das der anderen Strukturelemente dominiert. Als charakteristische Merkmale eines Fern-UV-CD-Spektrums gelten Maximum, Nulldurchgang und Minimum (Abbildung 24).

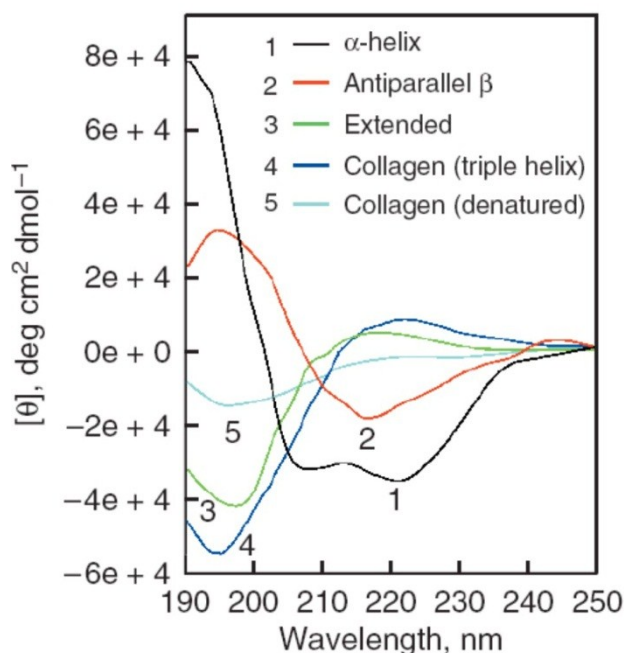


Abbildung 24: CD-Spektren von Polypeptiden und Proteinen mit repräsentativen Sekundärstrukturen.^[97]

Die Aufnahme von CD-Spektren erfolgte mit einem J715 CD-Spektrometer von Jasco (Gross-Umstadt) und einer Präzisions-Küvette aus Quarzglas SUPRASIL® (Schichtdicke: 1 mm) der Firma Hellma bei Raumtemperatur. Dabei wurden folgende Parameter verwendet:

- Wellenlängenbereich: $\lambda = 185 \text{ nm} - 260 \text{ nm}$
- Wellenlängenintervall: 0.5 nm
- Scangeschwindigkeit: 50 nm/min
- Bandweite: 1 nm
- Anzahl der Wiederholungsmessungen: 5

Jedes Spektrum wurde geglättet (Savitsky-Golay *smoothing*, *smoothing window 15 points*) und anschließend Leerwert-korrigiert (*blank*: ddH₂O bzw. X % TFE/ddH₂O). Die Umrechnung der gemessenen Elliptizität θ [mdeg] in die molare Elliptizität $[\Theta]$ erfolgte mit folgender Formel:

$$[\Theta] = \frac{\theta}{10 \cdot c \cdot l} \quad \text{mit } l = \text{Schichtdicke der Küvette in [cm]} \text{ und } c = \text{Konzentration in [mol/l]}$$

$$\text{Damit ergibt sich als Einheit für } [\Theta]: \left[\frac{\text{deg} \cdot \text{cm}^2}{\text{dmol}} \right]$$

Formel 8: Umrechnung der gemessenen Elliptizität in die molare Elliptizität.

4.4.6 N-terminale Sequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung von Proteinen wurde für die Identifizierung von charakteristischen Nebenprodukten in Folge der Proteinreinigung von LabKC durchgeführt. Das Prinzip beruht auf dem von Pehr Edman entwickelten Reaktionszyklus zur schrittweisen Abspaltung von Aminosäuren.^[98] Zunächst wird dabei die freie N-terminale Aminosäure mit Phenylisothiocyanat (PITC) unter alkalischen Bedingungen umgesetzt. Anschließend erfolgt unter sauren Bedingungen die Abspaltung dieser PTC-(Phenylthiocarbamoylderivat) markierten Aminosäure. Nach der Umwandlung in ihre PTH(Phenylthiohydantoin)-Aminosäure kann diese über ein chromatographisches Verfahren identifiziert werden. Der Edman-Zyklus wird mit dem Restprotein mehrfach wiederholt, wodurch die N-terminale Aminosäuresequenz bestimmt werden kann.^[99]

Zur Vorbereitung wurden Fraktionen aus LabKC-Aufreinigungen über ein SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet (Abschnitte 4.4.1 und 4.4.3.). Die Blotmembran wurde anschließend mit Ponceau-S gefärbt und die gewünschten Proteinbanden mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten. Die Sequenzierung wurde anschließend bei der Firma Proteome Factory AG (Berlin) an einem *Model 491 Procise Edman Sequencer* (Applied Biosystems) mit einem online ABI Model 140C PTH Amino Acid Analyser mit insgesamt 6 Abbauzyklen durchgeführt.

4.4.7 LabKC Enzym-Assay

Enzymatische Umsetzungen mit gereinigtem LabKC wurden in 1.5 mL Reaktionsgefäßen durchgeführt und waren wie folgt zusammengesetzt. Puffer, Co-Substrate, MgCl_2 und DTT wurden als Stammlösungen angesetzt und zusammen mit gereinigtem Peptid und Enzym in einem Gesamtvolumen von 50 μL inkubiert. Im Zuge dieser Arbeit wurden die Ansätze hinsichtlich verwendeter Pufferkomponenten, Pufferkonzentration, pH-Wert, Inkubationsdauer und anderer Faktoren variiert und optimiert. Die Bestandteile einer typischen Umsetzung mit LabKC sind exemplarisch in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Exemplarische Zusammensetzung einer enzymatischen Umsetzung mit LabKC.

Stammlösung	Volumen	Endkonzentration
7 μM LabKC _{His6}	5 μL	0.7 μM
100 μM Peptidlsg.	5 μL	10 μM
200 mM TES pH 7.0	5 μL	20 mM
100 mM MgCl_2	5 μL	10 mM
50 mM GTP	2 μL	2 mM
50 mM DTT	1 μL	1 mM
ddH ₂ O	ad 50 μL	

Nach Zugabe des Enzyms wurden die Ansätze für mindestens 2 h bei 28 °C im Thermomixer inkubiert. Parallel wurden entsprechende Kontrollen ohne Enzym bzw. ohne Co-Substrat durchgeführt. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 % MeOH gestoppt und die Proben wie unter Abschnitt 4.4.9 beschrieben für die folgende Analytik mittels LC-MS vorbereitet.

4.4.8 Proteaseverdau mit Trypsin

Trypsin gehört zu den Serinproteasen und spaltet Peptidketten spezifisch C-terminal von basischen Lysin- und Argininseitenketten. In der vorliegenden Arbeit wurde Trypsin zur selektiven Abspaltung des LabA2 Leaderpeptids eingesetzt, um die Molekülgröße für die nachfolgende LC-MS- und LC-MS/MS- Analytik zu verringern. Hierzu wurde ein Aliquot des Herstellers mit 25 μg lyophilisierten Trypsin standardgemäß in 100 μL ddH₂O gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Für den Peptidverdau wurden 2.5 μL dieser Trypsinlösung mit 50 μL des Enzym-Assays für 2 h bei 37 °C inkubiert.

4.4.9 Probenvorbereitung für LC-MS-Messungen

Ansätze mit LabKC-Umsetzungen und tryptischen Verdau wurden vor der LC-MS-Analytik mit 50 μ L MeOH versetzt und für 10 min bei 20000 g abzentrifugiert. Damit sollten Proteine ausgefällt werden, während Peptide unter diesen Bedingungen in Lösung blieben. Die Überstände konnten anschließend direkt mittels LC-MS vermessen werden. Sollten Peptidlösungen nach enzymatischer Umsetzung noch weiter gereinigt und aufkonzentriert werden, wurde zunächst eine Festphasenextraktion durchgeführt (SPE). Hierfür wurden Chromabond C8 Säulen des Herstellers Macherey-Nagel verwendet. Bei der Reinigung wurden Fraktionen zu je 0.5 mL nach folgendem Protokoll gesammelt:

Tabelle 15: Reinigungsprotokoll für Festphasenextraktion.

Schritt	MeOH [%]	ddH ₂ O [%]	Volumen [ml]	SPE-Fraktionen
Konditionierung	100	0	1	-
Äquilibration	0	100	1	-
Probenauftragung	-	-	bis zu 2	Durchlauf
Waschschritt	0	100	2x 0.5	0 % MeOH
Elution	20	80	2x 0.5	20 % MeOH
Elution	40	60	2x 0.5	40 % MeOH
Elution	60	40	2x 0.5	60 % MeOH
Elution	80	20	2x 0.5	80 % MeOH
Elution	100	0	2x 0.5	100% MeOH

Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend über LC-MS analysiert, die gewünschten Fraktionen gepoolt und mittels Gefriertrocknung oder Evaporation eingengt.

4.4.10 LC-ESI-MS Messungen

Die Analyse der enzymatischen Umsetzungen mit LabKC erfolgte über LC-ESI-MS Messungen. Hierbei wurden die zu analysierenden Proben zunächst mittels *reversed phase* Chromatographie unter Verwendung verschiedener Säulentypen auf C18-Basis aufgetrennt. Die jeweiligen HPLC-Geräte waren je nach erforderlicher Analytik an die in Tabelle 16 aufgeführten MS-Systeme gekoppelt unter Anwendung der in Tabelle 17 gezeigten Gradienten. Die Ionisierung des Analyten erfolge dabei bei allen Geräten durch Elektrospray Ionisation (ESI). Dabei wird unter Atmosphärendruck und unter Anlegen von Hochspannung die aus der HPLC kommende Analytlösung in der Quelle des

Massenspektrometers ionisiert. Aufgrund der großen Molekülmasse der eingesetzten Substratpeptide von bis zu 4200 Da wurden die Messungen der Reaktionsansätze nach direkter Inkubation mit LabKC auf Massenspektrometern mit einem hohen Auflösungsvermögen durchgeführt. Dabei konnten die Lab-Peptide aufgrund der in der Sequenz vorhanden basischen Ladungsträger unter den gegebenen LC-Bedingungen als mehrfach geladene Ionen im positiven *Scan*-Modus eindeutig identifiziert werden. Die beobachteten Massendifferenzen für relevante Modifizierungen sind in Tabelle 18 aufgelistet.

Tabelle 16: Übersicht über die verwendeten Massenspektrometer und HPLC-Systeme, sowie deren Anwendung.

Massenspektrometer	HPLC-System	Anwendung
QTrap2000	Agilent 1100 Kapillar-HPLC	LC-MS/MS
Q-Tof2	Agilent 1200	LC-MS
Orbitrap LTQ XL	Agilent 1200	Hochauflösendes LC-MS, LC-MS/MS
Exactive Orbitrap	Agilent 1200	Hochauflösendes LC-MS
6460 Triple Quad LC-MS	Agilent 1290 UHPLC	LC-MS/MS

Tabelle 17: Verwendete Gradienten bei der *reversed phase* Auftrennung enzymatischer Reaktionsansätze (B = ACN+0.1% HFO).

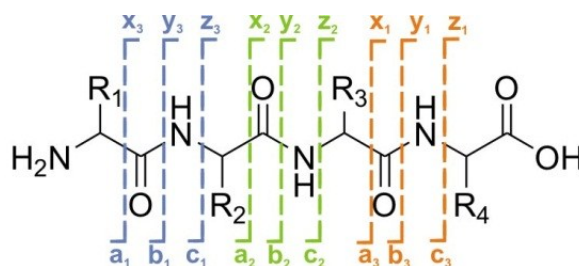
Gradient für LC-MS Q-ToF-2:						
Zeit[min]:	0	8	10	10.1	15	
B [%]:	5	100	100	5	5	
Gradient für LC-MS Q-Trap2000:						
Zeit[min]	0	10	13	13.1	15	
B [%]	5	100	100	5		
Gradient für LC-MS Orbitrap Exactive:						
Zeit[min]	0	2	12	15	15.01	20
B [%]	20	20	100	100	20	20
Gradient für LC-MS 6460 Triple Quad LC-MS:						
Zeit[min]	0	2	8	10	10.1	12
B [%]	20	20	100	100	20	20

Tabelle 18: Exakte Massen relevanter und beobachteter Modifizierungen.

Modifizierung	Massendifferenz [Da]
Protonierung	+1.01
Dehydratisierung	-18.01
Phosphorylierung	+79.97
Dephosphorylierung	-97.98
DTT-Addukt	+154.25

4.4.11 Peptidsequenzierung mittels LC-MS/MS Experimente

LC-MS/MS Experimente wurden in dieser Arbeit zur Lokalisierung von postrationalen Modifikationen in der LabA2 Peptidsequenz, sowie zur Überprüfung auf eine vorhandene Zyklisierung angewendet. Bei dieser Technik können Vorläuferpeptide anhand ihrer spezifischen Masse selektiert werden und anschließend in einer Kollisionszelle unter Aussetzung von Energie in Form eines Inertgases (z. B. Helium oder Stickstoff) fragmentiert werden. Durch *low energy*-Fragmentierung entstandene MS/MS-Spektren werden in der Regel von Fragmenten dominiert, die durch Spaltung der Peptidbindung hervorgerufen werden. Für die Beschreibung der beobachteten Fragment-Ionen wurde eine Nomenklatur nach Roppstorff verwendet (Abbildung 25).^[100]

**Abbildung 25:** Nomenklatur von MS/MS-Fragmenten nach Roppstorff.

4.4.12 Aminosäureanalytik mittels Gaschromatographie (GC)

Für den direkten Nachweis der Bildung des Labioninbausteins nach enzymatischer Umsetzung von LabA2 durch LabKC_{His6} wurde eine Totalhydrolyse mit anschließender Analytik über GC-MS durchgeführt. Das entsprechende Protokoll für die Analytik wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Süßmuth von Herrn Dipl. Chem. Alexander Pesic

entwickelt.^[117] Nach erfolgter *in vitro*-Umsetzung wurde der Reaktionsansatz zunächst mittels Festphasenextraktion aufgereinigt und anschließend einer Totalhydrolyse unterzogen. Hierzu wurden die lyophilisierten Proben bei 110° C für 24 h in einer 6 M HCl-Lösung unter Vakuum in Glasampullen inkubiert. Nach Entfernung der Salzsäure durch Abblasen mit Stickstoff erfolgte die Derivatisierung der Aminosäuren mit 200 µL 2 M EtOH-HCl-Lösung für 30 min bei 110 °C unter Stickstoffstrom. Nach Zugabe von 100 µL Dichlormethan und 50 µL Trifluoressigsäureanhydrid und erneuter Inkubation für 10 min bei 110°C wurden die hierbei gebildeten *N*-trifluoracetyl/ethylester -Derivate mittels GC-MS mit den in Tabelle 19 angegebenen Parametern analysiert (5975C, Agilent).

Tabelle 19: Parameter für die GC-MS-Aminosäure-Analytik.

Säule	5% Phenylmethyilsiloxan (Agilent 190913-433), 325 °C, 30 m, 250 µm x 0.25 µm
Temperaturgradient	70 °C (2 min isothermal), 300 °C, 5 °C/min (1 min isothermal)
Scan	Full-Scan, 50-800 m/z
Injektion	2 µL
Heater	300 °C
MSD-Transfer line	280 °C
Pressure	11.052 psi
Fluss	1.2 mL/min, 40.3 cm/s mit He als Trägergas
PCI-Mode	Energy: 91 eV, MS Source: 300 °C, MS Quad: 150 °C, Kollisionsgas: Methan mit Flussrate 18%

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Die Labyrinthopeptin-Synthetase LabKC

Dem 2589 bp großen *labKC*-Gen im Labyrinthopeptin-Gencluster wurde die Funktion des mutmaßlichen LabA2/LabA1-modifizierenden Enzyms zugeschrieben, welches in diesem Abschnitt zunächst näher vorgestellt werden soll. In der 862 Aminosäuren langen Sequenz von LabKC konnten nach Datenbanksuche und Sequenzabgleich mit homologen Proteinen drei konservierte Domänen mit unterschiedlicher Funktion identifiziert werden. Diese waren eine *N*-terminale Lyase-, eine zentrale Ser/Thr-Kinase- sowie eine *C*-terminale Zyklase-Domäne (Abbildung 26 und Tabelle 20). Die Grenzen der einzelnen LabKC-Domänen wurden dabei unter Einbeziehung der Daten eines Sequenzalignments sowie der Vorhersage eines Strukturmodells gewählt (Anhang Abbildung 61).

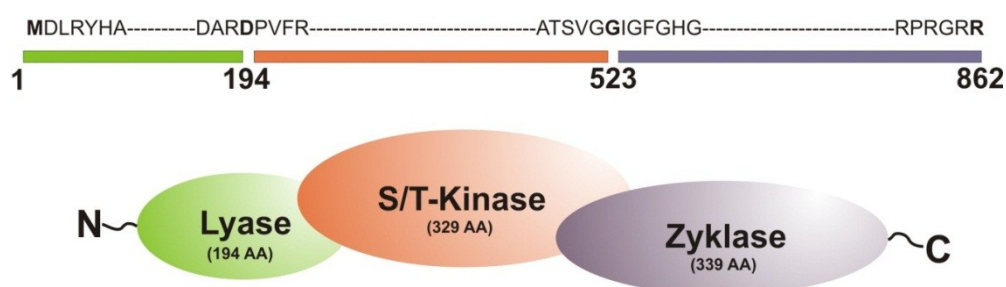


Abbildung 26: Übersicht zum Aufbau von LabKC. Gezeigt sind die drei konservierten Domänen, sowie deren Grenzen mit Ausschnitten der Aminosäuresequenz.

Tabelle 20: Zusammenfassung der Größe in Aminosäuren (AA), Molekulargewicht (kDa) und pI-Wert von LabKC sowie der einzelnen Domänen.

Domäne	AA	MW [kDa]	pI
LabKC	862	95.1	5.66
Lyase	193	21.8	5.63
Ser/Thr-Kinase	330	37.0	4.90
Zyklase	339	36.3	7.43

Die *N*-terminale Domäne, bestehend aus etwa den ersten 194 Aminosäuren, wurde erst im Zuge dieser Arbeit als Lyase-Domäne klassifiziert. Diese Zuweisung beruht nicht auf einem Sequenzvergleich mittels BLAST-Suche, sondern vielmehr aus den Erkenntnissen eines weiteren Lantibiotika-Synthetase-Enzyms aus *S. venezuelae*.^[31, 101] In dieser Arbeit

wurde ein neues Lantibiotika-modifizierendes Enzym beschrieben, dessen funktioneller Aufbau dem von LabKC gleicht. Durch Expression der *N*-terminalen Domäne und Testierung in einem *in vitro*-Assay, konnte eine Verwandtschaft zu pSer/pThr-Lyasen hergestellt werden. Lyasen wurden bereits detailliert bei humanpathogenen Bakterien beschrieben, welche MAPK-Kinasen durch eine Phosphateliminierung irreversibel inaktivieren. Bei der katalysierten Reaktion erfolgt die Abspaltung der Phosphatgruppe wie bei den Lantibiotika-Dehydratasen durch Spaltung der C-O anstatt der O-P-Bindung unter Bildung eines Didehydroalanins.^[102, 103, 104] Auf Details über die beim Mechanismus der Phosphateliminierung beteiligten Reste wird in Abschnitt 5.4.2 näher eingegangen.

Der *N*-terminalen Lyase-Domäne schließt sich eine hoch konservierte, etwa 329 Aminosäuren umfassende Ser/Thr-Kinase-Domäne an. Es zeigte sich hierfür eine Homologie zu humanen Ser/Thr-Kinasen, sowie zu den sehr gut charakterisierten und bereits kristallisierten Kinasen PknG und PknB aus *Mycobacterium tuberculosis*.^[105, 106] Bei PknB handelt es sich um ein Transmembranprotein mit einer intrazellulären Kinase- und einer extrazellulären Penicillin-Bindungsdomäne. Während auch für das SapB-modifizierende und zu LabKC homologe Enzym RamC eine Membraninsertion vorgeschlagen wurde, konnte dies für LabKC nicht bestätigt werden. Eine Vorhersage von Transmembranhelices mit dem Programm TMHMM ergab keine Hinweise auf entsprechende hydrophobe Segmente (Anhang Abbildung 62).^[107] Die Aktivität der Kinase-Domäne wird bei PknB durch Autophosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten in einem konservierten Aktivierungsloop kontrolliert.^[106] Wichtige katalytische Reste, sowie ein Nukleotidbindungsmotiv finden sich auch in der Aminosäuresequenz von LabKC wieder. Bisher wurden nur wenige Ser/Thr-Kinasen aus Actinomyceten charakterisiert, für zwei Beispiele konnte jedoch auch die Verwandtschaft zu humanen Kinasen hergestellt werden. Diese Enzyme fungieren vermutlich als Signalüberträger bei der Differenzierung der Zellentwicklung und Regulation des Sekundärmetabolismus.^[108, 109]

Für die *C*-terminale Domäne von LabKC konnte nach BLAST-P-Suche eine geringe Homologie zu Lantibiotika-Zyklasten hergestellt werden.^[101] Im Vergleich zu NisC (*L. Lactis*), LctM (*L. Lactis*) und auch dem VenL-Enzym (*S. venezuelae*) fehlen jedoch bei LabKC die für den Mechanismus wichtigen Zink-koordinierenden Liganden in den konservierten Motiven AHG, WCXG und CHG. Demzufolge müsste der Zyklisierungsreaktion bei den Labyrinthopeptinen ein neuer, noch unbekannter Mechanismus zugrunde liegen.

Die Verwandtschaftsbeziehung von LabKC zu homologen Proteinen, sowie zu modifizierenden Enzymen anderer Lantibiotika-Klassen, ist in Abbildung 27 in Form eines phylogenetischen Stammbaums gezeigt.

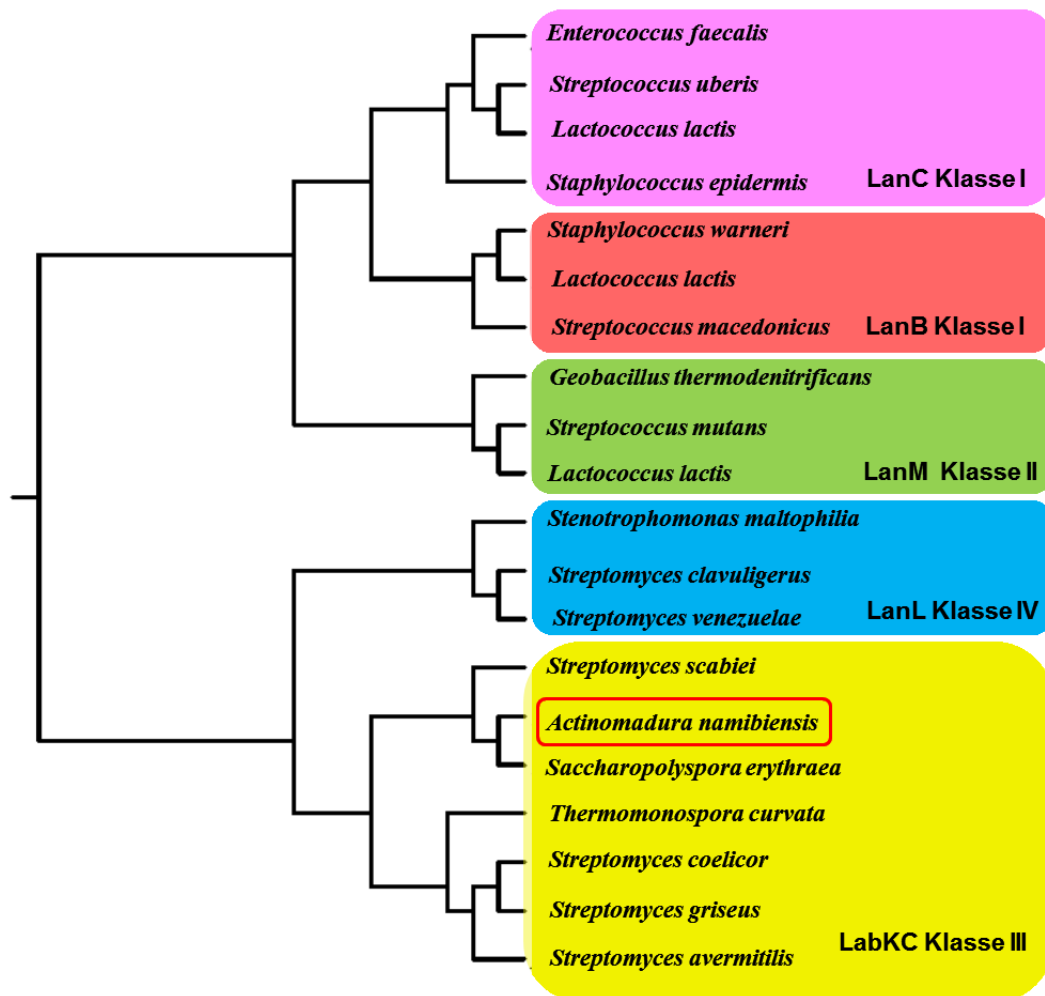


Abbildung 27: Dendrogramm auf Basis eines Proteinalignments von LabKC mit repräsentativen Sequenzen aller bisher beschriebenen, an der Lanthionin-Biosynthese beteiligten, Enzymklassen aus verschiedenen Organismen.

5.2 Klonierung, rekombinante Expression und Reinigung von LabKC

Für die Etablierung eines *in vitro*-Enzym-Assays zur Untersuchung der Labyrinthopeptin-Biosynthese war das erste Ziel dieser Arbeit die Klonierung und rekombinante Expression von LabKC, sowie dessen anschließende Reinigung mittels Affinitätschromatographie. Als Expressionssystem wurde hierfür *E. coli* gewählt, das sich aufgrund seiner einfachen Handhabung und Robustheit in der Vergangenheit bewährt hat. Der prokaryotische Ursprung von LabKC, sowie die bereits erfolgreiche Expression anderer Lantibiotika-modifizierender Enzyme wie z.B. der Lacticin481-Synthetase waren weitere Gründe für die Expression in diesem System.^[23] Die Reinigung des rekombinanten Proteins sollte über etablierte Affinitäts-tags erfolgen, die im Zuge der Klonierung in verschiedene Expressionsvektoren an die Sequenz des *labKC*-Gens angefügt wurden.

5.2.1 Klonierung verschiedener Expressionskonstrukte von LabKC

Um möglichst optimale Bedingungen hinsichtlich der Löslichkeit und der Integrität des rekombinanten Proteins zu testen, wurden für die Expression von LabKC zunächst verschiedene Konstrukte unter Verwendung unterschiedlicher Expressionsvektoren kloniert. Für ein erstes Expressionskonstrukt sollte das 2589 bp große *labKC*-Gen in den pET24a(+)-Vektor, codierend für einen C-terminalen Hexahistidin-tag, über die Schnittstellen EcoRI und XhoI kloniert werden. Die Amplifikation der *labKC* codierenden Sequenz mittels PCR wurde mit den in Abschnitt 3.10 aufgeführten Primerpaaren unter Einführung der entsprechenden Schnittstellen durchgeführt (Abschnitt 4.2.2). Als *Template* diente dabei das Cosmid 1104, das im Zuge vorgegangener Arbeiten erzeugt wurde und auf welchem das Labyrinthopeptin-Gencluster identifiziert wurde.^[49] Nach der erfolgreichen Amplifikation wurde das PCR-Produkt zusammen mit dem isoliertem pET24a(+)-Vektor über die Restriktionsendonukleasen EcoRI und XhoI verdaut und anschließend über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt (Abschnitt 4.2.6 und 4.2.8.). Anschließend erfolgte die Ligation von Vektor und *labKC*-Gen über die beim Verdau erzeugten komplementären Basenüberhänge unter Verwendung der T4-DNA-Ligase (Abschnitt 4.2.9). Der nächste Schritt war die Transformation von *E. coli* DH5 α -Zellen mit dem Ligationsansatz nach dem im Abschnitt 4.1.4 beschriebenen Protokoll. Die Identifizierung positiver Klone, mit Insertion von *labKC* in den Vektor, erfolgte schließlich über Kolonie-PCR (Abschnitt 4.2.3) und analytischen Restriktionsverdau. Abbildung 28 zeigt verschiedene Agarosegele mit den Produkten der einzelnen Schritte dieser Klonierung.

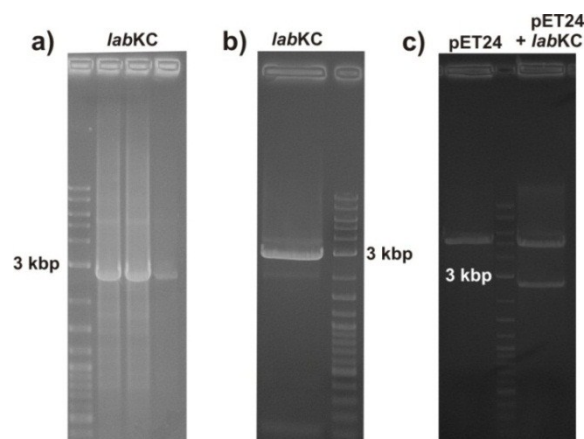


Abbildung 28: Agarosegele mit a) *labKC*-PCR Produkt, b) *labKC* nach Restriktionsverdau, c) Restriktionsverdau von pET24a(+) und *labKC*-pET24a(+).

Entsprechend dieser Vorgehensweise wurden weitere Klonierungen von *labKC* in die Vektoren pET28a(+), pGEX-4-T1 und pRSET durchgeführt, wobei letztere über eine

Zwischenklonierung in pDrive erfolgte (Abschnitt 4.2.10). Eine Übersicht der erstellten Konstrukte ist in Tabelle 21 mit Angabe der verwendeten Schnittstellen und codierenden Affinitäts-*Tags* aufgeführt. Die Sequenzen aller durchgeführten Klonierungen wurden nach Plasmidpräparation mittels DNA-Auftragssequenzierung auf ihre Richtigkeit hin verifiziert (Abschnitt 4.2.11).

Tabelle 21: Übersicht über die klonierten *labKC*-Konstrukte.

Konstrukt	Vektor	Schnittstellen	tag
<i>labKC_pRSET</i>	pREST	BamHI	<i>N-terminaler His₆-tag</i>
<i>labKC_pET24a(+)</i>	pET24a(+)	EcoRI, XhoI	<i>C-terminaler His₆-tag</i>
<i>labKC_pET28a(+)</i>	pET28a(+)	EcoRI, NotI	<i>N-terminaler His₆-tag</i>
<i>labKC_pGEX-4T-1</i>	pGEX-4T-1	EcoRI, NotI	<i>N-terminaler GST-tag</i>

Für die anschließende Proteinexpression wurden *E. coli* BL21 Zellen mit den erzeugten *labKC*-Konstrukten transformiert (Abschnitt 4.1.4) und auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum selektiert. Die Identifizierung der erfolgreichen Plasmidaufnahme und Insertion des *labKC*-Gens wurde wiederum über Kolonie-PCR-bestätigt.

5.2.2 Rekombinante Expression und Reinigung von LabKC

Um die optimalen Expressionsbedingungen für die in Abschnitt 5.2.1 erzeugten *labKC*-Konstrukte zu finden, wurden zunächst Expressionen im analytischen Maßstab unter Variation kritischer Parameter wie z.B. Temperatur, IPTG-Konzentration und Expressionsdauer durchgeführt (Abschnitt 4.3.1).

Nach Beendigung der Expression wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und lösliche sowie unlösliche Zellfraktionen über SDS-PAGE analysiert (Abschnitt 4.4.1). Bei allen erzeugten Expressions-Konstrukten wurde LabKC sehr gut exprimiert, jedoch befand sich der Hauptteil des rekombinanten Proteins in Form von *inclusion bodies* in der unlöslichen Aufschlussfraktion. Aus diesem Grund wurden die Kulturen nach Induktion mit IPTG anstelle von 37 °C bei 15 °C weiter inkubiert. Durch die Temperaturniedrigung sollte die Expressionsrate verlangsamt werden, um die Produktion von löslichem, richtig gefaltetem Protein zu begünstigen. Aus demselben Grund wurde die Induktionsmenge an IPTG von anfänglich 1 mM auf 0.15 mM Endkonzentration reduziert. Die Verwendung des Expressionsstammes *E. coli* Rosetta-gami(DE3)pLysS brachte jedoch keine Verbesserung hinsichtlich der Löslichkeit des LabKC-Proteins. Dieser *E. coli*-Stamm trägt ein

zusätzliches Plasmid auf dem weitere tRNAs für in *E. coli* selten vorkommende Codons codieren. Zudem wird die Disulfidbrückenbildung in rekombinanten Proteinen durch Mutation der Thioredoxinreduktase und Glutathionreduktase begünstigt.

Die Proben einer Testexpression unter Verwendung des *labKC*-pET24-Konstruktes (*C*-terminaler His-*tag*) mit anschließender analytischer IMAC-Reinigung der löslichen Zellfraktion sind in Abbildung 30 gezeigt. Das SDS-Gel zeigt eine Bande mit deutlich überexprimiertem Protein in der für LabKC zu erwartenden Größe von etwa 100 kDa. Im Vergleich dazu unterscheidet sich die Menge des rekombinanten Proteins in der löslichen Fraktion kaum von den übrigen Zellproteinen, es konnte jedoch über analytische IMAC-Reinigung stark angereichert werden. Von den beiden weiteren Konstrukten mit einem Hexahistidin-*tag* zeigte *labKC*_pRSET eine noch schlechtere Löslichkeit und konnte nur in geringen Mengen aufgereinigt werden. Das *labKC*_pET28a(+)-Konstrukt wurde dagegen ebenfalls erfolgreich exprimiert und aufgereinigt (Anhang Abbildung 64).

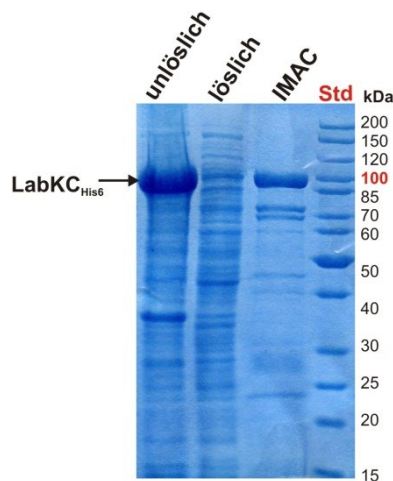


Abbildung 29: SDS-Gel nach Coomassie-Färbung mit LabKC-Proben (Konstrukt: *labKC*-pET24a(+)) nach Expression im analytischen Maßstab für 48 h bei 15 °C und Induktion mit 0.1 mM IPTG (unlöslich = unlösliche Zellproteine nach Aufschluss; löslich = lösliche Zellproteine nach Aufschluss; IMAC = Eluat von LabKC_{His6} mittels Ni-Agarose gereinigt).

Ein bewährtes Mittel zur Erhöhung der Löslichkeit eines rekombinanten Proteins, ist die Expression als Fusionsprotein mit Gluthation-*S*-Transferase (GST). Bei der Expression des *labKC*-pGEX-4T1-Konstruktes zeigte sich auch eine deutliche Verbesserung hinsichtlich der Löslichkeit des GST-fusionierten LabKC Proteins (Tabelle 21). Da jedoch über den *N*-terminalen GST-*tag* sehr viele Nebenprodukte mit aufgereinigt wurden, sowie aufgrund der schlechten Bindung von GST-LabKC zur Matrix, wurde in den folgenden Arbeiten hauptsächlich das *labKC*-pET24a(+) Konstrukt verwendet (Anhang Abbildung 63).

5.2.3 Präparative Reinigung von LabKC

Nach Anpassung der Expressionsbedingungen mussten im nächsten Schritt die Bedingungen für die Reinigung von LabKC im präparativen Maßstab optimiert werden. Da im Vergleich zur Reinigung von LabKC mit *C*-terminalen His₆-tag die Elutionsfraktionen des über den *N*-terminal-tag gereinigten Proteins mehr Verunreinigungen zeigten, wurde für die weiteren Expressionen und Aufreinigungen auf das *labKC*-pET24a(+)-Konstrukt zurückgegriffen (Anhang Abbildung 64). Für die Reinigung von LabKC wurden Expressionen im präparativen Maßstab nach dem im Abschnitt 4.3.2 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Aufgrund der beobachteten geringen Löslichkeit des Proteins wurden Kulturen von bis zu 5 L angesetzt, um am Ende des Reinigungsprozesses eine ausreichende Menge an Protein zu erhalten (Bedingungen: 0.1 mM IPTG, 48 h, 15 °C).

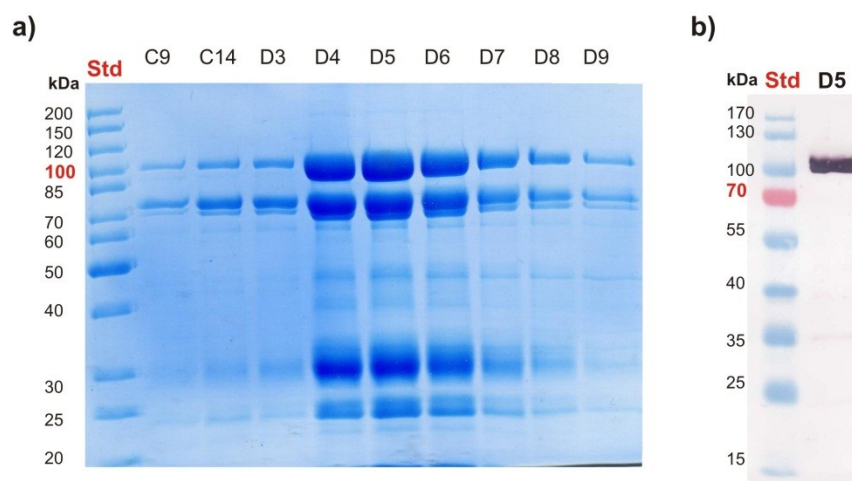


Abbildung 30: a) SDS-Gel nach Coomassiefärbung mit Elutionsfraktionen von LabKC_{His6} nach präparativer IMAC-Reinigung mittels ÄktaPurifier (Konstrukt: *labKC*-pET24a(+)). b) Western-Blot mit Anti-His₆-AK mit IMAC-Probe aus Fraktion D5. Ein klares Signal des detektierten LabKC_{His6} ist bei etwa 100 kDa zu sehen.

Für die anschließende Reinigung aus dem löslichen Zellextrakt wurde zunächst ein ÄktaPurifier-System mit einer 1 mL-HisTrap Säule verwendet. Dabei zeigte sich jedoch in wiederholten Durchführungen, dass neben LabKC_{His6} noch weitere unspezifische Proteine mit aufgereinigt wurden (Abbildung 30). Zudem war die Affinität des rekombinanten Proteins zur Säulenmatrix sehr gering, wodurch sich die Ausbeute aus 1 L Kultur lediglich auf etwa 0.3 mg Protein belief.

Als alternative Methode wurde eine Aufreinigung durch Inkubation des Zellextraktes mit freier Ni-NTA-Agarose über einen Zeitraum von bis zu 4 h getestet (Abschnitt 4.3.3). Im Prinzip sollte dadurch die Interaktionsdauer von LabKC_{His6} mit der Ni-Matrix im Vergleich zur Reinigung über das Äkta-System verlängert werden. Weiterer Vorteil dieser Methode war die Anpassung des Verhältnisses der Menge an Zellextrakt zur Affinitätsmatrix,

wodurch die unspezifische Bindung von Fremdproteinen deutlich verringert werden konnte. Auch infolge der Testierung verschiedener Pufferbedingungen und Verwendung eines Tris-Puffers mit hoher Salzkonzentration (20 mM Tris, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF, pH 8.2) konnte die Reinheit nach der IMAC-Reinigung verbessert werden (Anhang Abbildung 65). Abbildung 31a zeigt eine präparative Aufreinigung von LabKC_{His6} durch Ni-NTA-Agarose. Als Hauptverunreinigung tritt noch eine Bande bei etwa 75 kDa auf, die auch bei der ÄktaPurifier-Aufreinigung deutlich sichtbar ist (vgl. Abbildung 30).

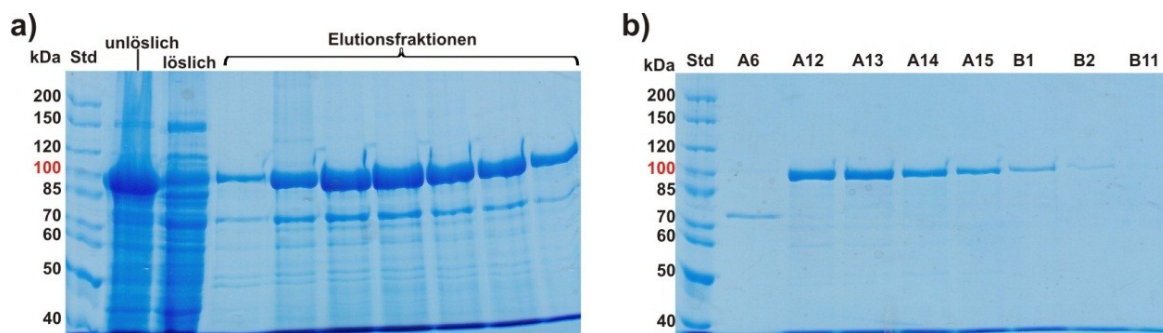


Abbildung 31: Reinigung von LabKC_{His6} über Ni-Agarose *Beads* (Konstrukt: *labKC*-pET24a(+)). Gezeigt ist ein SDS-Gel nach Coomassie-Färbung mit Proben nach dem Zellaufschluss (unlöslich, löslich) sowie den Elutionsfraktionen. b) SDS-Page mit Fraktionen nach erfolgter Größenausschlusschromatographie von LabKC.

Um eindeutig zu klären, ob es sich bei dem aufgereinigten Protein bei etwa 75 kDa um ein Protein aus *E. coli* handelt oder um ein proteolytisches Spaltprodukt von LabKC, sollte eine *N*-terminale Sequenzierung durchgeführt werden. Letzteres könnte wiederum auf ein instabiles und damit inaktives LabKC-Enzym hindeuten. Hierzu wurde eine Proteinprobe nach IMAC-Aufreinigung mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und mittels Ponceau-S gefärbt. Anschließend wurde die Bande bei 75 kDa mit einem Skalpell ausgeschnitten und für eine *N*-terminale Sequenzierung der Firma ProteinFactory übergeben (Abschnitt 4.4.6). Das Ergebnis der ersten fünf Zyklen des Edmanabbaus ergab die Aminosäuresequenz MKTVV. Da diese Aminosäureabfolge nicht in der Sequenz von LabKC vorkommt, konnte somit ein proteolytisches Spaltprodukt von LabKC ausgeschlossen werden. Anschließend wurde die Sequenz mit Hilfe einer servergestützten Datenbank mit den Einträgen für *E. coli* abgeglichen (ColibriServer).^[110] Dabei konnte ein 74 kDa großes Protein mit der Bezeichnung YfbG identifiziert werden. Eine Literatursuche ergab, dass es sich hierbei um ein bifunktionelles Enzym handelt, welches als Formyltransferase fungiert und weiterhin die oxidative Decarboxylierung von

UDP-Glucuronsäure katalysiert. Aufgrund seiner hohen Affinität zu zweiwertigen Metall-Ionen wird dieses *E. coli*-Protein häufig bei IMAC-Methoden mit aufgereinigt.^[111]

Um für den *in vitro*-Assay Enzym von sehr hoher Reinheit zu erhalten, wurde als zweiter Reinigungsschritt nach der IMAC-Affinitätschromatographie eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt (Abschnitt 4.3.6). Dabei konnte die Verunreinigung bei 75 kDa mit dem *E. coli*-Protein abgetrennt werden und LabKC in nahezu reiner Form erhalten werden (Abbildung 31). Einen Hinweis auf eine mögliche Dimerisierung von LabKC, wie dies für das modifizierende Enzym RamC von SapB vorgeschlagen wurde, ergab sich in Folge der Gelfiltrationsläufe nicht.^[43] Allerdings müsste dies nochmals mit Hilfe einer analytischen Größenausschlusschromatographie bestätigt werden. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV-VIS-Spektroskopie ergab sich eine Gesamtausbeute von durchschnittlich 0.5 – 1 mg Protein aus 1 L *E. coli*-Expressionskultur.

5.3 Etablierung des LabKC *in vitro*-Assays

Für die Modifizierung des LabA2-Präpropeptids zur Ausbildung der beiden Labioninmotive müssen insgesamt vier Serine phosphoryliert, dehydratisiert und anschließend über zwei Cysteinseitenketten korrekt miteinander verbrückt werden. Ein Überblick der postulierten, von LabKC katalysierten Reaktionen, sowie die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur und Bezeichnung einzelner Aminosäurepositionen ist in Abbildung 32 zusammengefasst.

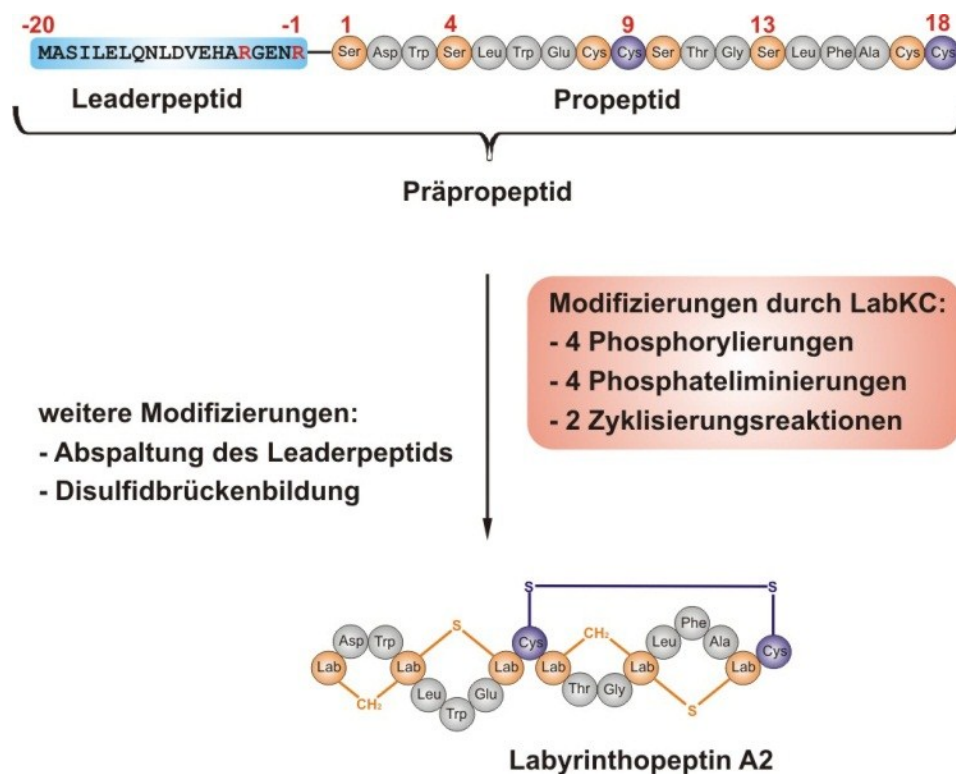


Abbildung 32: Übersicht über die für LabKC postulierten Reaktionen zur Modifizierung von LabA2 sowie für die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur zur Bezeichnung der Peptide und einzelnen Positionen von Aminosäuren.

5.3.1 Bereitstellung des Peptidsubstrats

Neben der erfolgreichen Expression und Reinigung von LabKC mussten für den Enzym-Assay noch geeignete Peptidsubstrate hergestellt werden. Bei der Charakterisierung der Lacticin481-Synthetase LctM wurden die benötigten Präpropeptide rekombinant in *E. coli* exprimiert und über einen *N*-terminalen His-tag unter denaturierenden Bedingungen gereinigt.^[23] Auch für die Labyrinthopeptine wurde dieser Weg der Peptidbereitstellung zu Beginn dieses Projektes getestet.^[49] Die Schwierigkeiten die dabei auftraten lagen nicht nur bei der aufwendigen Reinigung über denaturierende IMAC, sondern vielmehr bei der

anschließenden Analytik der Peptide. Aufgrund des limitierenden Massenbereichs der ESI-MS Massenspektrometer sowie der schlechten Ionisierung der His-markierten Peptide mit einem MW von etwa 6400 Da, mussten die Peptide zunächst mittels einer Protease verdaut werden. Aufgrund dieser Schwierigkeiten sollte versucht werden die Substrate mittels chemischer Peptidfestphasensynthese zu gewinnen. Durch letzteres Vorgehen konnten die Peptide im Vergleich zu ihrer natürlichen Sequenz ohne zusätzliche Aminosäuren synthetisiert werden und waren in dieser Größe noch sehr gut analysierbar. Die ersten erfolgreichen Synthesen des LabA2-Präpropeptids und einzelner Varianten wurden zunächst bei der Firma EMC-Microcollections (Reutlingen) durchgeführt. Anschließend konnte die Synthese der Peptidsubstrate im Arbeitskreis von Prof. Dr. Roderich Süßmuth mittels eines Syntheseroboters etabliert werden. Die Entwicklung der Syntheseprotokolle wurde von Dipl. Chem. Paul Ensle weiter optimiert. Die hierbei erzeugten Peptide konnten bei entsprechender Reinheit direkt in den Enzym-Assay eingesetzt werden oder wurden nach den in den Abschnitten 4.3.7 und 4.3.8 beschriebenen Methoden zunächst aufgereinigt.

5.3.2 Aktivitätstest mit rekombinantem LabKC_{His6}

Mit der erfolgreichen Expression und Reinigung von LabKC_{His6} sowie der Bereitstellung eines Labyrinthopeptin A2-Präpropeptids in seiner natürlichen Aminosäuresequenz mittels chemischer Peptidsynthese waren die Grundvoraussetzungen für den *in vitro*-Enzym-Assay gegeben. Im nächsten Abschnitt des Projektes sollte nun das gereinigte Enzym auf seine Aktivität getestet werden. Für die ersten Assaybedingungen wurde ein Puffer mit 50 mM Tris pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP sowie 1 mM DTT gewählt, um eine Oxidation der im LabA2-Präpropeptid vorhandenen Cysteine zu Cystin zu unterbinden. Aufgrund der Ser/Thr-Kinase-Domäne, sowie der bekannten Bedingungen für die *in vitro*-Umsetzung von Lactacin481, wurde zu Beginn ATP als Co-Substrat für die Phosphorylierungsreaktion gewählt.^[23] Die Inkubationen von LabKC_{His6} mit dem LabA2-Präpropeptid wurden zunächst bei 28 °C über einen Zeitraum von 12 h durchgeführt. Bei der anschließenden Analyse des Reaktionsgemisches mittels LC-ESI-MS konnte jedoch keine Modifikation des Peptids in Form von Phosphorylierungen bzw. Dehydratisierungen beobachtet werden. Aufgrund der im Leaderpeptid vorhanden basischen Reste sowie durch die Messung mit Säure im Laufmittel (H₂O + 0.1 % HFO / ACN + 0.1 % HFO) konnte das LabA2-Präpropeptid als 4-fach geladenes Ion im Positiv-Modus detektiert werden ($[M+4H]^{4+} = 1069.23$). Im Zuge der weiteren Optimierung der Analytik und Variation der Zusammensetzung des Reaktionsansatzes wurden auch andere Nukleotide als mögliche Co-Substrate in Betracht gezogen. Bei Verwendung von GTP konnte schließlich eine erste Modifizierung von LabA2 in Form von teilweise dehydratisierten Peptiden und phosphorylierten Zwischenstufen beobachtet werden. Eine weitere Anpassung der

Assaybedingungen ermöglichte schließlich die vollständige Dehydratisierung aller vier Serin-Reste in der Aminosäuresequenz. Die Identität des Produkts mit einer Massendifferenz von 72 Da im Vergleich zum nicht-modifizierten Peptid konnte mittels hochauflösender MS-Analytik bestätigt werden (Abbildung 33). Weiterhin zeigte das Massenspektrum alle möglichen Zwischenstufen in Form von einfach phosphorylierten und 1–3–fach dehydratisierten Peptiden. Diese Untersuchungen zeigten, dass das rekombinante, in *E. coli* exprimierte LabKC-Enzym im Hinblick auf die Dehydratisierungsreaktion vollständige Aktivität aufwies.

Die Testierung weiterer Nukleotide in Form von TTP, CTP, sowie dem Hydrolyse-stabilen γ -S-GTP-Derivat als weitere Co-Substrate erbrachte keine Modifizierung von LabA2 durch LabKC bzw. eine nur geringfügige einfache Dehydratisierung. Hiervon ausgenommen war dGTP, mit dem eine vollständige Umsetzung erreicht wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass LabKC eine hochspezifisch ausgebildete Bindetasche für GTP besitzen muss. Das aktive Zentrum der Ser/Thr-Kinase von LabKC muss demzufolge eine hohe Spezifität für die Erkennung und Bindung der Guanosin-Base besitzen.

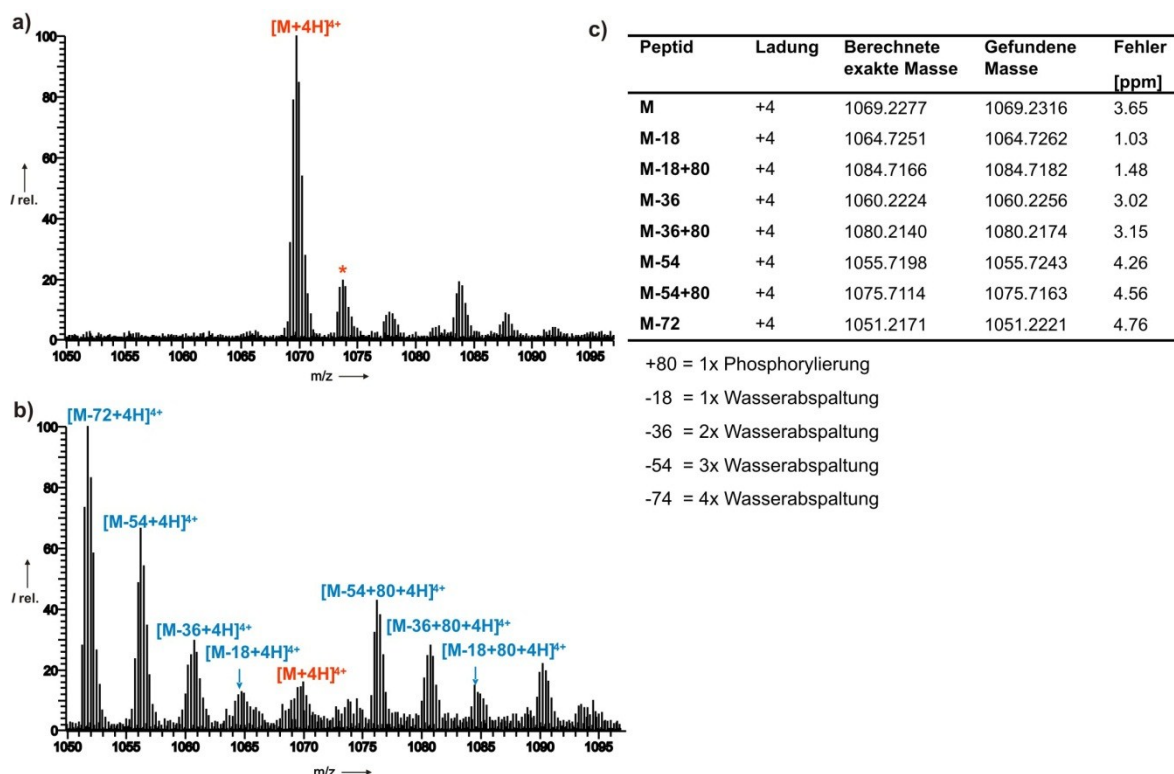


Abbildung 33: LC-ESI-HR-MS-Spektren (ESI Orbitrap-MS) der Umsetzung des LabA2-Präpropeptids mit LabKC_{His6}. Die mit einem "*" markierten Signale kennzeichnen Methionin-Oxidationsprodukte des Peptids. a) $[M+4H]^{4+}$ -Ionen der Reaktion mit ATP nach 12 h; b) Assay in Gegenwart von 1 mM GTP (12 h); c) Tabelle mit berechneten exakten Massen und gefundenen Molekülmassen unter Angabe der Abweichung in ppm.

LabKC stellt hinsichtlich der Präferenz für die Verwendung von GTP als Co-Substrat eine Besonderheit bei den Lantibiotika-modifizierenden Enzymen dar. Alle bisher *in vitro* charakterisierten Lantibiotika-Synthetasen benötigten ATP für die Phosphorylierung von Ser/Thr-Resten im Zuge der Dehydratisierungsreaktion.^[25, 31, 34] Es gibt jedoch zahlreiche Beispiele für Kinasen, die sowohl ATP als auch GTP zur Phosphorylierung verwenden, z.B. die Caseinkinase II.^[112] Auch bei der Biosynthese des ribosomalen Peptids Microcin B17 besitzt der Synthetasekomplex eine Toleranz für ATP und GTP.^[113]

5.3.3 Umsetzung von LabyrinthopeptinA1

Nach dem erfolgreichen Nachweis der *in vitro*-Prozessierung des Präpropeptids von Labyrinthopeptin A2, wurden im Zuge der Charakterisierung von LabKC weitere Peptidsubstrate getestet. Unter anderem sollte auch das Präpropeptid von Labyrinthopeptin A1 untersucht werden. Wie bereits in Abschnitt 1.3 erwähnt wurde, besitzen die beiden Labyrinthopeptin-Präpropeptide eine sehr ähnliche, konservierte Aminosäuresequenz. Gravierendere strukturelle Unterschiede kommen lediglich im C-terminalen Bereich des Leaderpeptids, sowie im später gebildeten, um zwei Aminosäuren erweiterten B'-Ring vor. Interessant war in diesem Fall vor allem, ob LabKC auch die Dehydratisierung von Thr18 zu Didehydrobutyryn *in vitro* katalysiert.

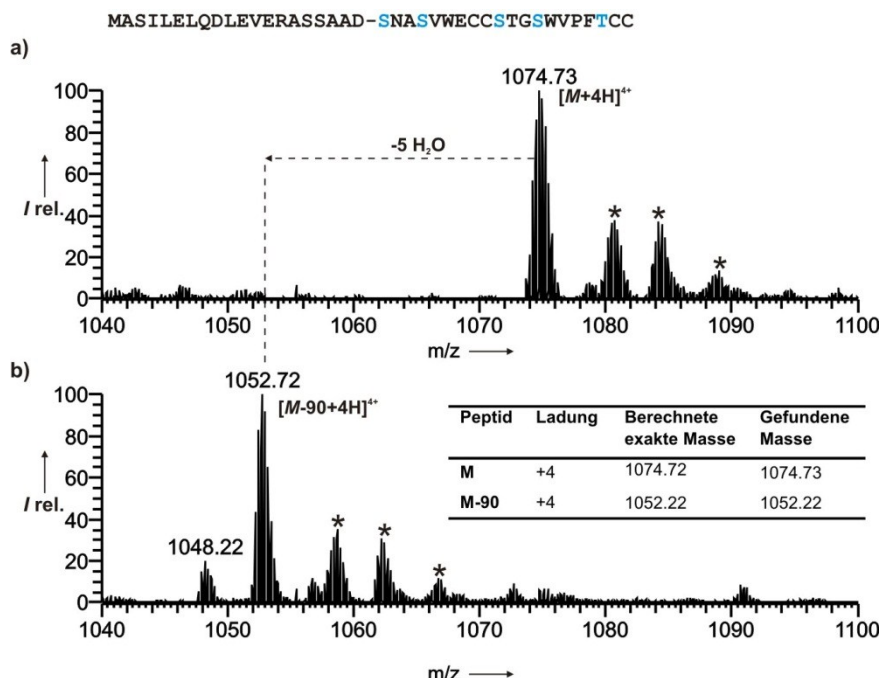


Abbildung 34: LC-ESI-MS-Spektrum (ESI-Exacte-MS) der Umsetzung des Präpropeptids von LabA1 mit LabKC_{His6}. a) Kontrollansatz ohne Enzym ($[M+4H]^{4+} = 1074.73$) b) Inkubation des Präpropeptids von LabA1 mit LabKC_{His6} in Gegenwart von 2 mM GTP für 2 h unter Bildung des 5-fach dehydratisierten Hauptprodukts ($[M+4H]^{4+} = 1052.72$). Die mit “*” markierten Signale kennzeichnen Nebenprodukte aus der Peptidsynthese.

Nach erfolgreicher chemischer Peptidsynthese des 40-mer Präpropeptids von LabA1 an fester Phase, wurde dessen Umsetzung mit gereinigtem LabKC_{His6} unter den bereits zuvor beschriebenen Bedingungen getestet. Bei der Analyse dieses Reaktionsansatzes konnte im LC-ESI-MS-Spektrum ein Massenunterschied von $\Delta m = 90$ Da im Vergleich zum nicht modifizierten LabA1-Präpropeptid beobachtet werden. Dies entspricht einer 5-fachen Dehydratisierung des Peptids und deutet somit auf eine Modifizierung von Thr18 zu Didehydrobutyrin hin (Abbildung 34).

5.3.4 Untersuchung der Zyklisierungsreaktion von LabKC

Nachdem die volle katalytische Aktivität des rekombinanten, in *E. coli* exprimierten LabKC Enzyms hinsichtlich der Dehydratisierungsreaktion gezeigt wurde, sollten die folgenden Experimente Einblick darüber geben, ob auch die Zyklisierungsreaktion unter Bildung des Labioninmotives stattgefunden hat. Die Schwierigkeit des Nachweises der erfolgten Zyklisierung gestaltete sich darin, dass zwischen linearem, dehydratisiertem LabA2-Peptid (4xDha + 2xCys) und seinen zyklischen Formen (2xDha+2xLan oder 2x Lab) kein Unterschied in der Molekülmasse ($M=4200.84$ Da) vorliegt. Eine Methode die häufig zur Untersuchung der Lanthioninbildung eingesetzt wird, ist der Nachweis freier Cysteine durch Alkylierung mit Thiol-modifizierenden Verbindungen wie z.B. *p*-Hydroxymercurybenzoat (PHMB).^[40] Bei der Derivatisierung des Inkubationsansatzes von LabKC_{His6} mit LabA2 konnte im Vergleich zum nicht umgesetzten Präpropeptid von LabA2 keine Modifikation mit PHMB festgestellt werden (Anhang Abbildung 67). Dies war ein erster Hinweis auf eine Verbrückung der Cysteinseitenketten, jedoch gab diese Methode keinen Aufschluss auf die Bildung des Labioninmotivs.

Zur weiteren Untersuchung auf erfolgte Zyklisierungen wurden LC-ESI-MS/MS-Experimente durchgeführt. Aufgrund der verhältnismäßig großen, für ESI-MS ungünstigen Molekülmasse von LabA2, gestalteten sich jedoch die Analytik, sowie die anschließende Auswertung der Spektren sehr anspruchsvoll. Aus diesem Grund wurden vor den LC-ESI-MS/MS-Experimenten die Assay-Produkte des Umsatzes mit Trypsin verdaut, um geeignete, für die massenspektrometrische Sequenzanalyse zugängliche Fragmente zu erhalten. Im Leaderpeptid von LabA2 befinden sich zwei mögliche Trypsin-Spaltstellen jeweils C-terminal von Arg-5 und Arg-1 (Abbildung 35). Beim tryptischen Verdau des nicht modifizierten LabA2-Präpropeptids konnten gemäß der Schnittstellen, ein 22-mer und ein 18-mer des C-terminalen LabA2-Peptids identifiziert werden.

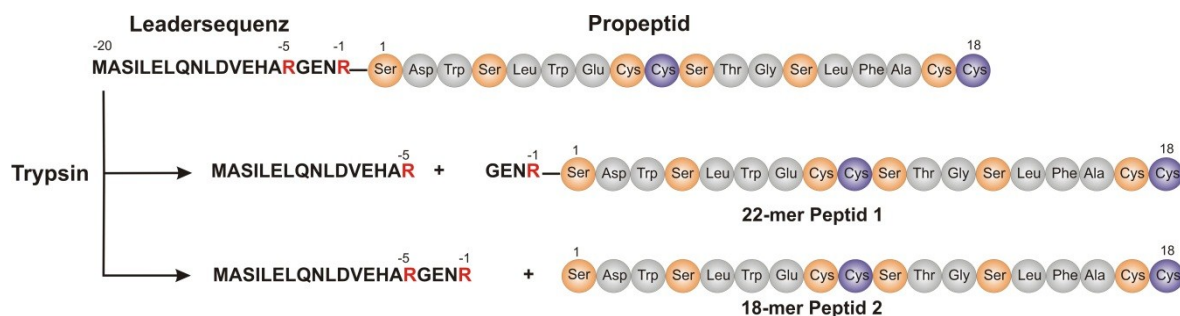


Abbildung 35: Fragmente für die vereinfachte massenspektrometrische Analytik nach Verdau des linearen LabA2-Präpropeptids mit Trypsin.

Die LC-ESI-MS/MS-Analytik des nicht modifizierten, linearen 22-mer LabA2-Peptids zeigt intensive b- und y-Fragmentserien. Nahezu alle Fragment-Ionen konnten der C-terminalen Aminosäuresequenz des Präpropeptids zugeordnet werden (Abbildung 36a). Im Vergleich hierzu entstand beim tryptischen Verdau des enzymatisch umgesetzten Ansatzes nur ein Peptid, welches dem 4-fach dehydratisierten 22-mer-Peptid nach Spaltung an Arg-5 entspricht. Dies war wiederum ein Indiz für eine Zyklisierung des Peptids unter Einbeziehung von Ser1, die dadurch erklärt werden kann, dass eine Spaltung C-terminal von Arg-1 durch Trypsin aufgrund sterischer Hinderung nicht mehr möglich ist. Im LC-ESI-MS/MS-Spektrum konnten für dieses Peptid keine Fragment-Ionen innerhalb der vermuteten Labioninmotive gefunden werden (Abbildung 36b). Zusätzlich zeigte das LC-ESI-MS/MS-Spektrum eines semisynthetischen Laybyrinthopeptin-A2-Referenzpeptids ein nahezu identisches Fragmentierungsmuster (Abbildung 36c). Hierzu wurden an das aus *Actinomadura namibiensis* gereinigte LabA2-Peptid mittels Peptidsynthese die GENR-Aminosäuresequenz des Leaderpeptids angefügt und anschließend vor einer massenspektrometrischen Analytik die Disulfidbrücke mit DTT reduziert.^[114]

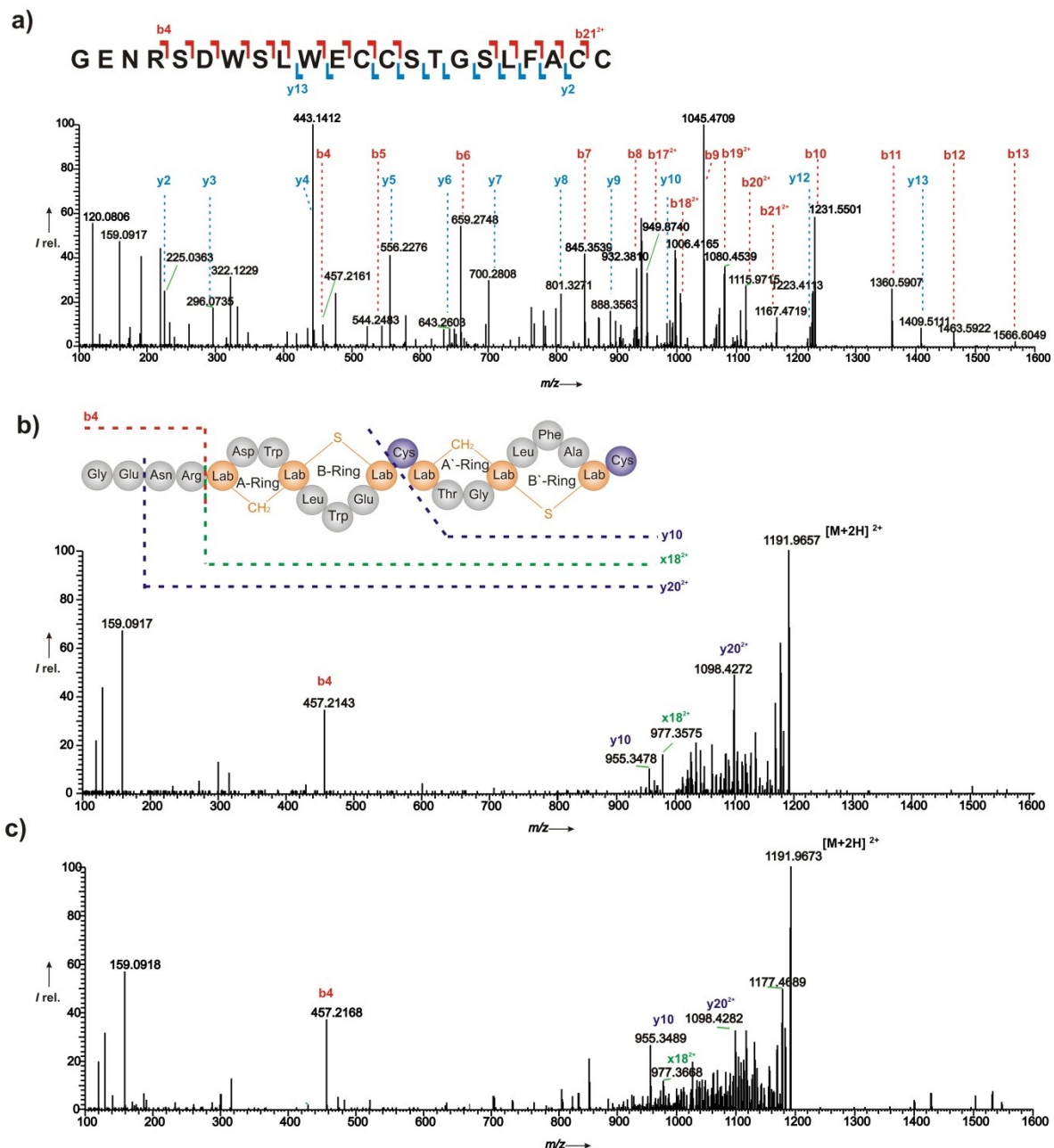


Abbildung 36: LC-ESI-MS/MS-Spektren (ESI-Orbitrap-MS) zur Untersuchung auf Zyklisierung von LabA2. a) LC-ESI-MS/MS-Spektrum des synthetischen, linearen 22-mer Präpropeptid-Fragments ($[M+2H]^{2+} = 1227.4923$) nach tryptischen Verdau und Spaltung C-terminal von Arg-5 (y- und b-Fragment-Ionen-Serie); b) LC-ESI-MS/MS-Spektrum des 4-fach dehydratisierten und zyklisierten Peptids ($[M+2H]^{2+} = 1191.4683$) nach Inkubation mit LabKC_{His6} und anschließendem tryptischen Verdau. c) LC-ESI-MS/MS-Spektrum des semisynthetischen Laybyrinthopeptin-A2-Referenzpeptids.^[114]

Die LC-ESI-MS/MS-Fragmentierungsversuche zeigten eindeutig, dass das 4-fach dehydratisierte LabA2-Peptid ebenfalls vollständig zyklisiert war. Jedoch geht aus diesen Experimenten nicht klar hervor, dass tatsächlich auch das Labioninmotiv gebildet wurde. Dies wurde vor allem durch die Testierung weiterer Peptide bestätigt, in denen an der Labioninbildung beteiligte Serinreste gegen Alanin ausgetauscht wurden (Tabelle 22).

Tabelle 22: Sequenzen von LabA2-Präpropeptid-Varianten mit Ser→Ala-Austauschen. Vorgenommene Änderungen sind gelb unterlegt.

Bezeichnung	Sequenz	Exakte Molekülmasse [Da]
LabA2 _{S1A}	MASILELQNL DVEHARGENR- <u>AD</u> WSLWECCSTGSLFACC	4256.89
LabA2 _{S4A}	MASILELQNL DVEHARGENR-SDW <u>AL</u> WECCSTGSLFACC	4256.89
LabA2 _{S4A S13A}	MASILELQNL DVEHARGENR-SDW <u>AL</u> WECCSTG <u>AL</u> FACC	4240.89

Die LabA2-Präpropeptid-Varianten LabA2_{S1A}, LabA2_{S4A} und LabA2_{S4A S13A} wurden im Zuge der Inkubation mit LabKC_{His6} vollständig dehydratisiert (Anhang Abbildung 68 bis Abbildung 70). Die durchgeführten Serin→Alanin-Austausche hatten demzufolge keinen Einfluss auf die Dehydratisierungsaktivität von LabKC. Für die Überprüfung auf eine erfolgte Zyklisierung wurde wie zuvor beschrieben, das LabA2_{S4A}-Peptid nach Umsetzung mit LabKC_{His6} tryptisch verdaut. Das hierbei gebildete 22-mer Peptid nach Spaltung C-terminal von Arg-5, wurde anschließend wiederum über LC-ESI-MS/MS fragmentiert. Auch in diesem Fall lassen die identifizierten Fragment-Ionen auf eine vollständige Ringbildung schließen (Abbildung 37). Aufgrund des durchgeführten Austausches von Ser4 gegen Alanin, ist dies ein eindeutiger Hinweis auf die Ausbildung eines Lanthioninrings zwischen Ser1 und Cys8. Somit könnte LabKC neben der Zyklisierung zum Labioninmotiv zusätzlich die Bildung von Thioetherbrücken katalysieren. Jedoch muss man hier auch eine spontan aufgetretene Zyklisierungsreaktion in Betracht ziehen. Für Lantibiotika wurde gezeigt, dass die Addition von Cysteinseitenketten an Didehydroalaninen auch nicht enzymatisch katalysiert in freier Lösung unter leicht basischen Bedingungen ablaufen kann.^[115] Des Weiteren verdeutlichen diese Ergebnisse, dass auch mittels LC-ESI-MS/MS kein direkter Nachweis auf eine erfolgte Labioninbildung möglich ist.

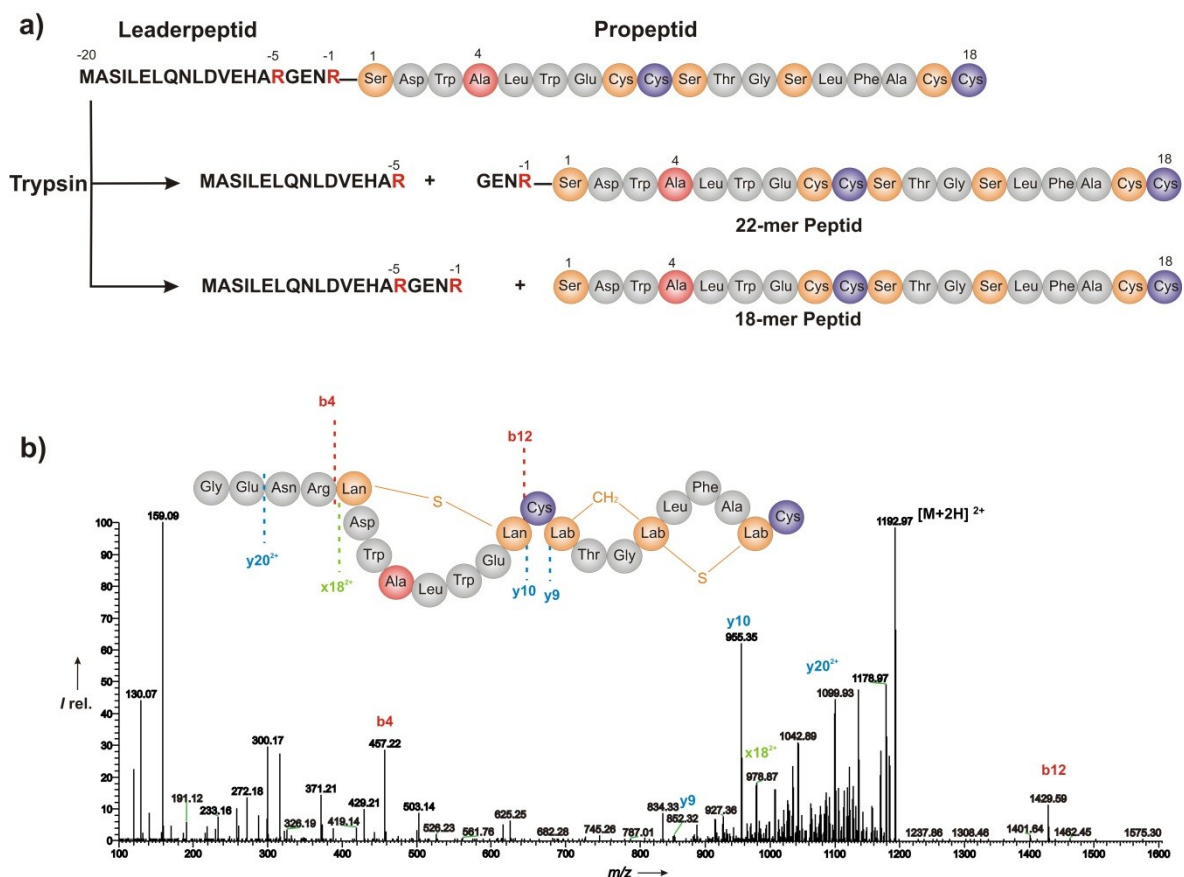


Abbildung 37: LC-ESI-MS/MS-Spektren (Orbitrap) zur Untersuchung auf Zyklisierung von LabA2_{S4A}. a) Fragmente nach Verdau des linearen Peptids mit Trypsin b) LC-ESI-MS/MS-Spektrum des 3-fach dehydratisierten und zyklisierten Peptids ($[M+2H]^{2+} = 1192.97$) nach Inkubation mit LabKC_{His6} und anschließendem tryptischem Verdau. Gefundene b- und y-Fragmente sind in einem Kugelmodell eingezeichnet.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit gestaltete sich der eindeutige Beweis der Labioninbildung *in vitro* als sehr schwierig. Eine selektive Öffnung der Thioetherbrücke durch Desulfurierung nach Meyer *et al.* und anschließender LC-ESI-MS/MS-Analytik zur Identifizierung der Labioninamino-säure war nicht erfolgreich.^[116] Im Zuge der Strukturaufklärung weiterer Klasse III-Lantibiotika gelang es jedoch im Arbeitskreis von Professor Süßmuth durch Dipl.-Chem. Alexandar Pesic ein Protokoll zum Labioninnachweis mittels GC-MS erfolgreich zu etablieren.^[117] Hierzu wurde ein durch chemische Synthese hergestellter Labioninbaustein als Referenzstandard verwendet. Für die Anwendung dieser Methode zur Analyse des LabKC-Reaktionsansatzes wurden Inkubationen mit dem LabA2- und LabA1-Präpropeptid durchgeführt. Die GC-MS Analytik nach Totalhydrolyse und Aminosäurederivatisierung des Reaktionsansatzes von LabA1 und LabA2 zeigte jedoch, dass in beiden Fällen hauptsächlich Lanthionin gebildet wurde (Anhang Abbildung 71 und Abbildung 72). Sowohl für die Analytik der Totalhydrolysate von LabA2 als auch von LabA1 ist in beiden GC-MS-Chromatogrammen

ein deutliches Signal für das derivatisierte Lanthionin mit der charakteristischen Retentionszeit $R_t=27.9$ min zu beobachten. Derivatisiertes Labionin konnte im SIM-Modus sowohl im Reaktionsansatz von LabA2 als auch von LabA1 bei einer Retentionszeit von $R_t=36.3$ min eindeutig identifiziert werden. In beiden Fällen waren die Intensitäten der Signale jedoch äußerst gering. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass bei der enzymatischen Umsetzung von LabA2 und LabA1 durch LabKC, die Verbrückungen der Didehydroalanine mit den C-terminalen Cysteinen hauptsächlich in Form von Lanthioninen gebildet wurden. Eine teilweise inaktive oder unzureichend gefaltete Zyklase-Domäne mit einer ungünstigen Positionierung der Didehydroalanine im aktiven Zentrum könnten wichtige Gründe hierfür sein. In Abbildung 38 sind die beiden postulierten Mechanismen der Labionin- und Lanthioninbildung schematisch skizziert. Für eine korrekte Labioninverbrückung müssen demnach die beiden Didehydroalanine exakt positioniert und für den Angriff des Thiolats ausgerichtet werden. Eine fehlgefaltete, strukturell veränderte Zyklase-Domäne könnte die Bildung von Lanthionin begünstigen. Jedoch muss auch hier der bereits erwähnte Aspekt der spontanen Zyklisierung berücksichtigt werden.

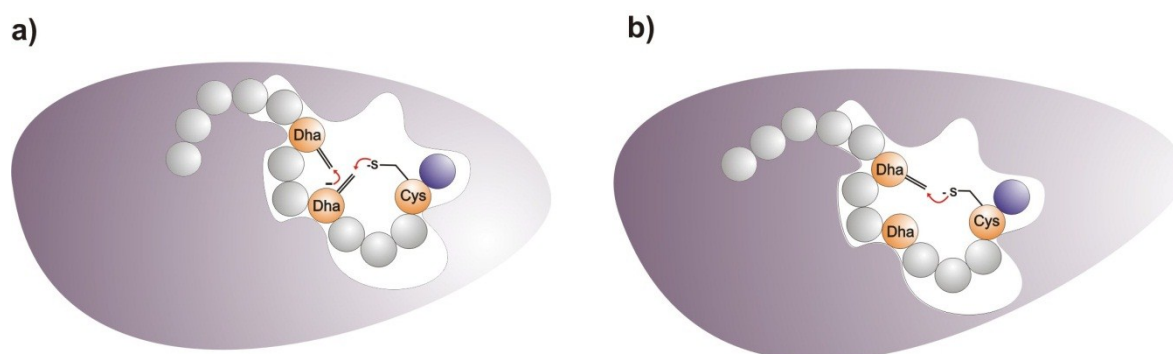


Abbildung 38: Modell zur Zyklisierungsreaktion von LabKC. a) Bildung des Labioninmotivs nach zweifacher Michaeladdition. b) Bildung des Lanthioninrings nach Angriff der Thiolatseitenkette auf das N-terminale Dha.

5.3.5 Optimierung der *in vitro* Assaybedingungen

Für die weitere Optimierung der Umsetzungen durch LabKC sollten wichtige Parameter wie Temperatur, Puffer, pH-Wert, Nukleotidkonzentration sowie das Enzym-zu-Substrat-Verhältnis näher untersucht werden. Für diese Studien wurde eine Peptidvariante mit der Bezeichnung LabA2*_{C8A_C17G} verwendet, in welcher alle in der Sequenz vorkommenden Cysteine gegen Alanin bzw. Glycin ausgetauscht waren (Tabelle 23). Dieses Peptid konnte nach der Synthese in hoher Reinheit gewonnen werden und eignete sich daher sehr gut für die Untersuchung verschiedener Faktoren im Hinblick auf die Optimierung einzelner Assaybedingungen. Bei Inkubation mit LabKC_{His6} wurde diese Peptidvariante vollständig 4-fach dehydratisiert (Abbildung 39). Zusätzlich wurde bei diesen Inkubationen im Vergleich zum nicht-modifiziertem Peptid eine fünfte Dehydratisierung mit einem Massenshift von Δm -90 Da beobachtet. Da in der Aminosäuresequenz keine weiteren Serine vorhanden sind, muss diese fünfte Dehydratisierung an der Seitenkette von Thr11 erfolgen, welche im LabA2-Wildtyp-Peptid nicht modifiziert wird. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten die fehlenden Cysteinseitenketten sein, wodurch eine Zyklisierung des Peptids nicht möglich ist. Im Falle von LabA2*_{C8A_C17G} wäre somit Thr11 noch zugänglich für eine weitere fünfte Dehydratisierung.

Tabelle 23: Aminosäuresequenz von LabA2 und der Variante ohne Cysteine.

Bezeichnung	Sequenz	Exakte Molekülmasse (Da)
LabA2	MASILELQNL DVEHARGENR-SDWSLWECCSTGSLFACC	4272.88
LabA2* _{C8A_C17G}	MASILELQNL DVEHARGENR-SDWSLWEAASTGSLFAGA	4130.98

In den bisherigen Umsetzungen wurde bei Verwendung einer hohen Substratkonzentration im Vergleich zur eingesetzten Menge an Enzym eine Akkumulation von unvollständig prozessiertem Peptid beobachtet. Um zu evaluieren, welchen Einfluss die eingesetzte Peptidkonzentration auf die Effektivität der Prozessierung hat, wurden Inkubationen von LabKC_{His6} mit LabA2*_{C8A_C17G} bei unterschiedlichen Enzym-zu-Substrat-Verhältnissen durchgeführt (Abbildung 39). Während bei den enzymatischen Umsetzungen mit niedriger Substratkonzentration (1:2 und 1:10) als Hauptprodukte 3-fach und 4-fach dehydratisierte Peptide beobachtet wurden, treten bei Verwendung einer Enzym/Substrat-Konzentration von 1:50 vermehrt phosphorylierte Intermediate, sowie akkumuliertes nicht-modifiziertes Peptid auf. Dieser Effekt verstärkt sich zunehmend bei ansteigenden Substratkonzentrationen.

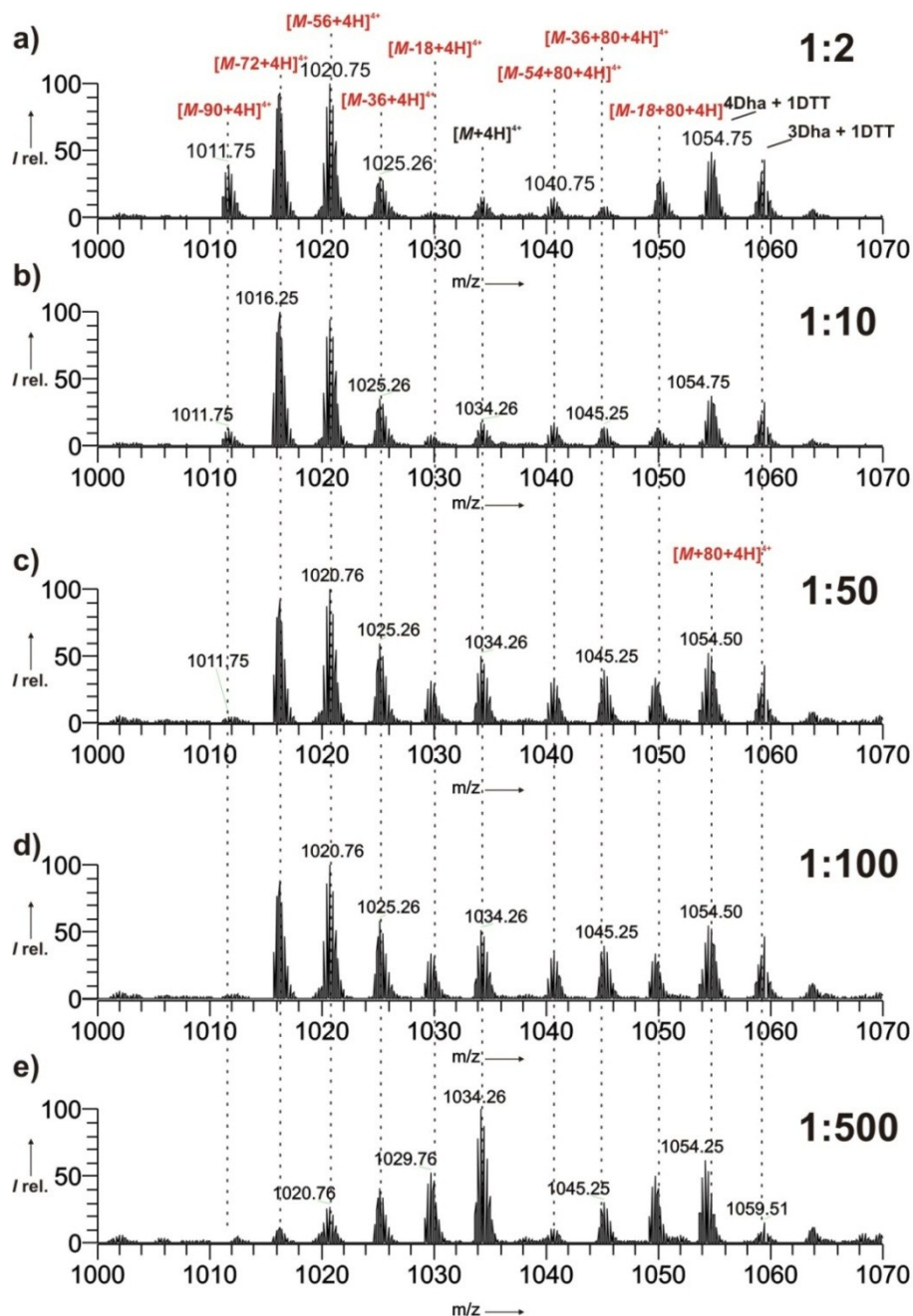


Abbildung 39: LC-ESI-MS Spektren (ESI-Exactive-MS) der Umsetzung von LabA2*_{C8A_C17G} mit LabKC_{His6} bei unterschiedlichen Enzym/Substrat-Verhältnissen: a) 1:2; b) 1:10; c) 1:50; d) 1:100 und e) 1:500. Die Inkubationen erfolgten für jeweils 2 h in 20 mM TES pH 8.0, 2 mM GTP.

Eine mögliche Erklärung für die unvollständige Prozessierung in Gegenwart hoher Konzentrationen an Präpropeptid könnte eine schwache Wechselwirkung von LabKC mit dem Substrat, insbesondere in fortgeschrittenen Stadien der Umsetzung sein. Gebundenes, bereits teilweise dehydratisiertes LabA2*_{C8A_C17G} könnte somit durch im Überschuss vorhandenes, unmodifiziertes Peptid leicht aus dem aktiven Zentrum des Enzyms verdrängt werden. Bei niedriger Substratkonzentration bleibt hingegen das Peptid am Enzym gebunden und wird vollständig dehydratisiert.

Weiterhin sollte die zeitabhängige Prozessierung des Modellpeptids LabA2*_{C8A_C17G} durch LabKC untersucht werden. In parallelen Ansätzen wurde LabKC_{His6} mit LabA2*_{C8A_C17G} mit einem Enzym/Substratverhältnis von 1:2 inkubiert. Die Reaktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von 50 % Methanol abgestoppt und die Ansätze anschließend über LC-ESI-MS auf erfolgte Dehydratisierungen analysiert (Abbildung 40). Es zeigte sich, dass nach einer Inkubationsdauer von 1 min hauptsächlich nur einfach phosphoryliertes sowie einfach dehydratisiertes Peptid entstanden war. Bereits nach 5 min konnte 4-fach dehydratisiertes LabA2*_{C8A_C17G} sowie alle weiteren möglichen Intermediate in annähernd gleichen Intensitäten beobachtet werden. Nach 15-minütiger Reaktion waren 3-fach und 4-fach dehydratisierte Peptide die Hauptprodukte, das Edukt war nur noch in geringen Mengen detektierbar. Mit fortschreitender Inkubationszeit wurden alle Zwischenstufen bis zum 5-fach dehydratisierten Peptid weiter prozessiert. Auffällig ist, dass das Peptid mit drei Eliminierungen, auch nach einer Inkubationszeit von 4 h nicht mehr effektiv weiter prozessiert werden konnte. Weiterhin war bei dem 3-fach und 4-fach dehydratisierten Peptid eine vermehrte Adduktbildung der Didehydroalanine mit dem im Reaktionsansatz vorhandenen DTT zu beobachten. Im Vergleich zum 1-fach phosphorylierten Peptid ($\Delta m = +80$) besitzt das 4-fach dehydratisierte Peptid mit DTT-Addukt einen Massenshift von $\Delta m = +82$ und konnte somit bei der hochauflösenden MS-Analytik eindeutig identifiziert werden. Die Position des gebildeten DTT-Addukts konnte bei der Umsetzung der Variante LabA2* (LabA2 mit den Substitutionen C9A und C18A) durch LabKC und anschließendem Trypsin-Verdau mittels LC-MS/MS dem ersten gebildeten Dha im Peptid zugeordnet werden (Anhang Abbildung 79).

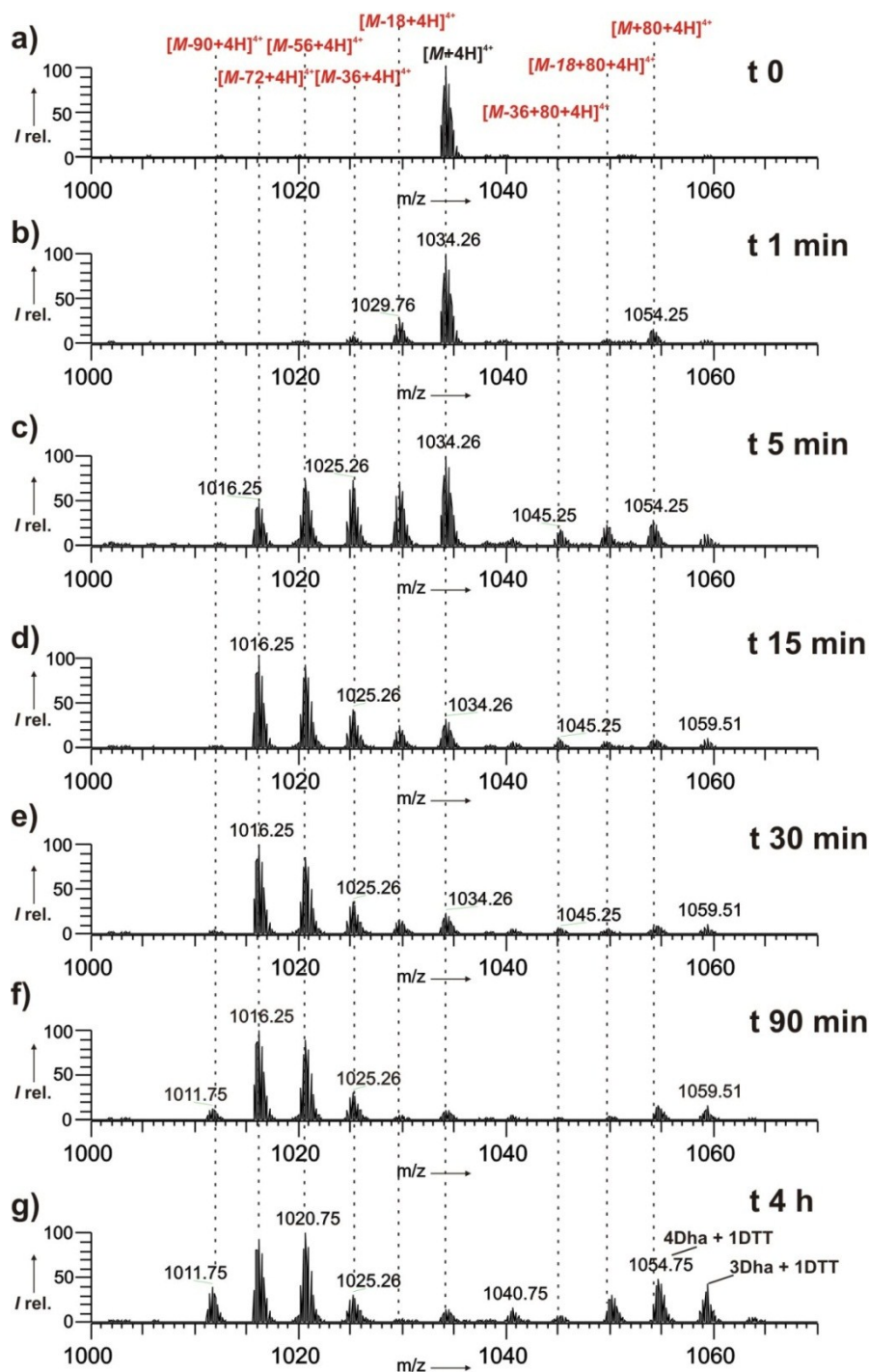


Abbildung 40: LC-ESI-MS-Spektren (ESI-Exactive-MS) zur Untersuchung der zeitabhängigen Prozessierung von LabA2*_{C8A_C17G} durch LabKC. Die Inkubationen wurden mit einem Enzym/Substratverhältnis von 1:2 in 20 mM TES pH 8.0, 2 mM GTP bei 28 °C durchgeführt und wurden nach folgenden Zeitpunkten gestoppt: a) 0 min, b) 1 min, c) 5 min d) 15 min, e) 30 min, f) 90 min und g) 4 h.

Im Zuge weiterer Untersuchungen sollte der Einfluss von Pufferkomponenten, pH-Wert, GTP-Konzentration und Temperatur auf die Aktivität des Enzyms getestet werden. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass die Wahl des Puffers mit Ausnahme von

Natriumphosphat keinen gravierenden Einfluss auf die Effektivität der Prozessierung hat. Im Hinblick auf die Dehydratisierung von LabA2*_{C8A_C17G} zeigten MOPS, Tricin, TES und Tris keine signifikanten Unterschiede. Demgegenüber war die Aktivität des Enzyms bei Verwendung von Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) deutlich erniedrigt (Anhang Abbildung 74, Abbildung 75 und Tabelle 28). Ebenso bei Inkubationen in Puffer mit leicht saurem pH zeigte sich eine stark reduzierte Dehydratisierungsaktivität von LabKC. Dies war vor allem bei den Umsetzungen in MOPS pH 6.3 mit deutlich verringerter und NaH_2PO_4 pH 6.0 mit keiner Prozessierung von LabA2*_{C8A_C17G} zu beobachten. In den Ansätzen bei pH 7-9 traten keine signifikanten Unterschiede auf, das Peptid wurde hier vollständig durch LabKC_{His6} dehydratisiert. Aufgrund der möglichen Reaktivität freier Dha-Reste mit den Cysteinseitenketten im basischem pH-Bereich, unter Ausbildung von Thioetherverbrückungen, wurden die weiteren Umsetzungen im neutralen Bereich bei pH 7.0 bis 7.5 durchgeführt. Dadurch sollte eine spontane Zyklisierungsreaktion möglichst unterbunden werden. Weiterhin wurde getestet, ob die GTP-Konzentration im Assay ein limitierender Faktor für die Aktivität von LabKC darstellt. Dabei wurde wiederum das Peptid LabA2*_{C8A_C17G} eingesetzt, unter Verwendung unterschiedlicher GTP-Konzentrationen von 0.1 bis 10 mM GTP. Nach Beendigung der Inkubation bei 28 °C wurden die Ansätze mittels LC-ESI-MS analysiert, wobei keine Unterschiede hinsichtlich der Effektivität der Umsetzung beobachtet wurden. In allen Ansätzen war das 4-fach dehydratisierte Peptid das Hauptprodukt (Anhang Abbildung 76). Nahezu kein Umsatz konnte jedoch bei Entfernung von MgCl_2 aus dem Reaktionsansatz beobachtet werden, Mg^{2+} ist demzufolge für die Dehydratisierung durch LabKC essentiell (Anhang Abbildung 76).

Die Abhängigkeit des Assays von der Temperatur wurde bei 15, 28, 32 und 37 °C überprüft. Alle Inkubationen wurden mit einem Enzym-zu-Substrat-Verhältnis von 1:10 durchgeführt. In allen Fällen wurde LabA2*_{C8A_C17G} zum 4-fach dehydratisieren Hauptprodukt umgesetzt. Zwischen den einzelnen Inkubationen sind nur geringe Unterschiede zu sehen, jedoch treten bei 32 und 37 °C vermehrt Intermediate mit DTT-Addukten auf. Standardmäßig wurde bei allen weiteren Versuchen eine Inkubationstemperatur von 28 °C gewählt, da dies auch der Kultivierungstemperatur von *Actinomadura namibiensis* für die *in vivo*-Produktion der Labyrinthopeptine entspricht. Ein Aktivitätsverlust von LabKC mit fortschreitender Inkubationsdauer für einen Zeitraum von 2 h wurde nicht beobachtet. Durch erneute Substratzugabe in Abständen von je 30 min bei gleichbleibender Enzymkonzentration konnte dies gezeigt werden (Anhang Abbildung 78 und Tabelle 32). Selbst nach 2 h Inkubation konnte LabKC neu hinzugegebenes LabA2*_{C8A_C17G} noch vollständig dehydratisieren.

5.3.6 Leaderpeptid abhängige Prozessierung von LabKC

Wie bereits in Abschnitt 1.2.4 erläutert wurde, besitzen die Leaderpeptide von Lantibiotika wichtige Funktionen bezüglich der Selbstimmunität des Produzenten, als Erkennungssequenz für den extrazellulären Transport und die posttranslational modifizierenden Enzyme. Während die Rolle des Leaderpeptids von Klasse I- und II-Lantibiotika bereits detailliert charakterisiert wurde, fehlen bislang entsprechende Untersuchungen für Leaderpeptide von Klasse III-Lantibiotika. Mit dem in dieser Arbeit entwickelten und optimierten *in vitro*-Assay, sollte nun die Bedeutung des Leaderpeptids für die Prozessierung der Labyrinthopeptine durch LabKC untersucht werden. Da für die detaillierte Charakterisierung der Funktionalität des Leaderpeptids zahlreiche Peptide hergestellt und getestet werden mussten, erschien es günstig, vereinfachte LabA2-Varianten als Ausgangssequenzen zu verwenden. Die an der Bildung der Disulfidbrücke von LabA2 beteiligten Cysteine (Cys9 und Cys18) wurden zunächst jeweils durch Alanin ersetzt. Bei der Synthese dieser als LabA2* bezeichneten Variante konnte der Anteil an Nebenprodukten im Vergleich zum LabA2-Präpropeptid deutlich verringert werden. Nach Inkubation mit LabKC_{His6} zeigte die anschließende Analytik mittels LC-ESI-MS die vollständige (4-fache) Dehydratisierung von LabA2* (Anhang Abbildung 80). Weiterhin wurde eine verkürzte LabA2**-Variante bestehend aus dem LabA2-Leaderpeptid und den ersten neun Aminosäuren des LabA2*-Propeptids synthetisiert und getestet. Auch dieses Peptid wurde von LabKC_{His6} vollständig (2-fach) dehydratisiert (Anhang Abbildung 81). Diese beiden strukturell vereinfachten LabA2-Varianten dienten als Basis für die folgenden Peptidsynthesen zur Charakterisierung des Leaderpeptids.

5.3.6.1 Identifizierung der Erkennungssequenz

In einem ersten Experiment sollte zunächst getestet werden, ob eine Prozessierung des LabA2-Propeptids auch ohne das *N*-terminale Leaderpeptid möglich ist. Hierzu wurde das wiederum durch Peptidsynthese an fester Phase gewonnene und anschließend *N*-terminal acetylierte LabA2*-Propeptid (Ac-LabA2*₁₋₁₈) (20 µM) mit LabKC_{His6} (1 µM) für 2 h inkubiert und anschließend mittels LC-ESI-MS analysiert. Durch die Acetylierung des *N*-Terminus sollten möglicherweise störende Ladungseffekte in Bezug auf die Substrat-Enzym-Wechselwirkung unterbunden werden. Die Analytik dieses Umsatzes zeigte, ebenso wie der Kontrollansatz ohne Enzym, jedoch keinen Massenshift in Form einer Wasserabspaltung oder Phosphorylierung (Anhang Abbildung 82). Auch bei Inkubation von Ac-LabA2*₁₋₁₈ mit LabKC_{His6} in Gegenwart des amidierten LabA2-Leaderpeptids (LabA2₂₀₋₁CONH₂) erfolgte keine Modifikation der Serinseitenketten im Peptid. Entsprechende Experimente wurden bereits am Klasse II-Lantibiotikum Lacticin481 *in vitro* durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das Lacticin481-Propeptid auch ohne Leadersequenz dehydratisiert wurde, wenngleich nicht vollständig^[56] Durch erneute

Zugabe des separierten Leaderpeptids in den Enzymansatz konnte im Fall der Lacticin481-Synthetase die Prozessierungsaktivität weiter gesteigert werden. Die Autoren postulierten aufgrund dieser Beobachtungen einen Aktivierungsmechanismus des Leaderpeptids für das modifizierende Enzym. Im Falle von LabKC zeigten jedoch bereits diese ersten Untersuchungen, dass für die erfolgreiche Prozessierung des LabA2-Propeptids das Leaderpeptid essentiell ist.

In den folgenden Versuchen sollte der genaue Mechanismus der Leaderpeptid-abhängigen Prozessierung im Detail untersucht werden. Durch sukzessive Einkürzungen des Leaderpeptids wurde zunächst geprüft, ob eine minimale Erkennungssequenz für LabKC vorliegt. Hierzu wurde zunächst eine Serie von Peptiden synthetisiert, deren Leaderpeptid *N*-terminal bzw. *C*-Terminal eingekürzt wurde (Tabelle 24).

Tabelle 24: Zusammenfassung synthetisierter und auf Umsetzung mit LabKC getesteter Präpropeptidvarianten von LabA2. Serinseitenketten, an denen eine Dehydratisierung zu erwarten war, sind gelb unterlegt. Ergänzte bzw. verschobene Sequenzabschnitte sind grün hervorgehoben.

Bezeichnung	Leaderpeptid	Propeptid	a)	b)
(1) LabA2	MASILELQNLDVEHARGENR-	SDW SLWECC STG SLFACC	4	4
(2) LabA2*	MASILELQNLDVEHARGENR-	SDW SLWECA STG SLFACA	4	4
(3) LabA2 ₋₂₀₋₁ CONH ₂	MASILELQNLDVEHARGENR-	CONH ₂	0	0
(4) Ac-LabA2* ₁₋₁₈		Ac-SDW SLWECA STG SLFACA	4	0
(5) LabA2**	MASILELQNLDVEHARGENR-	SDW SLWECA	2	2
<i>N-terminale Einkürzung des Leaderpeptids</i>				
(6) LabA2* _{Δ(-20 -14)}	LQNLDVEHARGENR-	SDW SLWECA STG SLFACA	4	0
(7) LabA2* _{Δ(-20 -7)}	HARGENR-	SDW SLWECA STG SLFACA	4	0
(8) LabA2** _{Δ(-20 -19)}	SILELQNLDVEHARGENR-	SDW SLWECA	2	2
(9) LabA2** _{Δ(-20 -18)}	IILELQNLDVEHARGENR-	SDW SLWECA	2	2
(10) LabA2** _{Δ(-20 -17)}	LELQNLDVEHARGENR-	SDW SLWECA	2	0
(11) LabA2** _{Δ(-20 -16)}	ELQNLDVEHARGENR-	SDW SLWECA	2	0
<i>C-terminale Einkürzung des Leaderpeptids</i>				
(12) LabA2* _{Δ(-8 -2)}	MASILELQNLDV-----R-	SDW SLWECA STG SLFACA	4	2
(13) LabA2* _{Δ(-12 -2)}	MASILELQ-----R-	SDW SLWECA STG SLFACA	4	1
(14) LabA2* _{Δ(-14 -2)}	MASILE-----R-	SDW SLWECA STG SLFACA	4	0
(15) LabA2* _{shift}	MASDVEHA IILELQNL RGENR-	SDW SLWECA STG SLFACA	4	2
(16) LabA2** _{ex.}	MASILELQNLDVEHAR DLQ AGENR-	SDW SLWECA	2	2
(17) SapB _{-20 -1} LabA2 ₁₋₉	MNLFDLQSMETPK EEAMQ DV-	SDW SLWECA	2	2

a) Anzahl der erwarteten Dehydratisierungen

b) Anzahl der beobachteten Dehydratisierungen

Um die Vergleichbarkeit der Prozessierungseffizienz bezüglich der Anzahl der beobachteten Dehydratisierungen und Phosphorylierungen zwischen den einzelnen Varianten zu gewährleisten, wurden in den Assays jeweils identische Mengen an Enzym (0.7 μM) und Peptid (10 μM) eingesetzt. Bei den ersten Durchführungen des Assays zeigten zwei um 6 (LabA2* $\Delta_{(-20 \text{ } -14)}$) und 13 (LabA2* $\Delta_{(-20 \text{ } -7)}$) Aminosäuren *N*-terminal verkürzte Peptide nach Inkubation mit LabKC_{His6} keine Modifikationen (Anhang Abbildung 84). Im Gegensatz dazu erfolgte bei Inkubation von Peptiden mit *C*-terminaler Einkürzung des Leaderpeptids mit LabKC_{His6} noch eine Umsetzung.

Bei der Synthese dieser *C*-terminalen Einkürzungen im Leaderpeptid wurde Arg-1, die zum Propeptid benachbarte Aminosäure, nicht deletiert. Grund hierfür war die Funktion dieses Restes als Ladungsträgers, welcher eine bessere Ionisation und Detektion des mehrfach geladenen Ions bei der Analytik mittels LC-MS gewährleistete. Weiterhin stellt Arg-1 eine Spaltstelle für Trypsin dar und ermöglicht somit eine bessere Analytik des Propeptids über LC-ESI-MS/MS-Fragmentierung. Im Fall der enzymatischen Umsetzung des um sieben Aminosäuren *C*-terminal eingekürzten Leaderpeptids (LabA2* $\Delta_{(-8 \text{ } -2)}$) konnte als Hauptprodukt ein Peptid mit zwei Dehydratisierungen detektiert werden (Abbildung 41). Bei der Umsetzung des um 11 Aminosäuren deletierten Peptids (LabA2* $\Delta_{(-12 \text{ } -2)}$) wurde nach LC-ESI-MS-Analytik das einfach dehydratisierte Peptid identifiziert. Eine dritte Variante, die nur noch die ersten sechs Aminosäuren des Leaderpeptids enthielt (LabA2* $\Delta_{(-14 \text{ } -2)}$), wurde von LabKC im Gegensatz zu den vorangegangenen Peptiden nicht mehr dehydratisiert bzw. phosphoryliert (vgl. Tabelle 24).

Diese ersten Versuche deuten darauf hin, dass es innerhalb des Leaderpeptids einen bestimmten Sequenzabschnitt geben muss, der für die Erkennung bzw. Bindung durch LabKC von entscheidender Bedeutung ist. Die Deletion der sechs *N*-terminalen Aminosäuren mit dem damit verbundenen Verlust der Prozessierung durch LabKC zeigt, dass der Sequenzabschnitt in diesem Bereich des Leaderpeptids von besonderer Bedeutung zu sein scheint. Demgegenüber werden Einkürzungen von bis zu 11 *C*-terminalen Aminosäuren von LabKC noch toleriert, wobei hier nach der Umsetzung nur noch ein Dehydratisierungsereignis stattfand.

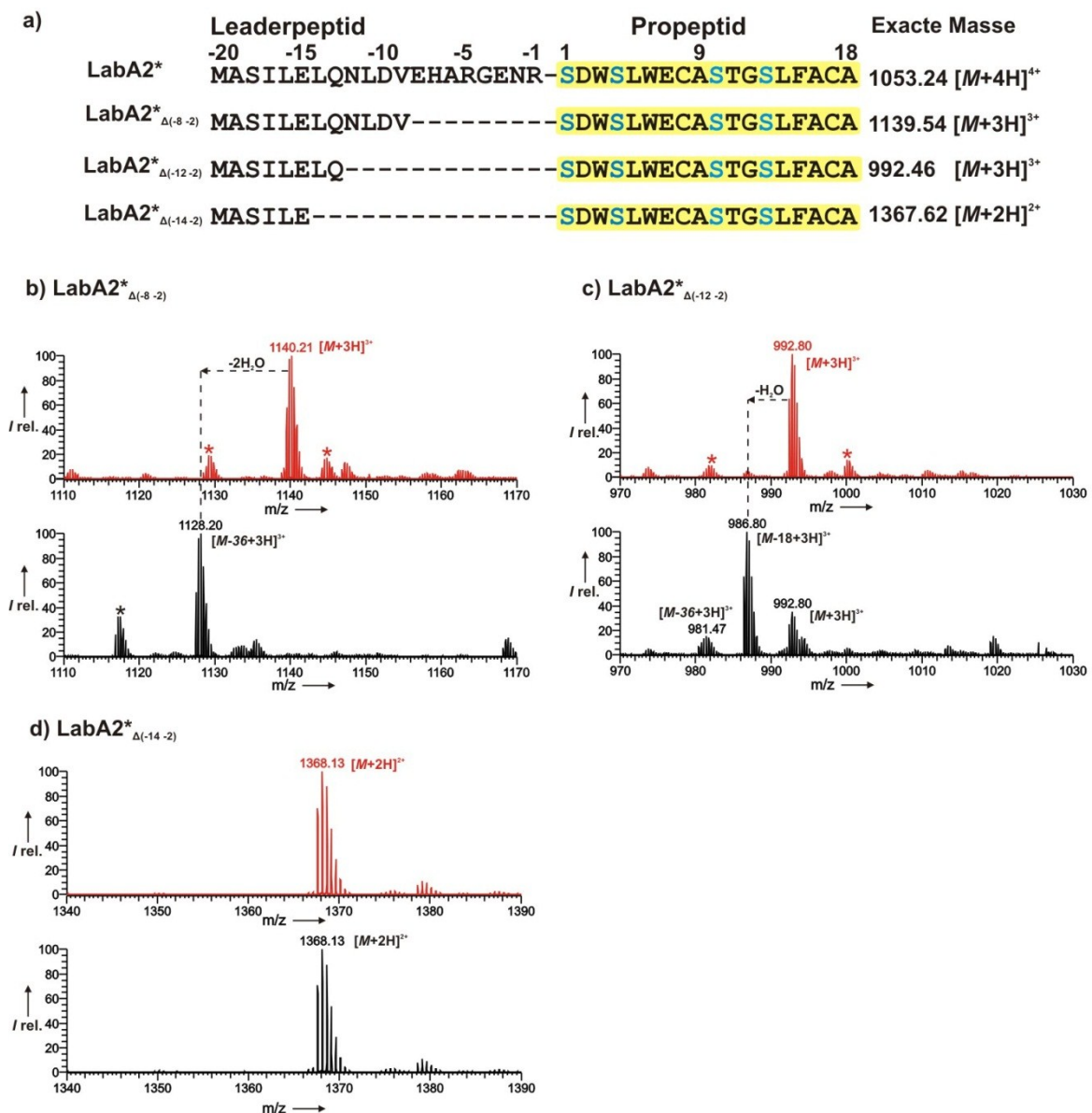


Abbildung 41: Testierung von Peptiden mit C-terminalen Einkürzungen des Leaderpeptids. a) Sequenzen der verwendeten Peptide im Vergleich zu LabA2*. b)-d): LC-HR-ESI-MS (ESI-Exacte-MS) der drei getesteten Peptide (rot = Kontrollansätze ohne LabKC; schwarz = Ansätze nach Inkubation mit LabKC_{His6} für 2 h); b) $[M+3H]^{3+}$ -Ionen des Peptids LabA2* _{$\Delta(-8-2)$} ; c) $[M+3H]^{3+}$ -Ionen des Peptids LabA2* _{$\Delta(-12-2)$} ; d) $[M+2H]^{2+}$ -Ionen des Peptids LabA2* _{$\Delta(-14-2)$} . Mit „*“ markierte Signale entsprechen Nebenprodukte aus der Peptidsynthese.

Um diese Annahme zu untermauern, wurde eine weitere Serie von LabA2-Präpropeptidvarianten mit schrittweiser *N*-terminaler Einkürzung der Leadersequenz synthetisiert und getestet. Die Planung dieser Sequenzen erfolgte aufgrund der schnelleren und leichteren Synthese auf Basis von LabA2**-Analoge mit verkürzter Propeptidsequenz.

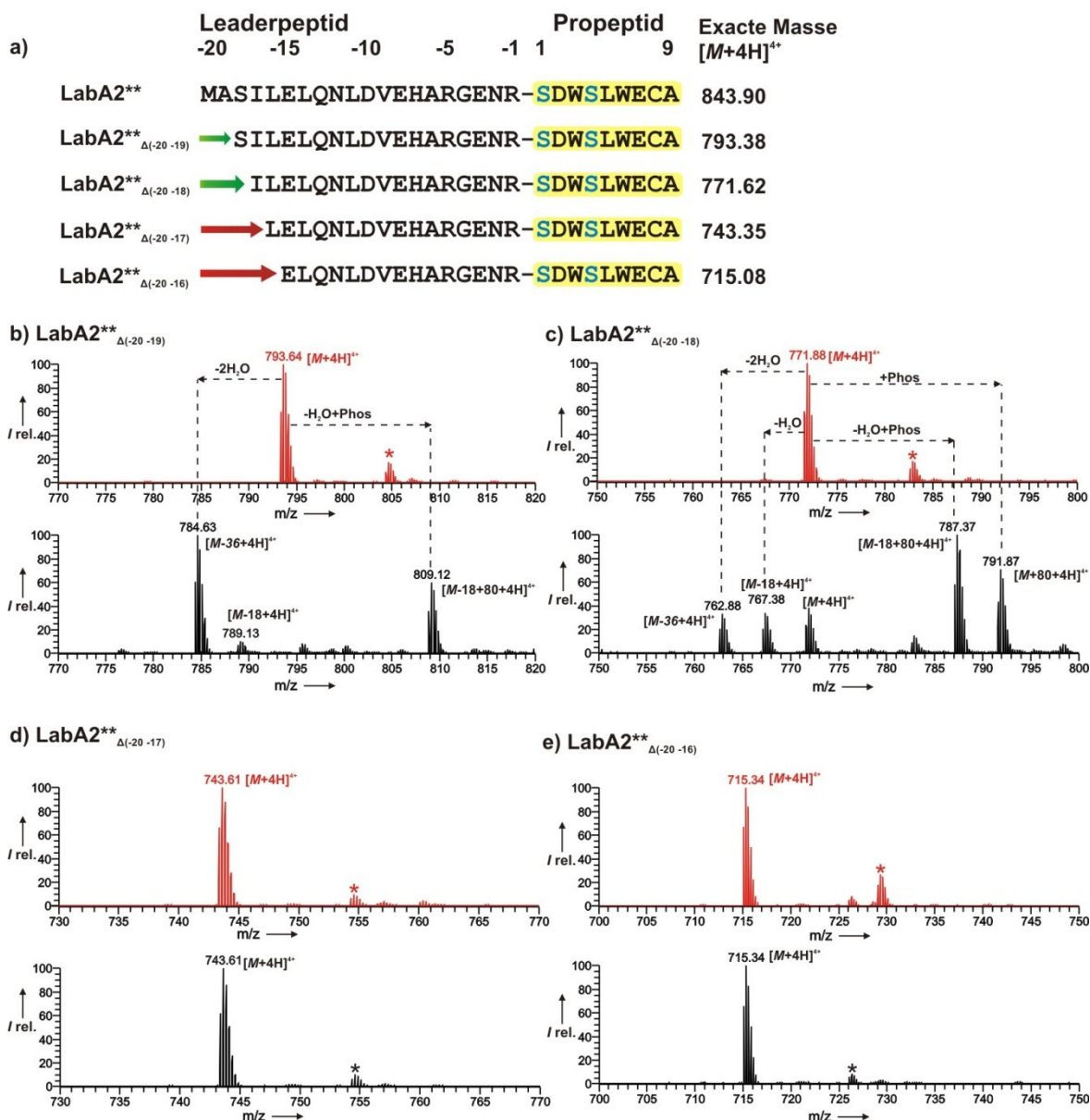


Abbildung 42: Testierung von Peptiden mit schrittweiser *N*-terminaler Einkürzung des Leaderpeptids. a) Sequenzen der verwendeten Peptide im Vergleich zu LabA2**. b)-e): LC-HR-ESI-MS (ESI-Exactive-MS) mit $[M+4H]^{4+}$ -Ionen der vier getesteten Peptide (rot = Kontrollansätze ohne LabKC; schwarz = Ansätze nach Inkubation mit LabKC_{His6} für 2 h). Während die Peptide LabA2** _{$\Delta(-20-19)$} (b) und LabA2** _{$\Delta(-20-18)$} (c) von LabKC_{His6} noch dehydratisiert wurden, zeigten LabA2** _{$\Delta(-20-17)$} (d) und LabA2** _{$\Delta(-20-16)$} (e) keine Modifizierung. Mit „*“ markierte Signale entsprechen Nebenprodukte aus der Peptidsynthese.

Nach erfolgreicher Bereitstellung von sechs Peptiden durch Dipl.-Chem. Paul Enslé wurden diese wie zuvor beschrieben mit LabKC_{His6} und GTP inkubiert und anschließend mit LC-ESI-MS analysiert (Abbildung 42). Die ersten beiden Varianten LabA2**_{Δ(-20 -19)} und LabA2**_{Δ(-20 -18)} wurden von LabKC_{His6} bis zu 2-fach dehydratisiert. Bei dem um drei Aminosäuren eingekürzten LabA2**_{Δ(-20 -18)}-Peptid war jedoch eine Anhäufung von Intermediaten, insbesondere von mono-phosphorylierten Peptiden zu beobachten. Peptide mit Deletionen von vier (LabA2**_{Δ(-20 -17)}) und fünf Resten (LabA2**_{Δ(-20 -16)}) wurden nicht mehr von LabKC modifiziert. Daraus lässt sich wiederum schließen, dass mit Ile-17 der kritische Bereich in Hinblick auf die Erkennungssequenz beginnt. Da Peptide mit C-terminaler Einkürzung bis zu Position Gln-13 (LabA2*_{Δ(-12 -2)}), noch prozessiert werden, bis Glu-15 jedoch nicht mehr (LabA2*_{Δ(-14 -2)}), müssen dies die kritische Position für die Festlegung einer minimalen Sequenz sein, die für die Prozessierung notwendig ist.

Bei den nur unvollständig modifizierten, C-terminal eingekürzten Varianten LabA2*_{Δ(-8 -2)} und LabA2*_{Δ(-12 -2)} stellte sich weiterhin die Frage, welche der Serin-Seitenketten im Propeptid dehydratisiert wurden. Hierzu wurde zunächst nach Umsetzung mit LabKC_{His6} ein tryptischer Verdau zur Abspaltung des Leaderpeptids durchgeführt. Die hieraus resultierenden Peptidfragmente wurden anschließend mittels LC-ESI-MS/MS sequenziert. Im Fall von LabA2*_{Δ(-8 -2)} konnten dabei die zwei beobachteten Dehydratisierungen den Serinen an Position 10 und 13 im Propeptid zugeordnet werden, die beiden ersten Serinseitenketten in der Sequenz des Leaders wurden demzufolge nicht modifiziert (Abbildung 43).

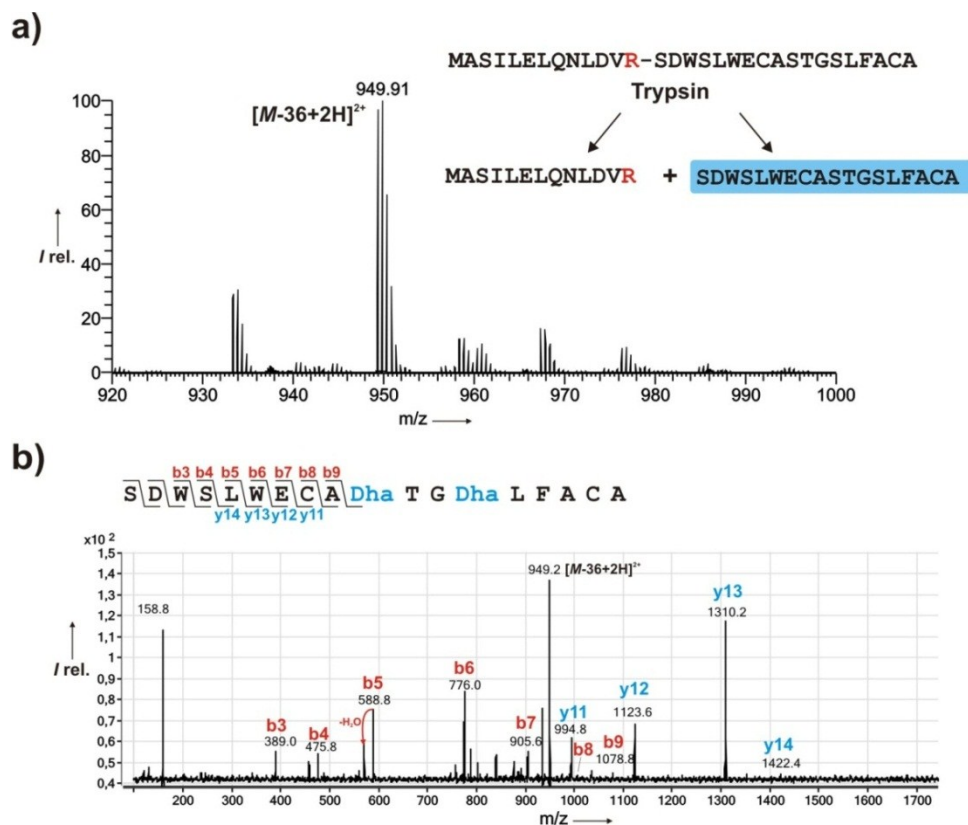


Abbildung 43: a) LC-HR-ESI-MS (ESI-Exacte-MS) von LabA2* $\Delta(-8 -2)$ nach Umsetzung mit LabKC_{His6} und anschließendem Verdau mit Trypsin ($[M-36+2H]^{2+}=949.91$). b) LC-ESI-MS/MS (QQQ-MS)-Spektrum des 2-fach dehydratisierten Propeptids. Identifizierte Fragment-Ionen konnten der N-terminalen Aminosäuresequenz des Peptids zugewiesen werden. Die beiden beobachteten Dehydratisierungen fanden im C-terminalen Abschnitt des Peptids statt. Fehlende Fragment-Ionen in diesem Bereich sind zudem ein Hinweis auf die Zyklisierung der Didehydroalanine über Cys17 zu Lan oder Lab.

Für die einfache Dehydratisierung von LabA2* $\Delta(-12 -2)$ konnte das am C-terminalen Ende der Propeptidsequenz an Position 10 befindliche Serin identifiziert werden (Anhang Abbildung 80). Die Tatsache, dass im Zusammenhang mit dem für die Prozessierung wichtigen N-terminalen Sequenzabschnitt des Leaderpeptids Ser1 und Ser4 im Fall von LabA2* $\Delta(-8 -2)$ sowie Ser1, Ser4 und Ser10 bei LabA2* $\Delta(-12 -2)$ nicht mehr dehydratisiert werden legt den Schluss nahe, dass der C-terminale Bereich des Leaders die Funktion eines Abstandshalters haben könnte. Durch die Bindung des Leaderpeptids an LabKC über den N-terminalen Abschnitt können bei den C-terminal verkürzten Peptidvarianten, abhängig von der Sequenzlänge, nur noch bestimmte Serin-Seitenketten die aktiven Zentren für die Phosphorylierungs- und Eliminierungsreaktion erreichen. Diese Hypothese wurde durch Testierung eines weiteren Peptids bestätigt, in welchem Glu-3 im Leaderpeptid gegen Serin ausgetauscht wurde (LabA2**_{E-3S}). Nach Umsetzung mit LabKC_{His6} wurden maximal nur zwei Dehydratisierungsereignisse beobachtet, der Serinrest an Position -3

blieb jedoch unmodifiziert (Anhang Abbildung 86). Andererseits hatte die Verlängerung des Leaderpeptids um vier Aminosäuren keine Einschränkung hinsichtlich der Prozessierung durch LabKC_{His6} (LabA2**_ex.). Diese Peptidvariante wurde vollständig 2-fach dehydratisiert (Anhang Abbildung 87).

Für die weitere Charakterisierung des wichtigen *N*-terminalen Sequenzabschnittes wurde ein proteinbasiertes, multiples Sequenzalignment mit Präpropeptiden anderer Klasse III-Lantibiotika durchgeführt (Abbildung 41). Der Vergleich der Leadersequenzen von LabA1 und LabA2 mit den entsprechenden Sequenzen aus *Streptomyces coelicolor* (RamS), *Streptomyces griseus* (AmfS), *Streptomyces avermitilis* und *Saccharopolyspora erythraea* zeigte ein hoch konserviertes Motiv im *N*-terminalen Bereich, während die Sequenzabfolge im zentralen und *C*-terminalen Abschnitt sehr heterogen ist. Neben einem konservierten sauren Rest (Asp/Glu) besteht das *N*-terminale-Motiv hauptsächlich aus hydrophoben Seitenketten (Ile, Val, Leu und Phe), sowie die bei allen Peptiden vorkommende Abfolge „LQ“. Sekundärstrukturvorhersagen zeigten zudem die Ausbildung einer helikalen Struktur in diesem Abschnitt des Leaderpeptids.^[118, 119]

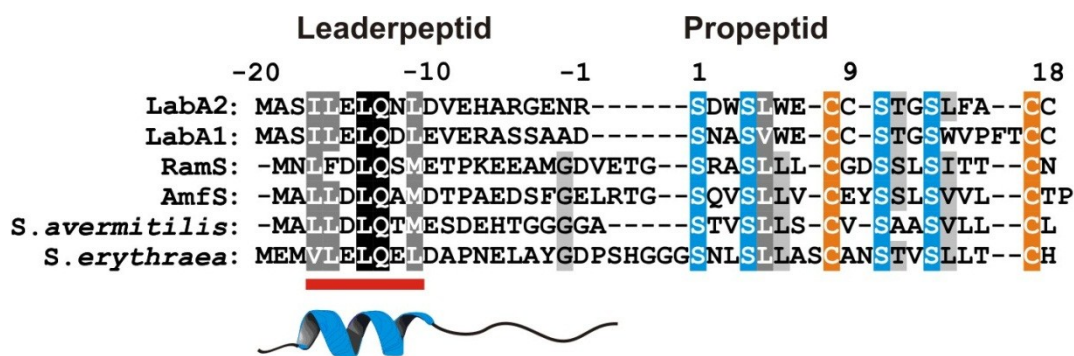


Abbildung 44: Multiples Sequenzalignment von Präpropeptiden der Klasse III-Lantibiotika aus *Actinomadura namibiensis* (LabA1 und LabA2), *Streptomyces coelicolor* (RamS), *Streptomyces griseus* (AmfS), *Streptomyces avermitilis* und *Saccharopolyspora erythraea*. Der hoch konservierte Bereich im Leaderpeptid ist mit einem roten Balken sowie mit einer aus der Sekundärstrukturvorhersage vorgeschlagenen α -Helix gekennzeichnet. Die an der Bildung des Labioninmotivs beteiligten Serin- und Cysteinreste im Propeptid sind blau und braun hervorgehoben.

Um die Funktionalität des konservierten Motivs im *N*-terminalen Bereich zu bestätigen, wurde ein chimäres Peptid bestehend aus den ersten 20 Aminosäuren des Leaderpeptids von SapB (Reste -22 bis -3) sowie dem verkürzten Propeptid von LabA2 (Reste 1-9) synthetisiert (SapB_{-20 -1}_LabA2_{1_9}). Nach Inkubation mit LabKC_{His6} konnte über LC-ESI-MS die maximale, 2-fache Dehydratisierung als Hauptprodukt nachgewiesen werden (Anhang

Abbildung 88). Somit ist eine Erkennung des Leaderpeptids von SapB trotz der starken Unterschiede im C-terminalen Bereich des Leaders möglich.

5.3.6.2 Charakterisierung des Erkennungsmotivs durch Aminosäureaustausche

Die weiteren Untersuchungen sollten nun Aufschluss darüber geben, ob bestimmte Seitenkettenfunktionalitäten des konservierten Motivs einen entscheidenden Einfluss hinsichtlich der Erkennung durch LabKC und somit auf die Effizienz der Prozessierung haben. Hierzu wurde zunächst eine Serie an Peptidvarianten synthetisiert, in denen alle konservierten Aminosäuren schrittweise durch Alanin ersetzt wurden (Tabelle 25). Für einen direkten Vergleich des Einflusses einzelner Aminosäureaustausche auf die Prozessierung durch LabKC wurden zudem alle mit LC-ESI-MS beobachteten Zwischenstufen durch Extraktion der jeweiligen erwarteten Molekülmassen (XIC) relativ quantifiziert (Anhang Tabelle 33). Peptide mit Austausch der hydrophoben Seitenketten I-17A, L-16A und L-14A wurden von LabKC_{His6} noch prozessiert, im Vergleich zum LabA2**-Peptid jedoch mit deutlich geringerer Effizienz. Dies zeigte sich vor allem in der Akkumulation von phosphorylierten und einfach dehydratisierten Intermediaten (Anhang Abbildung 89). Andererseits wurden die Peptide mit Austausch von E-15A (LabA2**_{E-15A}) und Q-13A (LabA2**_{Q-13A}) nahezu vollständig umgesetzt. Ebenso hatten die Ala-Austausche C-terminal des konservierten ILELQ-Motivs keinen negativen Effekt auf die Prozessierung durch LabKC (Anhang Abbildung 90).

Tabelle 25: Getestete LabA2**-Varianten mit Ala-Austauschen.

Bezeichnung	Sequenz
LabA2** _{I-17A}	MAS A LELQNL DVEHARGENR-SDWSLWECA
LabA2** _{L-16A}	MAS I AELQNL DVEHARGENR-SDWSLWECA
LabA2** _{E-15A}	MAS I L A LQNL DVEHARGENR-SDWSLWECA
LabA2** _{L-14A}	MAS I L E AQNL DVEHARGENR-SDWSLWECA
LabA2** _{Q-13A}	MAS I L E L A NLDVEHARGENR-SDWSLWECA
LabA2** _{L-11A}	MAS I L E LQNL A DVEHARGENR-SDWSLWECA
LabA2** _{D-10A}	MAS I L E LQNL A VEHARGENR-SDWSLWECA
LabA2** _{V-9A}	MAS I L E LQNL D A E HARGENR-SDWSLWECA
LabA2** _{E-8A}	MAS I L E LQNL D V A HARGENR-SDWSLWECA

Als nächstes sollte die Bedeutung der beim Alanin-Austausch bereits identifizierten hydrophoben Reste für eine mögliche Interaktion mit LabKC näher untersucht werden (s. Tabelle 26). Hierzu wurden Peptidvarianten mit Austausch gegen Aspartat (D), also unter Einführung einer geladenen, aciden Seitenkette, synthetisiert und getestet. Bei den

Austauschen LabA2**_{I-17D}, LabA2**_{L-16D} und LabA2**_{L-14D} konnte nach Inkubation mit LabKC nahezu keine Umsetzung mittels LC-ESI-MS festgestellt werden (Anhang Abbildung 91 und Tabelle 33). Identische Resultate ergaben sich bei Substitution der Seitenkette von Ile-17 gegen Arg (ionisch) und Asn (polar) (LabA2**_{I-17R} und LabA2**_{I-17N}). Interessanterweise wurde die Einführung einer polaren Gruppe an Position -17 (LabA2**_{I-17T}) toleriert, ebenso wie der Austausch gegen Phe (LabA2**_{I-17F}) und Leu (LabA2**_{I-17L}) (Anhang Abbildung 92). Eine Anhäufung von Intermediaten wurde bei LabA2**-Varianten mit konservativen Austauschen von L-14V und L-16V beobachtet, jedoch war das 2-fach dehydratisierte Peptid auch in diesem Fall das Hauptprodukt (Anhang Abbildung 93).

Tabelle 26: Getestete LabA2**-Varianten mit Austauschen der konservierten hydrophoben Aminosäuren Ile-17, L-16 und L-14 im ILELQN-Motiv des Leaderpeptids.

Bezeichnung	Sequenz
LabA2** _{I-17D}	MAS D LELQNL DVEHARGENR-SDWSLWECA
LabA2** _{L-16D}	MAS I DELQNL DVEHARGENR-SDWSLWECA
LabA2** _{L-14D}	MAS I LE D QNL DVEHARGENR-SDWSLWECA
LabA2** _{I-17N}	MAS N LELQNL DVEHARGENR-SDWSLWECA
LabA2** _{I-17T}	MAS T LELQNL DVEHARGENR-SDWSLWECA
LabA2** _{I-17R}	MAS R LELQNL DVEHARGENR-SDWSLWECA
LabA2** _{I-17L}	MAS L LELQNL DVEHARGENR-SDWSLWECA
LabA2** _{I-17F}	MAS F LELQNL DVEHARGENR-SDWSLWECA
LabA2** _{L-14V}	MAS I LE V QNL DVEHARGENR-SDWSLWECA
LabA2** _{L-16V}	MAS I VE L QNL DVEHARGENR-SDWSLWECA

Insgesamt betrachtet, verdeutlichten diese Ergebnisse, dass für die effektive Prozessierung des LabA2**-Peptids durch LabKC das konservierte ILELQ-Motiv im Leaderpeptid von entscheidender Bedeutung ist. Durch punktuelle Aminosäureaustausche konnten weiterhin die drei hydrophoben Seitenketten Ile-17, L-16 und L-14 als bedeutendste Aminosäuren identifiziert werden. Allerdings ging die Prozessierungsaktivität von LabKC bei Austausch jeweils einer Seitenkette gegen Alanin nicht vollständig verloren. Den größten Einfluss hatte die Einführung von geladenen Resten an diese Positionen, resultierend im nahezu vollständigen Erliegen der Prozessierung durch LabKC. Jedoch befindet sich mit Glu-16 eine geladene Seitenkette zentral im konservierten ILELQ-Motiv. Daraus lässt sich schließen, dass die räumliche Anordnung der Seitenketten im N-terminalen-Motiv von entscheidender Bedeutung bei der Prozessierung ist. Der negative Effekt auf die Prozessierungseffizienz durch Einführung geladener Aminosäureseitenketten in konservierte, hydrophobe Motive konnte auch für die Klasse II-Lantibiotika Mutacin II,

Nukacin und Lacticin481 sowohl *in vivo*, als auch durch *in vitro*-Untersuchungen gezeigt werden.^[120, 121, 123]

In Abbildung 45 sind alle getesteten LabA2**-Varianten mit Austausch einzelner Aminosäuren mit Auswirkung auf die Effizienz der Prozessierung durch LabKC zusammengefasst.

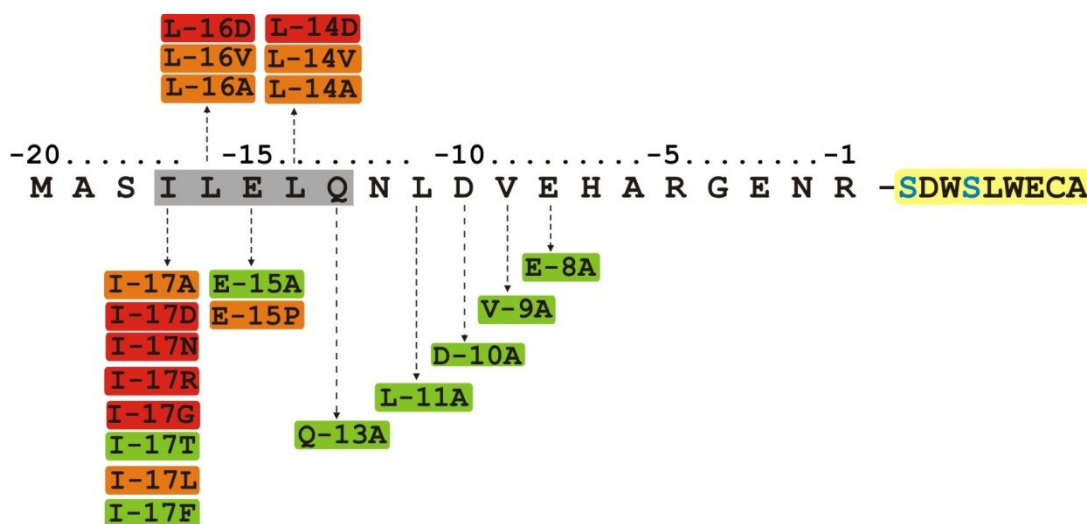


Abbildung 45: Übersicht der getesteten Leaderpeptidvarianten mit Einzelaminosäureaustauschen auf Basis des LabA2**-Peptids. Die Effektivität der Umsetzungen mit LabKC_{His6} ist durch eine farbliche Unterlegung der durchgeführten Aminosäureaustausche gekennzeichnet. Dabei symbolisiert grün eine sehr gute Umsetzung, orange steht für eine verminderte Prozessierung mit Anhäufung phosphorylierter und einfach-dehydratisierter Zwischenstufen. Rot gekennzeichnete Peptide wurden nicht bzw. nur in geringem Maße von LabKC_{His6} modifiziert.

5.3.6.3 Charakterisierung des Leaderpeptids auf struktureller Ebene

Wie aus der Sekundärstrukturvorhersage für das Leaderpeptid hervorgeht, könnte im *N*-terminalen konservierten Bereich eine α -helikale Struktur vorliegen (s. Abbildung 44). Um dies zu überprüfen wurden zunächst LabA2**-Varianten mit Einführung der Reste Gly und Pro in das ILELQ-Motiv synthetisiert. Von diesen Aminosäuren ist bekannt, dass sie Konformationsänderungen in der Sekundärstruktur verursachen (Tabelle 27).^[122] Für die beiden Peptide LabA2**_{L-17G} und LabA2**_{E-15P} konnte nach Inkubation mit LabKC_{His6} noch eine Modifizierung (Phosphorylierung oder Dehydratisierung) beobachtet werden, jedoch mit einer deutlich erniedrigten Effizienz (Abbildung 46). Die maximal 2-fache Dehydratisierung des Peptids war in beiden Fällen kaum noch detektierbar. Vor allem der Austausch der Glutamatseitenkette von Glu-15 gegen Pro war ein Hinweis auf das

Vorhandensein einer Sekundärstruktur, da die Einführung von Ala an dieser Position keinen negativen Einfluss hatte. Entsprechende Studien, mit der durch Insertion von helixbrechenden Prolinresten in das Leaderpeptid hervorgerufen Verminderung der Prozessierungseffizienz, wurden bereits am Beispiel des Klasse II-Lantibiotikums Lacticin481 beschrieben. [123]

Tabelle 27: Sequenzen von LabA2**-Varianten mit Einführung helixbrechender Reste.

Bezeichnung	Sequenz
LabA2** _{L-17G}	MAS G LELQNL DVEHARGENR-SDWSLWECA
LabA2** _{E-15P}	MASIL P LQNL DVEHARGENR-SDWSLWECA

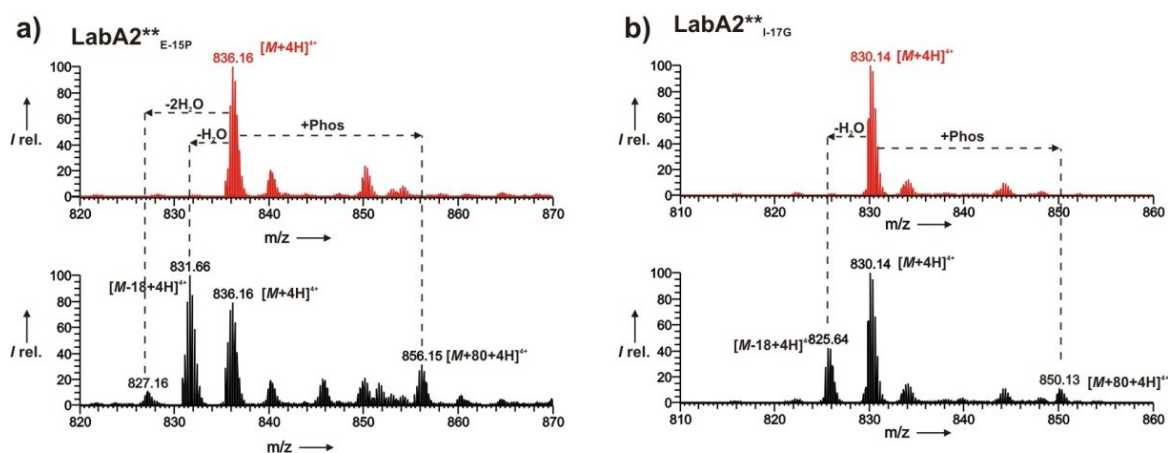


Abbildung 46: LC-HR-ESI-MS (ESI-Exactive-MS) der LabA2-Peptide mit Einführung von helixbrechenden Resten in die Sequenz des Leaderpeptids nach Inkubation mit LabKC_{His6}. a) Umsetzung von LabA2**_{E-15P} und b) LabA2**_{L-17G}. Jeweilige Kontrollansätze ohne Enzym entsprechen den in rot gekennzeichneten Spektren. Weitere Informationen bezüglich der Molekülmassen und Umsatzeffizienz sind in Tabelle 33 aufgeführt.

Um weitere Informationen im Hinblick auf die Sekundärstruktur zu erhalten, wurden Circular dichroismus-Messungen mit dem amidierten LabA2-Leaderpeptid durchgeführt (LabA2-₂₀₋₁CONH₂). Abbildung 47 zeigt die aufgezeichneten Spektren von LabA2-₂₀₋₁CONH₂ unter Verwendung von H₂O sowie verschiedener Konzentrationen an Trifluorethanol (TFE) als Lösungsmittel. Während in Gegenwart von H₂O keine signifikante Sekundärstruktur erkennbar ist, zeigen die Spektren mit ansteigender TFE-Konzentration die deutliche Ausbildung einer α -helikalen Struktur mit einem Minimum bei $\lambda = 207$ nm. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Ausbildung einer α -Helix zumindest prinzipiell möglich ist, obgleich die Messung in Gegenwart von TFE nicht den physiologischen Bedingungen entspricht. Die Verwendung von TFE als α -Helix-

induzierendes Lösungsmittel wurde bereits für zahlreiche Beispiele von Klasse I-Lantibiotika beschrieben.^[17]

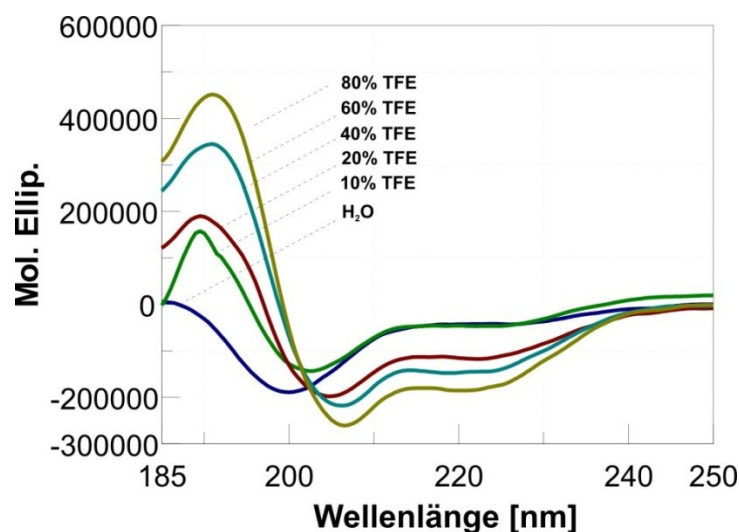


Abbildung 47: Spektren der CD-Messungen mit dem amidierten Leaderpeptid von LabA2 (LabA2-₂₀₋₁CONH₂). Die Spektren wurden in Wasser und ansteigenden Konzentrationen an TFE aufgezeichnet.

5.3.6.4 Modell für die Leaderpeptid-abhängige Prozessierung

Zusammenfassend konnte durch diese Untersuchungen ein konserviertes, hydrophobes ILELQ-Motiv im *N*-terminalen Bereich der Leadersequenz identifiziert werden, welches für die erfolgreiche und effiziente Prozessierung des Propeptids essentiell ist. Im Gegensatz dazu ist der *C*-terminale Abschnitt des Leaderpeptids für die Erkennung und anschließende Modifizierung durch LabKC nicht notwendig, limitiert jedoch über die Sequenzlänge das Ausmaß der Dehydratisierung im Propeptid. Dies wurde nochmals mit einem Peptid getestet, in welchem das *N*-terminal konservierte Motiv in den *C*-terminalen Bereich des Leaders verschoben wurde (LabA2*_{shift}). Nach Analyse des Reaktionsansatzes mit LabKC zeigte sich, dass in diesem Fall von den maximal vier möglichen Dehydratisierungen effektiv nur noch zwei stattgefunden haben, wobei beide Serinseitenketten-Eliminierungen im *C*-terminalen Bereich lokalisiert wurden (Anhang Abbildung 94).

Ähnliche Ergebnisse zeigen Studien zur Bedeutung des FNLD-Motivs bei Nisin. Auch hier wurde eine Erkennung über diesen bei Klasse I-Lantibiotika *N*-terminal konservierten Sequenzabschnitt, sowie die abstandsabhängige Prozessierung postuliert.^[124] Weitere analoge Erkenntnisse wurden für Lacticin481 und das Lassozeptid Microcin J25 berichtet. In diesen Fällen ist jedoch nur der *C*-terminale Abschnitt für die Erkennung der modifizierenden Enzyme entscheidend.^[125, 126] Die Bedeutung des Leaderpeptids für die

Prozessierung wurde auch detailliert am Beispiel von Mircocin B17 untersucht. Interessanterweise gibt es auch hier ein *N*-terminales hydrophobes Bindemotiv mit α -helikaler Struktur, welches über einen Polyglycin-Linker mit dem Propeptid verbunden ist.^[127, 128]

In einem Modell für die Leaderpeptid-abhängige Modifizierung der Labyrinthopeptine könnte eine Bindung des Leaderpeptids an LabKC über die hydrophoben Seitenketten des ILELQ-Motivs im *N*-terminalen Abschnitt erfolgen, welcher eine α -helikale Struktur aufweist. Während der Prozessierung bliebe das Leaderpeptid über das Erkennungsmotiv an LabKC gebunden, während die zu modifizierenden Serin-Seitenketten des Propeptids die aktiven Zentren der Kinase- und Lyase-Domäne erreichen können (Abbildung 48). Über die Länge dieses *Spacer*-Arms des Leaderpeptids wird zudem reguliert, welche Reste phosphoryliert und eliminiert werden können.

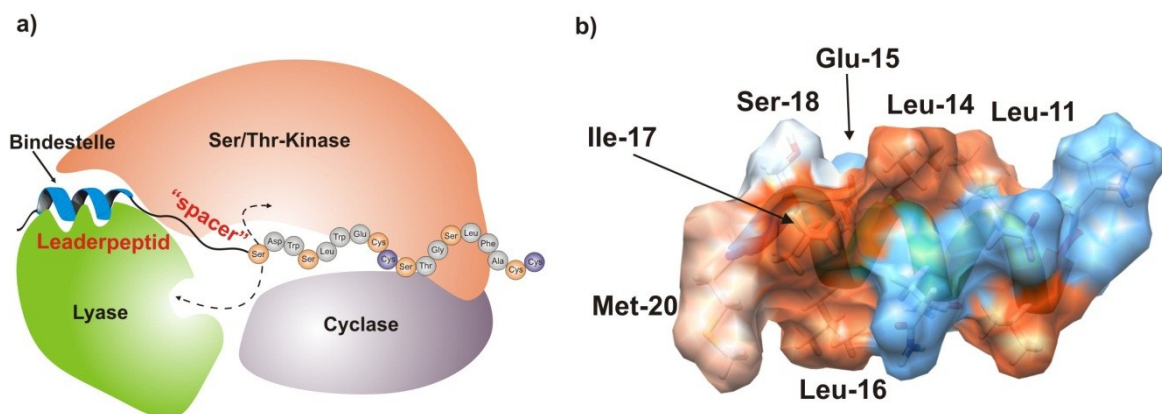


Abbildung 48: a) Modell für die Leaderpeptid-abhängige Prozessierung von LabA2 durch LabKC. In diesem Schema wurde eine gemeinsame Bindestelle des Leaderpeptids für die Kinase- und Lyase-Domäne postuliert. Nach Bindung des Leaders über eine *N*-terminale Erkennungssequenz bleibt dieses während der Prozessierung am Enzym gebunden, der *C*-terminale Bereich des Leaders dient als *Spacer* zwischen Bindestelle und den zu modifizierenden Ser/Thr-Seitenketten. b) Modell für die Bindestelle im *N*-terminalen Bereich des LabA2-Leaderpeptids. Die räumliche Ausrichtung der konservierten hydrophoben Seitenketten von Ile-17, Leu-16 und Leu-15 wird durch eine α -Helix vorgegeben.

5.3.7 Untersuchung der Eliminierungsreaktion mit phosphorylierten Peptidsubstraten

Um weitere Einblicke in den Mechanismus der Eliminierungsreaktion zu erhalten, wurden von Dipl.-Chem. Paul Ensle phosphorylierte Peptidderivate synthetisiert und auf Umsetzung durch LabKC getestet (Tabelle 28). Da diese Peptide nach der Synthese noch zahlreiche Verunreinigungen und Nebenprodukte aufwiesen, wurde zunächst eine Reinigung mittels präparativer RP-HPLC durchgeführt (Abschnitt 4.3.8). Die reinsten Fraktionen wurden anschließend für den Enzym-Assay verwendet.

Tabelle 28: Getestete phosphorylierte LabA2-Varianten. Phosphorylierte Serine sind mit „p“ gekennzeichnet.

Bezeichnung	Sequenz
LabA2** _{$\Delta(-20-1)$pS pS4}	pSDWpSLWEC
LabA2** _{pS4}	MASILELQNL DVEHARGENR-SDWpSLWECA
LabA2** _{pS1}	MASILELQNL DVEHARGENR-pSDWSLWECA
LabA2** _{pS1 pS4}	MASILELQNL DVEHARGENR-pSDWpSLWECA

Zu Beginn der Untersuchungen wurde ein Peptid, bestehend aus den ersten acht Aminosäuren des LabA2-Propeptids, mit zwei phosphorylierten Serinseitenketten (LabA2** _{$\Delta(-20-1)$ pS1_pS4}), getestet. Bei der Analytik mittels LC-ESI-MS stellte sich heraus, dass die phosphorylierten Serine eine große Stabilität bei der Ionisation zeigten. Eine spontane Eliminierung des Phosphatrestes in der MS-Quelle (*in-source* Fragmentierung) wurde nicht beobachtet. Nach Inkubation mit LabKC_{His6} konnte im Massenspektrum die Eliminierung eines Phosphatrestes mit dem Massenshift Δm -98 Da festgestellt werden (Anhang Abbildung 95). Ein Produkt mit Verlust des zweiten Phosphats trat nicht auf. Durch anschließende Fragmentierung des einfach eliminierten Peptids mittels LC-ESI-MS/MS konnte die selektive Eliminierung des Phosphoserins an Position 4 gezeigt werden. Fehlende Fragment-Ionen im C-terminalen Bereich des Peptids deuteten zudem auf eine erfolgte Zyklisierung zwischen Cys8 und Ser4 hin (Anhang Abbildung 96). Die unvollständige Eliminierung aller Phosphoserine, katalysiert durch LabKC, wurde zunächst auf inhibierende Ladungseffekte durch den freien N-Terminus zurückgeführt. Die Analytik einer acetylierten Variante dieses Peptids (Ac-pSDWpSLWEC, Daten nicht gezeigt) zeigte jedoch auch nur eine Eliminierung in Anwesenheit von LabKC_{His6}. Erwähnenswert ist außerdem, dass die Eliminierung des Phosphoserins durch LabKC auch in Abwesenheit des Co-Substrates GTP im Reaktionsansatz katalysiert wurde.

Mit der Synthese weiterer Peptide sollte als nächstes überprüft werden, ob das Vorhandensein des Leaderpeptids für eine vollständige Reaktion wichtig ist, und ob für die Eliminierungsreaktion eine bestimmte Reihenfolge phosphorylierter Serine erforderlich ist. Weiterhin sollte die Frage geklärt werden, ob zwei gleichzeitig vorhandene Phosphoserine (Mehrfachphosphorylierungen) eine Einschränkung für die Eliminierungsreaktion darstellen. Hierfür wurden die Peptide LabA2**_{pS1}, LabA2**_{pS4} und LabA2**_{pS1_pS4} mittels automatisierter Festphasen-Peptidsynthese hergestellt und anschließend gereinigt. Alle drei Sequenzen setzen sich aus dem vollständigen Leaderpeptid von LabA2 sowie den ersten neun Aminosäuren des Propeptids zusammen. Die Umsetzung des an Position Ser1 phosphorylierten Peptids (LabA2**_{pS1}) ist in Abbildung 49 dargestellt. Nach Inkubation mit LabKC_{His6} in Abwesenheit von GTP ist die Eliminierung des Phosphoserins mit dem Massenshift von Δm -98 Da zu beobachten (Abbildung 49 b). In einem parallelen Reaktionsansatz erfolgte die Umsetzung mit LabKC_{His6} in Gegenwart von 2 mM GTP. Das Massenspektrum dieses Ansatzes zeigt $[M+4H]^{4+}$ -Ionen von LabA2**_{pS1} nach Eliminierung beider Phosphoserine. Weiterhin ist das Intermediat mit einer Eliminierung und einer Phosphorylierung zu beobachten ($[M-98+80+4H]^{4+} = -859.89$).

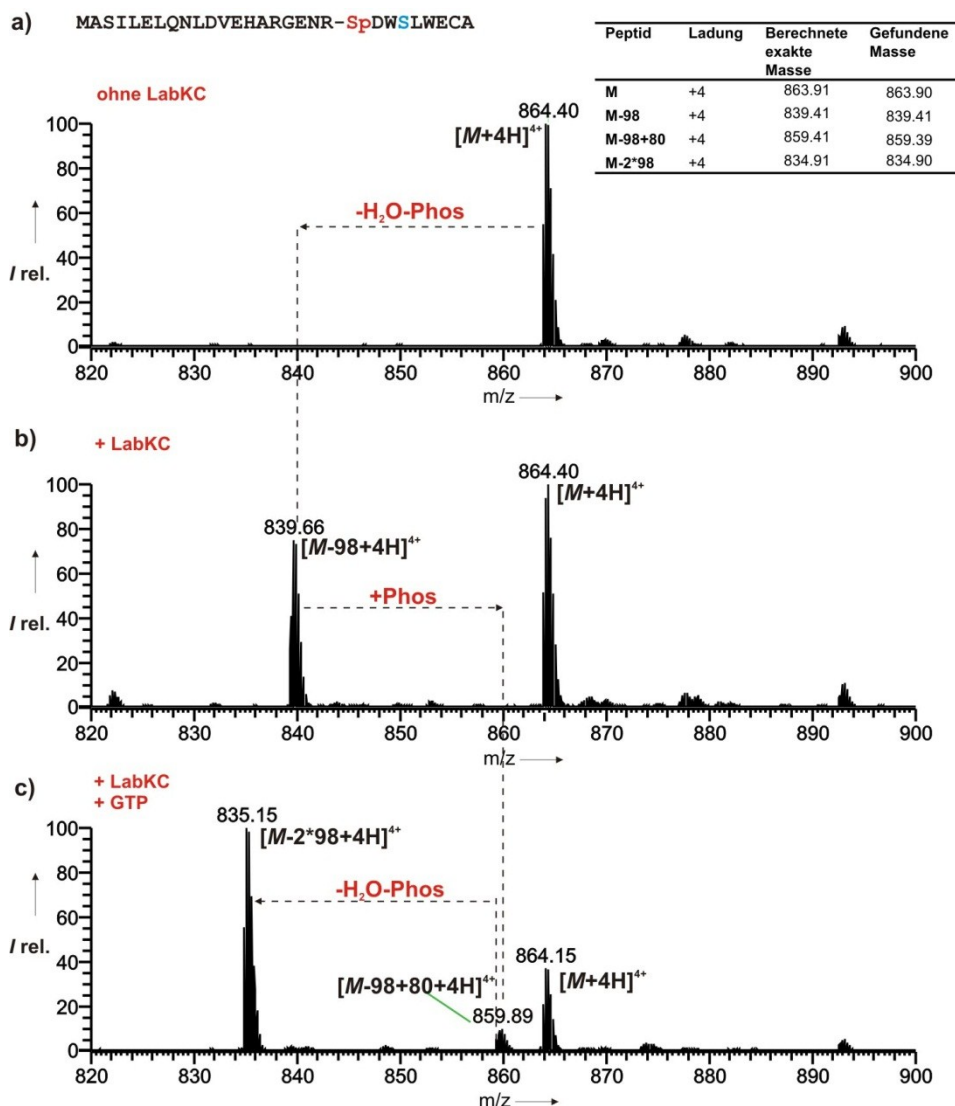


Abbildung 49: LC-HR-ESI-MS (ESI-Exactive-MS) der Umsetzung von LabA2**_{pS1} (10 μ M) mit LabKC_{His6} (0.7 μ M). a) Kontrollansatz ohne Enzym, b) nach Inkubation (2 h) mit LabKC ohne GTP und c) in Anwesenheit von GTP (2 mM) im Reaktionsansatz (2 h). Berechnete und beobachtete Massen der $[M+4H]^{4+}$ -Ionen der Reaktion sind in einer Tabelle zusammengefasst.

Ebenso wurde das Peptid LabA2**_{pS4} von LabKC_{His6} mit GTP vollständig eliminiert. In diesem Ansatz war jedoch die Zwischenstufe mit dem 1-fach eliminierten und phosphorylierten Ser1 deutlich ausgeprägter (Abbildung 50).

Mit diesen beiden Peptiden konnte gezeigt werden, dass LabKC_{His6} in der Lage ist phosphoryliertes Serin sowohl an Position 1 als auch an Position 4 zu eliminieren. Bei beiden Umsetzungen wurde jedoch nie ein 2-fach-phosphoryliertes Peptid-Intermediat beobachtet. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die hohe Affinität des Phosphatrestes für das aktive Zentrum der Lyase-Domäne sein, wie dies am Beispiel der SpvC-Lyase gezeigt wurde.^[103] Im Peptid vorhandene Phosphoserine würden demnach zuerst eliminiert werden, bevor die Phosphorylierung weiterer Serin-Seitenketten erfolgt. Dies würde auch

das Fehlen von doppelt phosphorylierten Peptiden in allen bisher durchgeführten Umsetzungen mit LabKC erklären.

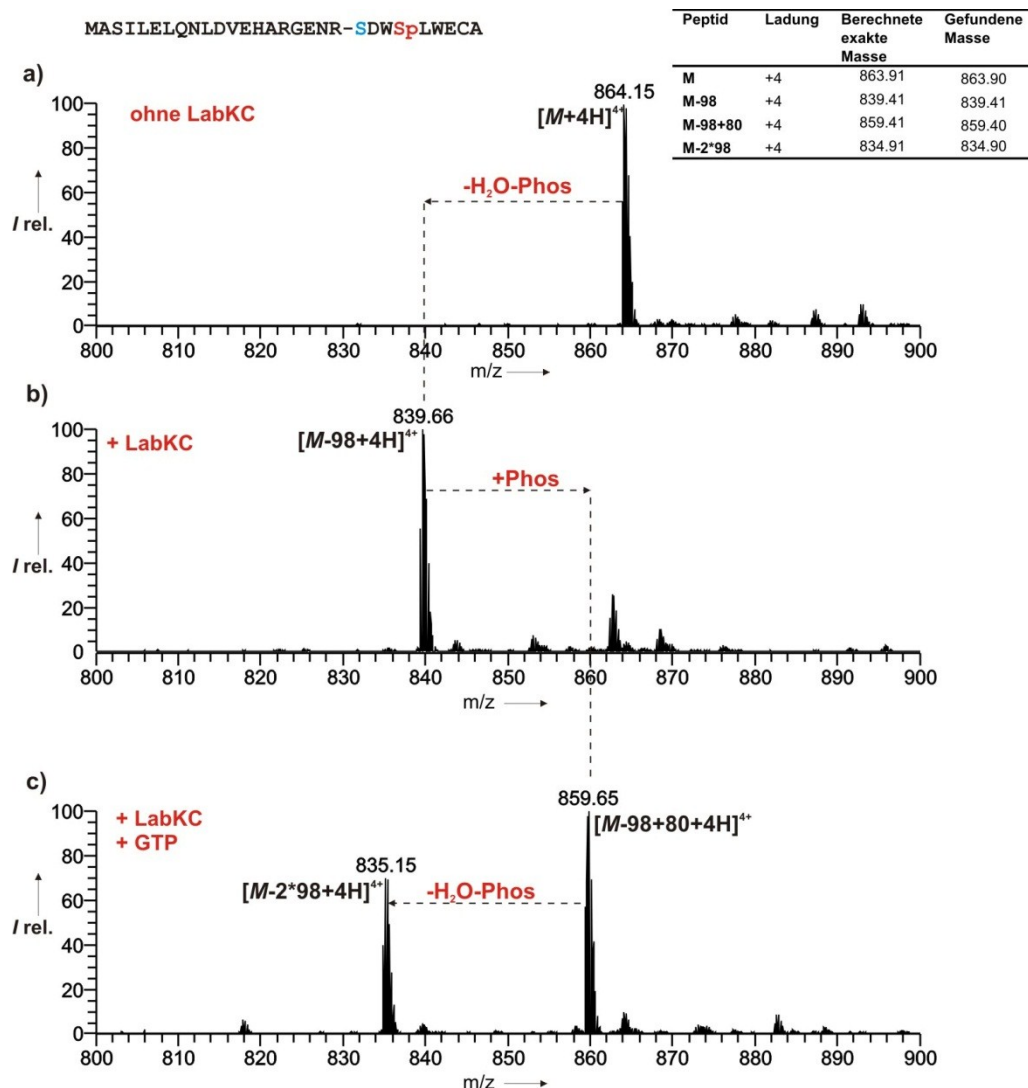


Abbildung 50: LC-HR-ESI-MS (ESI-Exacte-MS) der Umsetzung von LabA2**_{pS4} (10 μM) mit LabKC_{His6} (0.7 μM). a) Kontrollansatz ohne Enzym, b) nach Inkubation (2 h) mit LabKC ohne GTP und c) in Anwesenheit von GTP (2 mM) im Reaktionsansatz. Berechnete und beobachtete Massen der $[M+4H]^{4+}$ -Ionen der Reaktion sind in einer Tabelle zusammengefasst.

Als drittes Peptid dieser Serie wurde LabA2**_{pS1_pS4} mit zwei phosphorylierten Serinen auf Umsetzung durch LabKC_{His6} getestet. Im Gegensatz zu LabA2**_{Δ(-20-1)pS_pS4} wurden in diesem Fall beide Phosphoserine durch das Enzym eliminiert, sowohl in Anwesenheit, als auch in Abwesenheit von GTP (Anhang Abbildung 97). Die Eliminierung von mehrfach phosphorylierten LabA2-Varianten durch LabKC ist demzufolge prinzipiell möglich, wenngleich dies physiologisch nicht relevant zu sein scheint. Voraussetzung für eine erfolgreiche Eliminierung ist jedoch das Vorhandensein des Leaderpeptids.

Hervorzuheben ist aus diesen Untersuchungen vor allem die Beobachtung der GTP-unabhängigen Eliminierung von Phosphoserinen. Im Gegensatz hierzu wurde im Rahmen der Charakterisierung der Lacticin481-Synthetase die Abhängigkeit der Eliminierungsreaktion von der Anwesenheit von Nukleotiden im Reaktionsansatz beobachtet.^[39]

5.4 Ortsgerichtete Mutagenese zur Aufklärung des enzymatischen Mechanismus

Wie bereits in Abschnitt 1.2.2 beschrieben wurde, besteht die Dehydratisierungsreaktion von Serinen und Threoninen unter Bildung der Aminosäuren Dha bzw. Dhb aus zwei Reaktionsschritten, einer Phosphorylierungs- sowie einer anschließenden Eliminierungsreaktion. Für Klasse III-Lantibiotika gab es zu Beginn dieser Arbeit noch keine Studien bezüglich der enzymatischen Mechanismen für diese Reaktionen. Mit der rekombinanten Expression und Reinigung von LabKC, sowie der erfolgreichen Etablierung eines Enzym-Assays war es jedoch nun möglich, gezielt die molekularen Grundlagen dieser Reaktionsmechanismen zu untersuchen. Die sequenzbasierte funktionelle Unterteilung von LabKC in drei Domänen ermöglichte es weiterhin durch Mutagenese gezielt einen bestimmten Reaktionsschritt der Labyrinthopeptin-Biosynthese auszuschalten und den Einfluss dieser Mutation auf die enzymatische Umsetzung von Peptidsubstraten zu untersuchen.

Die weitere funktionelle Charakterisierung von LabKC durch Expression einzelner Domänen war in dieser Arbeit nur bedingt erfolgreich. Konstrukte bestehend aus der Lyase- und Kinase- Domäne (Sumo-Lyase-STK und _{His6}Lyase-STK) konnten erfolgreich in *E. coli* kloniert, exprimiert und anschließend über IMAC gereinigt werden (Anhang Abbildung 98). Im Vergleich zum LabKC-Wildtyp-Enzym zeigten die Lyase-Kinase-Variante im Aktivitätsassay jedoch eine stark verminderte Aktivität und unvollständige Prozessierung des LabA2*-Peptids (Daten nicht gezeigt).

5.4.1 Mutagenese im aktiven Zentrum der Ser/Thr-Kinase-Domäne

Im Zuge einer BLAST-Datenbanksuche nach homologen Sequenzen zu LabKC konnte auch die zentrale konservierte Ser/Thr-Kinase-Domäne identifiziert werden.^[101] Wie das Sequenzalignment in Abbildung 51 zeigt, sind neben den für Ser/Thr-Kinasen typischen konservierten Strukturmotiven auch alle katalytisch wichtigen Reste bei LabKC und seinen homologen Proteinen vorhanden.

Gemäß diesen Homologiestudien erfolgt die Bindung der negativ geladenen Phosphatgruppen des Nukleotid-Co-Substrats dabei über eine Interaktion mit den Amidgruppen der Glycinreste im *P-Loop*. Bei LabKC ist die Anordnung der Glycinreste im Vergleich zu PknB und PknG jedoch zu einem „HFSNGGGVY“-Motiv abgeändert.^[105, 106]

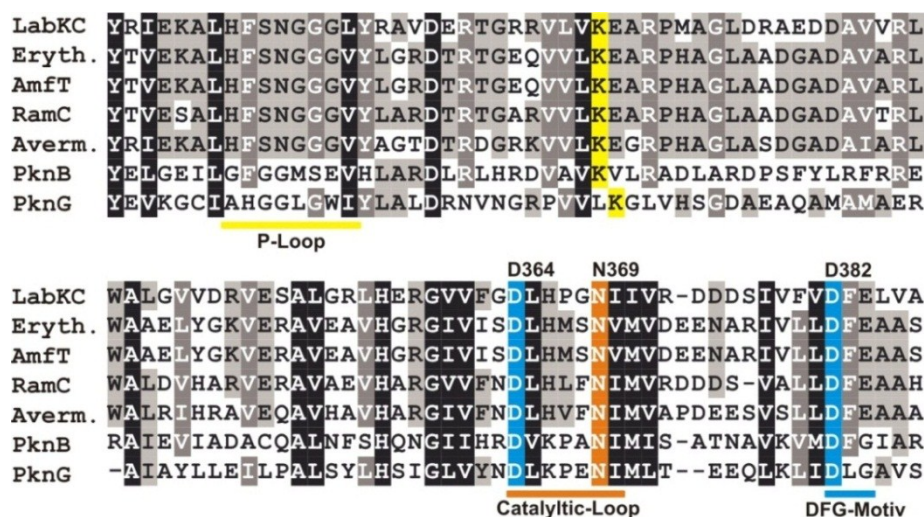


Abbildung 51: Ausschnitt eines Sequenzalignments der Ser/Thr-Kinase-Domänen von LabKC (*A. namibiensis*), RamC (*S. coelicolor*), AmfT (*S. griseus*), Averm. (Ser/Thr-Kinase aus *S. avermitilis*), Eryth. (Ser/Thr-Kinase aus *S. erythraea*), sowie PknB und PknG aus *M. tuberculosis*. Für den Mechanismus wichtige Sequenzabschnitte sowie konservierte katalytische Reste sind farbig hervorgehoben.

C-terminal zu diesem Sequenzabschnitt befindet sich ein konserviertes Lys, das die Koordination der γ -Phosphatgruppe nach Bindung des Nukleotids unterstützt. Wichtige, direkt an der Phosphorylierung beteiligte Reste, sind zwei Asp sowie ein Asn, die in einem als *catalytic-loop* bezeichneten Sequenzabschnitt und einem „DFG“-Motiv konserviert sind. Bei LabKC und seinen verwandten Proteinen liegt dieses Motiv in Form einer „DFE“-Sequenz vor. Um zu überprüfen, ob diese Aminosäuren auch bei der Phosphorylierungsreaktion der Serine im LabA2-Präpropeptid von Bedeutung sind, wurden die in Tabelle 29 aufgelisteten Austausche mittels ortsgerichteter Mutagenese-PCR in die Sequenz des *labKCpET24a(+)* Konstruktes eingeführt (Abschnitt 4.2.4).

Tabelle 29: Zusammenfassung der getesteten LabKC-Varianten mit Austauschen in der Kinase-Domäne, sowie deren beobachtete Aktivität hinsichtlich der Phosphorylierungsreaktion.

LabKC-Mutante	Aktivität	Postulierte Funktion
LabKC_D364N	-	Deprotonierung der Serinseitenkette
LabKC_N369V*	-	Mg ²⁺ -Koordination
LabKC_D382N	-	Mg ²⁺ -Koordination

* ursprünglich geplanter Austausch: N369A

Bei der Verifizierung der DNA-Sequenzen des mutagenisierten LabKC stellte sich heraus, dass für den eigentlich vorgesehenen Austausch von Asn369Ala, das Codon für Valin

vorlag. Da jedoch die Eliminierung der Funktionalität an dieser Position auch durch diese Mutation gewährleistet war, wurde mit diesem Konstrukt weitergearbeitet. Alle drei LabKC-Mutanten mit den Austauschen D364N, N369V, und D382N konnten anschließend erfolgreich in *E. coli* exprimiert und über IMAC-Affinitätschromatographie gereinigt werden, wobei die Proteinsynthese bzw. deren Ausbeute mit der des Wildtyp-Enzyms vergleichbar war (Abbildung 52c und Anhang Abbildung 99). Die Testierung der Aktivität der gereinigten LabKC-Varianten erfolgte unter Verwendung des LabA2*-Peptids. Bei der anschließenden Analytik über LC-ESI-MS konnten jedoch keine für die Dehydratisierung bzw. Phosphorylierung des Peptidsubstrats charakteristischen Molekülmassen, im Vergleich zur Kontrollinkubation mit dem LabKC-Wildtyp-Enzym, beobachtet werden (Abbildung 52 und Anhang Abbildung 100). Somit konnte für alle drei ausgetauschten Aminosäuren deren Wichtigkeit bei der Beteiligung am Mechanismus der Phosphorylierung von Serinen und Threoninen gezeigt werden. Untersuchungen zur strukturellen Integrität dieser LabKC-Mutanten mittels CD-Spektroskopie wurden im Zuge dieser Arbeit nicht durchgeführt. Um sicher zu stellen, dass der beobachtete Aktivitätsverlust nicht aufgrund von Konformationsänderungen in der Kinase-Domäne hervorgerufen wurde, müsste dies in zukünftigen Experimenten nochmals überprüft werden.

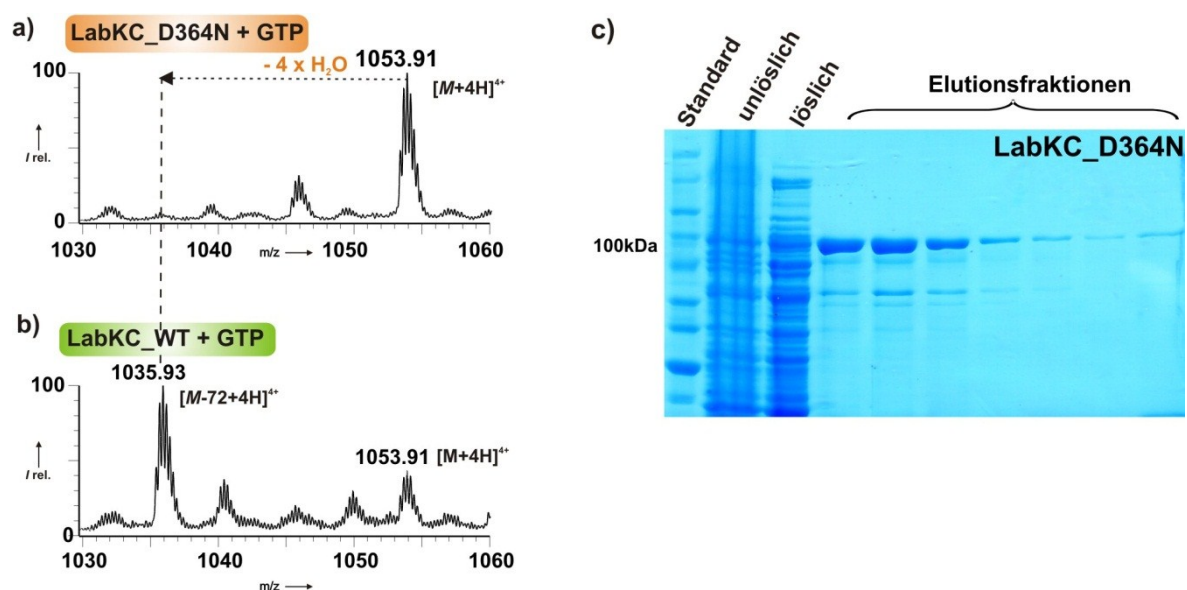


Abbildung 52: Reinigung und Testierung der Kinase-Mutante LabKC_D364N. a) LC-ESI-MS (QTof2) der Umsetzung von LabA2* mit LabKC_D364N und GTP. $[M+4H]^{4+}$ -Ionen zeigen das unmodifizierte Edukt. b) $[M+4H]^{4+}$ -Ionen der Umsetzung von LabA2* mit dem LabKC-Wildtyp-Enzym und GTP. Hauptprodukt ist das 4-fach dehydratisierte Peptid ($[M-72+4H]^{4+} = 1035.93$). c) SDS-Gel nach Coomassiefärbung mit Elutionsfraktionen der IMAC-Aufreinigung von LabKC_D364N.

Entsprechend ihrer Position im Sequenzalignment wurde ein für andere Ser/Thr-Kinasen bereits postulierter Mechanismus vorgeschlagen (Abbildung 52).^[129] Asp364 würde demzufolge für die Deprotonierung der Serin-Seitenkette im Substratpeptid zuständig sein. Das gebildete Alkoholat-Anion würde anschließend die γ -Phosphatgruppe des gebundenen GTP-Co-Substrats angreifen. An der Ausrichtung der Phosphatgruppen des Nukleotids sind wiederum zwei Mg^{2+} -Ionen beteiligt, welche über die Seitenketten von Asn369 und Asp382 koordiniert werden. Die Abhängigkeit der Phosphorylierungsreaktion von Mg^{2+} wurde bereits im Abschnitt 5.3.5 beschrieben.

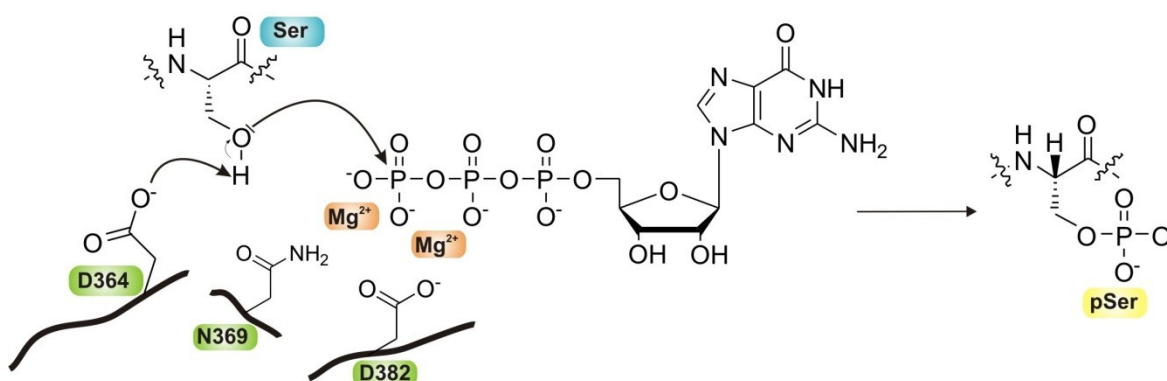


Abbildung 53: Vereinfachtes Schema zum Mechanismus der Phosphorylierungsreaktion mit beteiligten katalytischen Resten von LabKC.

Die Bedeutung dieser Aminosäuren im Hinblick auf die Phosphorylierungsaktivität konnte auch für das zu LabKC homologe und SapB-modifizierende Enzym RamC beschrieben werden. In diesem Fall wurden die Austausche *in vivo* in *S. coelicolor* durchgeführt und bei den entsprechenden Mutanten die Auswirkung auf die Luftmycelbildung des Produzentenstammes beobachtet.^[44] Im Vergleich zum Wildtyp-Stamm zeigten die *S. coelicolor*-Mutanten mit den durchgeführten Substitutionen in der Kinase-Domäne keine Luftmycelbildung bei Wachstum auf Agarplatten.

Die Aktivität der Ser/Thr-Kinasen PknG und PknB wird über Autophosphorylierung von Threonin und Serinresten in einem C-terminal zum DFG-Motiv befindlichen *activation loop* kontrolliert. Für LabKC und seine homologen Enzyme konnten aber keine entsprechenden konservierten Reste für eine Autophosphorylierung in diesem Sequenzabschnitt gefunden werden. Bei einem Versuch zum Nachweis phosphorylierter Peptide über Western-Blot, unter Verwendung eines Anti-pSer-Antikörpers, konnte auf dem Blot ein Signal in der elektrophoretischen Laufhöhe von LabKC beobachtet werden (Anhang Abbildung 101). Es ist somit nicht auszuschließen, dass entsprechende phosphorylierte Seitenketten von LabKC für die Regulierung der Aktivität in anderen Bereichen der Sequenz vorliegen.

5.4.2 Mutagenese der N-terminalen Lyase-Domäne

Nach der Phosphorylierung von Serin- und Threoninseitenketten in den Propeptiden von LabA2 und LabA1 ist die Eliminierung der Phosphatgruppe der nächste Schritt bei der Bildung von Didehydroalaninen bzw. Didehydrobutyrinen. LabKC besitzt für diesen Reaktionsschritt eine N-terminale pSer/pThr-Lyase-Domäne, mit Homologie zu VenL, einem Klasse IV-Lantibiotika modifizierenden Enzym aus *Streptomyces venezuelae* (Abschnitt 5.1.).^[31] Für dieses Enzym konnte vor kurzem der zugrunde liegende Mechanismus für die Eliminierungsreaktion aufgeklärt werden. Dabei wurden katalytisch wichtige Reste über einen Sequenzvergleich mit bereits bekannten, auf struktureller Ebene charakterisierten pSer/pThr-Lyasen identifiziert (Abbildung 54).^[130] Diese Enzyme treten häufig bei human pathogenen Organismen auf und katalysieren die β -Eliminierung von Phosphatgruppen in MAPK-Kinasen.

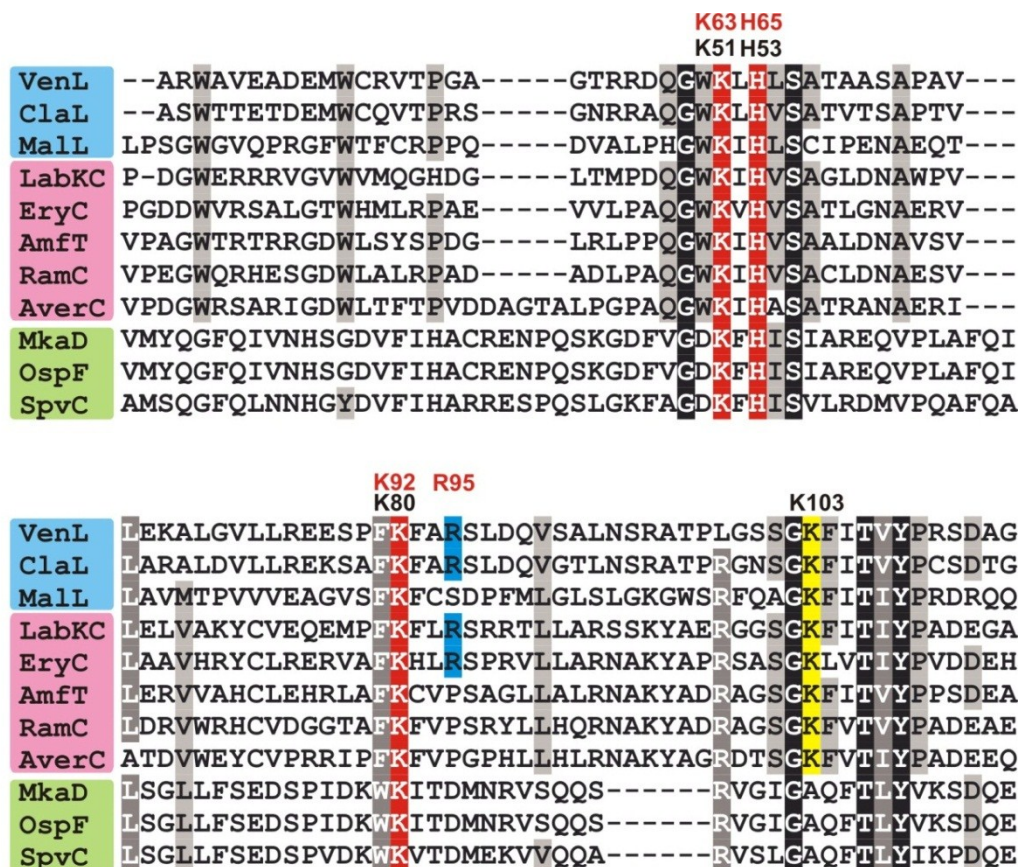


Abbildung 54: Ausschnitt eines Sequenzalignments der N-terminalen Lyase-Domänen von VenL (*S. venezuelae*), ClaL (= LanL-Enzym aus *S. clavuligerus*), Mall (= LanL-Enzym aus *S. maltophilia*), LabKC (*A. namibiensis*), EryC (Ser/Thr-Kinase aus *S. erythraea*), AmfT (*S. griseus*), RamC (*S. coelicolor*), AverC (Ser/Thr-Kinase aus *S. avermitilis*), sowie den pSer/Thr-Lyasen MkaD (*Shigella spec.*), OspF (*Shigella spec.*) und SpvC (*Salmonella spec.*). Positionen katalytisch wichtiger Reste aus VenL sind gekennzeichnet (schwarz), ebenso entsprechende Reste in LabKC (rot).

Nach gezielter Einführung von Mutationen mit anschließender Überprüfung der Enzymaktivität *in vitro*, wurde für VenL ein zu pSer/pThr-Lyasen analoger Mechanismus postuliert (Abbildung 55b). Daran beteiligt sind insbesondere in allen Sequenzen konservierte basische Seitenketten. Die β -Eliminierung wird dabei durch die Deprotonierung des α -Kohlenstoffatoms über die basische Seitenkette von Lys80 initiiert. Ein weiterer positiv geladener Lysinrest (Lys51) unterstützt dies durch die Aktivierung der pSer-Carbonylgruppe der Peptidbindung. His65 begünstigt wiederum die Eliminierung durch Protonierung des zur Phosphatabgangsgruppe grenzenden Sauerstoffs.

Detaillierte Einblicke über die Bindung des phosphorylierten Peptidsubstrats lieferte die Aufklärung der Kristallstruktur von SpvC. Die Phosphatgruppe des Peptidsubstrats wird dabei weit in eine positiv geladene Tasche des aktiven Zentrums gezogen. Drei Arginine und eine Lysinseitenkette interagieren über Ionenpaarbildung mit der negativ geladenen Phosphatgruppe und halten diese somit im aktiven Zentrum fixiert (Abbildung 55a).^[102]

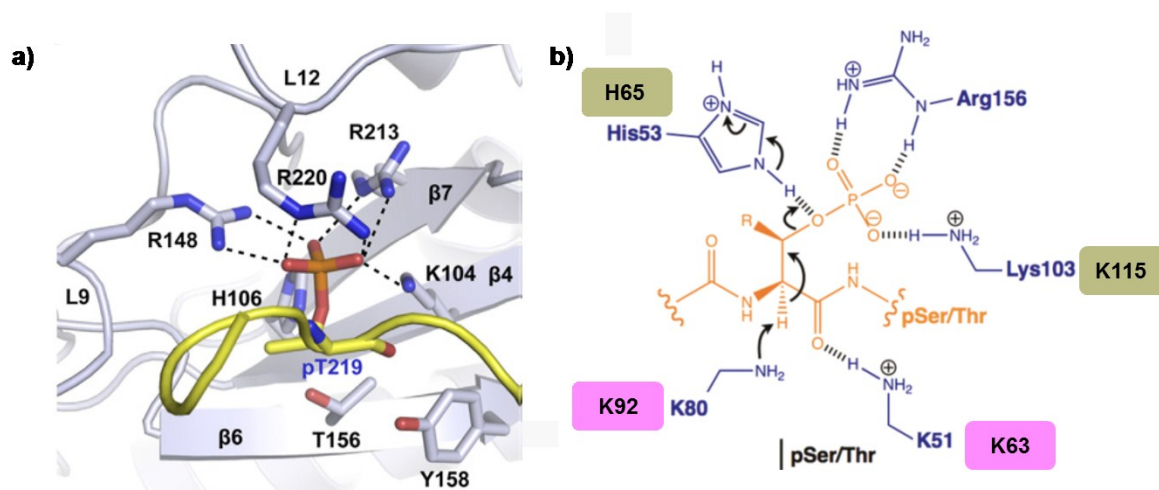


Abbildung 55: a) Interaktion der Phosphatgruppe von pThr mit basischen Seitenketten im aktiven Zentrum der SpvC-Lyase.^[102] b) Postulierter Mechanismus der pThr-Eliminierungsreaktion von VenL mit beteiligten katalytischen Resten. Entsprechende konservierte Aminosäuren in LabKC sind farbig hinterlegt.^[130]

Für die Lyase-Domäne von LabKC sollten entsprechende Austausche konservierter und katalytisch wichtiger Seitenkettenfunktionalitäten erfolgen. Da zu Beginn dieser Studie die Resultate von VenL noch nicht bekannt waren, erfolgte die Entscheidung, welche Reste mutiert werden sollten, über Sequenzvergleich mit den pSer/pThr-Lyasen und zu LabKC homologen Enzymen. Auffallend hierbei war vor allem die große Anzahl an basischen konservierten Aminosäuren. Für erste Testierungen wurden die in Tabelle 30 aufgeführten Austausche in der Lyase-Domäne über ortsgerichtete Mutagenese unter Verwendung des *labKCpET24a(+)*-Konstruktes als *Template* durchgeführt (s. Abschnitt 4.2.4).

Tabelle 30: Übersicht über die geplanten LabKC-Varianten mit Austauschen in der Lyasedomäne, sowie deren beobachtete Aktivität hinsichtlich der Eliminierungsreaktion.

LabKC-Mutante	Aktivität	Postulierte Funktion
LabKC_K63M	-	Aktivierung des Carbonylsauerstoffs von pSer
LabKC_H65M*	-	Protonierung der Phosphat-Abgangsgruppe
LabKC_K92M	-	Deprotonierung des α -Kohlenstoffs von pSer
LabKC_R95M	+	n.a.

n.a. = keine entsprechende Funktion in pSer/pThr-Lyasen

Von den vier geplanten Varianten konnten bis auf LabKC_H63M alle Konstrukte erfolgreich kloniert, exprimiert und die entsprechenden Proteine wie zuvor beschrieben gereinigt werden (Abschnitt 4.3.3.2). Hierbei zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp-Konstrukt keine Einschränkung hinsichtlich der Expression und Ausbeute der gereinigten Mutanten. Für die Testierung auf Aktivität wurden die generierten Mutanten wiederum mit dem LabA2*_{C8A_C17G} – Peptid unter Standardbedingungen für 2 h inkubiert (20 mM TES pH 7.0; 2 mM GTP; 10 mM MgCl₂; 28 °C; Enzym/Substrat-Verhältnis = 1:2). Die Ergebnisse der anschließenden Analytik der Reaktionsansätze mittels LC-ESI-MS sind in Abbildung 56 dargestellt. Der Austausch von R95M bei LabKC hatte keinen Einfluss auf die Eliminierungsreaktion, wie die $[M+4H]^{4+}$ -Ionen des vollständigen, bis zu 5-fach dehydratisierten Peptidsubstrats zeigen. Die Akkumulation von phosphorylierten Peptidintermediaten, wie dies im Falle einer Unterdrückung der Eliminierungsreaktion zu erwarten wäre, wurde nicht beobachtet. Obwohl mit dieser LabKC-Variante keine Erkenntnis bezüglich der Eliminierungsreaktion gewonnen werden konnte, zeigte dies jedoch, dass die Einführung von Mutationen im Enzym keinen negativen Effekt auf die Gesamtaktivität hatte. Im Gegensatz dazu zeigt das Massenspektrum der Umsetzung von LabKC_K92M mit LabA2*_{C8A_C17G} das Auftreten von 1-3-fach phosphorylierten Peptiden (Abbildung 56 c). Dehydratisierte Produkte konnten im Reaktionsansatz nicht detektiert werden. Im Vergleich zu allen bisherigen *in vitro*-Umsetzungen war dies der erste Fall, in dem eine multiple Phosphorylierung des Peptidsubstrates beobachtet werden konnte. Auch bei Testierung von LabKC_K63M wurde LabA2*_{C8A_C17G} mehrfach phosphoryliert. Neben dem Hauptprodukt mit drei phosphorylierten Resten konnte auch ein 4-fach phosphoryliertes Peptid detektiert werden. Zusätzliche Signale mit einem Massenunterschied von Δm -98 Da deuten zudem auf eine noch vorhandene geringe Eliminierungsaktivität hin. Da dieser Massenverlust im Spektrum der Inkubation mit LabKC_K92M nicht beobachtet wurde, ist eine spontane Eliminierung der Phosphatgruppen beim Ionisierungsprozess unwahrscheinlich. Diese Ergebnisse bestätigen die bereits auf Grundlage des Sequenzalignments und der Ergebnisse aus VenL gestellte

Vermutung, dass K92M und K63M am katalytischen Mechanismus der Eliminierungsreaktion beteiligt sind. Im Gesamtbild des für VenL postulierten Mechanismus würde K92 in der Lyase-Domäne von LabKC die Funktion der Deprotonierung des α -Kohlenstoffs von pSer übernehmen. Entsprechend würde dieser Schritt von K63 durch Aktivierung der Carbonylfunktion von pSer in der Peptidbindung gefördert werden.

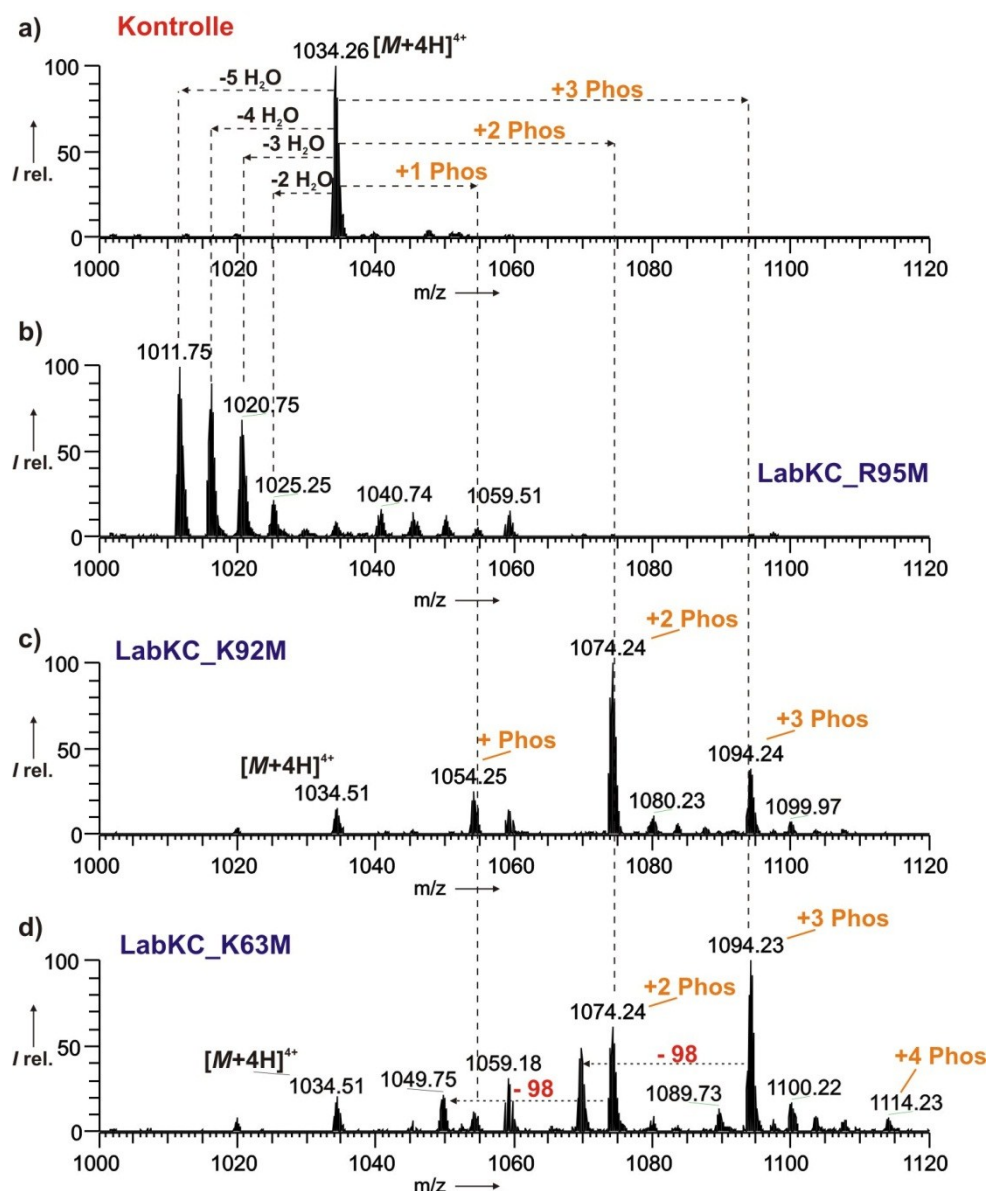


Abbildung 56: LC-ESI-HR-MS (ESI-Exactive-MS) der Umsetzung von LabA2*_{C8A_C17G} mit verschiedenen LabKC-Varianten mit Austauschen in der Lyase-Domäne. a) [M+4H]⁴⁺-Ionen der Inkubation ohne Enzym, b) [M+4H]⁴⁺-Ionen nach Umsetzung mit LabKC_R95M zeigen dehydratisierte Intermediate mit dem 5-fach dehydratisierten Peptid als Hauptprodukt ([M-5xH₂O+4H]⁴⁺ = 1011.75), c) Umsetzung mit LabKC_K92M: [M+4H]⁴⁺-Ionen von 1-3-fach phosphorylierten Peptiden, d) Umsetzung mit LabKC_63M: [M+4H]⁴⁺-Ionen von 1-4-fach phosphorylierten Peptiden.

Aufgrund der im Verlauf dieser Arbeit erhaltenen Erkenntnisse bezüglich VenL durch andere Arbeitsgruppen wurde auf eine Wiederholung der anfangs nicht erfolgreichen Mutagenese von H65, sowie auf die Durchführung weiterer Austausche in der Lyase-Domäne von LabKC verzichtet.^[130] Die Funktion der noch fehlenden, am Mechanismus beteiligten Reste konnte über Vergleich entsprechender Aminosäuren in VenL zugeordnet werden.

In einem weiteren Experiment wurde der Ansatz von LabKC_K63M nach Beendigung der Reaktion für weitere 2 h mit dem LabKC-Wildtyp Enzym inkubiert. Wie das Massenspektrum in Abbildung 57 zeigt, wurden alle mehrfach phosphorylierten Peptidintermediate vollständig zum bis zu 5-fach dehydratisierten Peptid eliminiert. Dies bestätigt die schon in Abschnitt 5.3.7 beobachtete Eliminierung des 2-fach phosphorylierten LabA2**_{pS1_pS4}-Peptids. LabKC ist also in der Lage, auch mehrfach phosphorylierte Peptidsubstrate zu eliminieren.

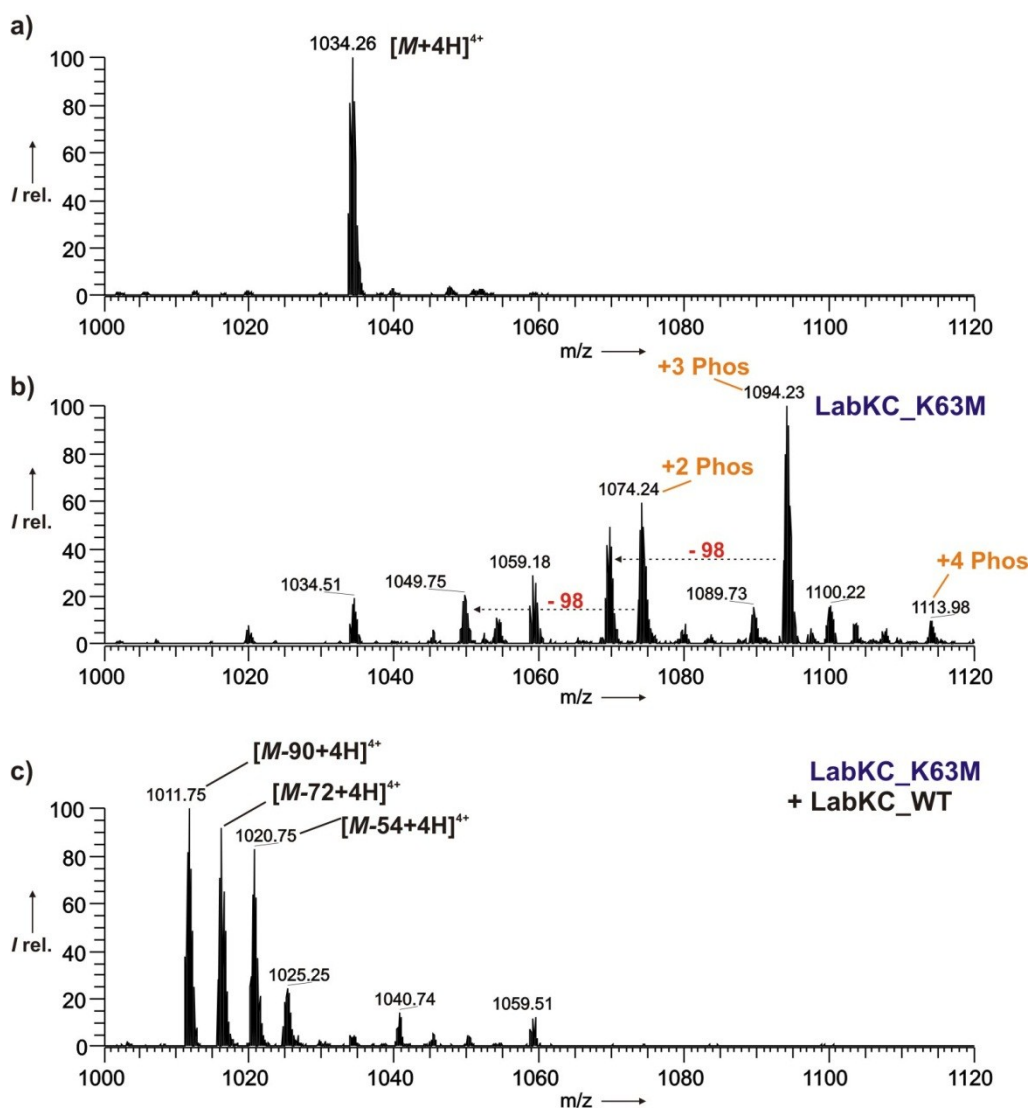


Abbildung 57: LC-ESI-HR-MS (ESI-Exactive-MS) der Umsetzung von LabA2*_{C8A_C17G}. a) $[M+4H]^{4+}$ -Ionen der Inkubation ohne Enzym, b) $[M+4H]^{4+}$ -Ionen nach Umsetzung mit LabKC_K63M zeigen 2- bis 4-fach phosphorylierte Peptidintermediate. c) entspricht Ansatz b) nach Zugabe des LabKC Wildtyp-Enzyms. Alle Phosphatgruppen wurden vollständig eliminiert unter Bildung des 5-fach dehydratisierten Hauptprodukts.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Mit der Entdeckung des Genclusters der Labyrinthopeptine war der Grundstein für die detaillierte Untersuchung der Biosynthese dieser Klasse III-Lantibiotika aus dem Actinomyceten *Actinomadura namibiensis* gelegt. Zu den parallel laufenden *in vivo*-Studien durch M.-Ing. Joanna Krawczyk sollte in dieser Arbeit ein *in vitro*-Assay für die Charakterisierung des Labyrinthopeptin-modifizierenden Enzyms LabKC etabliert werden. Aufgrund der Erkenntnisse aus der Kristallstruktur von Labyrinthopeptin A2, sowie der Information über die Aminosäuresequenz des ribosomal synthetisierten linearen Präpropeptids, sollte dieses Enzym die Einführung des neu entdeckten Labioninmotivs katalysieren. Der postulierte Mechanismus der Biosynthese dieser für Lantibiotika neuartigen posttranslationalen Modifikation sah zunächst die Dehydratisierung von vier Serinseitenketten in dem im Peptid zweifach vorkommenden Ser-Xxx-Xxx-Ser-Xxx-Xxx-Xxx-Cys-Motiv vor. Die Labioninverbrückung sollte anschließend über die aktivierte Cystein-Seitenkette in einer 2-fachen Michaeladdition an die gebildeten Didehydroalanine erfolgen. Die strukturellen Voraussetzungen für diesen komplexen Reaktionsmechanismus waren durch die besondere Architektur des LabKC-Enzyms gegeben. Mit der hoch konservierten zentralen Ser/Thr-Kinase-Domäne für die Phosphorylierungsreaktion, einer N-terminalen Lyase-Domäne für die Phosphat-Eliminierung, sowie einer C-terminalen Domäne mit Homologie zu LanC-Zyklase-Enzymen waren für alle Biosyntheseschritte entsprechende Reaktionszentren vorhanden.

Grundvoraussetzung für die *in vitro*-Charakterisierung von LabKC war zunächst die rekombinante Expression und Reinigung des Enzyms. Durch Testierung verschiedener Expressionskonstrukte und Affinitätsreinigungsmethoden konnte schließlich rekombinantes LabKC in für den Enzym-Assay ausreichenden Mengen und sehr guter Reinheit gewonnen werden. Zusätzlich wurde in der Arbeitsgruppe durch Dipl.-Chem. Paul Ensle eine Methode zur Synthese der Labyrinthopeptin-Präproptide an fester Phase etabliert, wodurch auch die Bereitstellung von Substraten für die enzymatischen Umsetzungen gewährleistet war. Im Zuge der Optimierung der Assay-Bedingungen konnte GTP als Co-Substrat für die Phosphorylierungsreaktion identifiziert werden. Dies war insofern von Bedeutung, da bei allen bisher *in vitro* untersuchten LanM Enzymen, ATP für die Phosphorylierung von Threonin- und Serin-Seitenketten diente. Bei der enzymatischen Umsetzung der Labyrinthopeptine konnte schließlich über Analytik mittels LC-ESI-MS die vollständige Dehydratisierung der Propeptide nachgewiesen werden. Bei der Analyse der Reaktionsansätze wurden zudem in Abhängigkeit des eingesetzten Enzym/Substratverhältnisses alle möglich auftretenden Peptid-Intermediate beobachtet. Mehrfach phosphorylierte Peptide konnten jedoch nicht detektiert werden, mit der Schlussfolgerung, dass phosphorylierte Serinseitenketten sofort in der Lyase-Domäne unter Bildung von Dha eliminiert werden. Durch gezielte Aminosäureaustausche sowohl

in der Kinase- als auch der Lyase-Domäne konnten hierfür bereits existierende Modelle für die katalytischen Mechanismen bestätigt werden. Ein weiterer interessanter Aspekt für zukünftige Projekte ist die Untersuchung einer möglicherweise vorliegenden Regulation der Enzymaktivität von LabKC. Von zahlreichen Ser-/Thr-Proteinkinasen ist bekannt, dass ihre Aktivität stark durch Regulation mittels Autophosphorylierung beeinflusst wird. Obwohl für LabKC ein konserviertes Aktivierungssegment in der Kinase-Domäne nicht vorliegt, könnten entsprechend andere phosphorylierte Seitenketten über LC-ESI-MS identifiziert und der Einfluss der Mutation dieser Reste auf die Enzymaktivität untersucht werden.

Weiterhin wurde mittels LC-ESI-MS/MS auch die vollständige Zyklisierung des 4-fach dehydratisierten LabA2-Propeptids nach Inkubation mit LabKC nachgewiesen. Ein Schwachpunkt dieser Methode war jedoch der endgültige Beweis der Labioninbildung, da auch eine Verbrückung der Cystein-Seitenketten mit dem *N*-terminalen Dha unter Bildung von Lanthionin und dem Verbleiben eines zentralen Dha-Rests möglich ist. Diese Vermutung wurde durch Testierung weiterer LabA2-Präpropeptid-Varianten mit einem Ser-Xxx-Xxx-Ala-Xxx-Xxx-Xxx-Cys-Motiv bestätigt. Auch in diesem Fall konnte massenspektrometrisch eine Verbrückung nach Umsetzung mit LabKC zu Lan nachgewiesen werden. Die Analytik der Totalhydrolyse der Reaktionsansätze von LabKC mit den Präpropeptiden von LabA1 und LabA2 und anschließender GC-MS-Messung zeigte schließlich die eindeutige Bildung von Lanthionin. Im Vergleich dazu konnte Labionin nur in äußerst geringen Mengen in beiden Ansätzen nachgewiesen werden. Damit wurde gezeigt, dass LabKC unter den gegebenen *in vitro*-Bedingungen hauptsächlich die Bildung von Lanthionin katalysiert. Die beiden unterschiedlichen Reaktionswege für die Synthese von Labionin und Lanthionin sind in

Abbildung 58 postuliert.

Im Fall der korrekten biosynthetisch erwarteten Verbrückung zum Labioninmotiv kann gefolgert werden, dass die in der Peptidkette vorhandenen Dha-Reste für den Reaktionsmechanismus exakt in Position gebracht und ausgerichtet werden müssen. Ist dies nicht der Fall, so könnte die Bildung der Lanthioninbrücke begünstigt sein. Die Zyklase-Domäne würde somit auch die Funktion eines Chaperons besitzen. Alternativ könnte *in vivo* jedoch auch ein weiteres, bislang unbekanntes Protein an diesem Prozess beteiligt sein. Eine Chaperonfunktion wäre insofern auch vorstellbar, da in den A- bzw. A'-Ringen von Labyrinthopeptin A2 eine *cis*-Amidbindung vorliegt und es denkbar ist, dass die Peptidkette vor dem Ringschluss entsprechend isomerisiert werden muss.

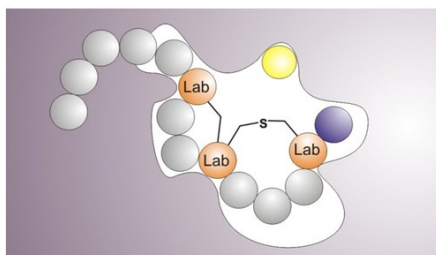
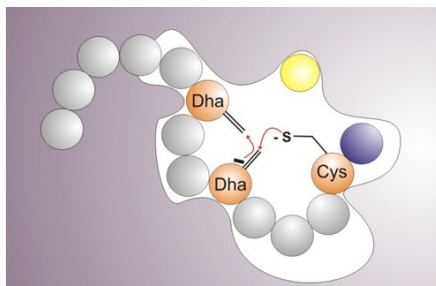
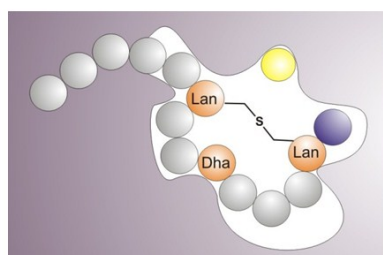
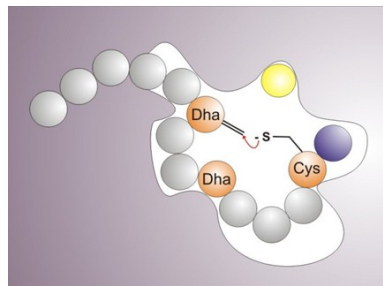
a) Labionin - Bildung**b) Lanthionin - Bildung**

Abbildung 58: Modell für die Bildung von Labionin und Lanthionin in der Zyklase-Domäne von LabKC. a) Nach Aktivierung der Cystein-Seitenkette greift das Thiolat das Michael-System des benachbarten Dha an. Das resultierende freie Elektronenpaar am α -Kohlenstoffatom bildet anschließend eine C–C-Bindung mit dem zweiten Dha zum Labionin. b) Im Fall des Lanthionin-Modus greift das aktivierte Cystein direkt das zweite Dha unter Bildung von Lanthionin an.

Weiterhin unklar ist, wie die Aktivierung der Cystein-Seitenketten für den Angriff auf die Michaelssysteme der Dha-Aminosäuren erfolgt. Im Vergleich zu LanC, LanM sowie den kürzlich entdeckten VenL-Enzymen, fehlen in der Zyklase-Domäne von LabKC wichtige konservierte Seitenketten für die Koordinierung eines Metall-Ions, über welches bei den genannten Beispielen die Aktivierung erfolgt. Diese Aufgabe könnte jedoch auch eine bisher nicht identifizierte Seitenkettenfunktion, z.B. ein entsprechend aktivierter Histidinrest analog zu einer katalytischen Triade übernehmen. Mit Hilfe der optimierten Analytik zum Nachweis des Labionin-Bausteins könnten in Zukunft die Assaybedingungen im Hinblick auf die Labioninbildung weiter optimiert werden, z.B. durch Testierung verschiedener Co-Faktoren oder der Mutagenese konservierter Aminosäurereste. Mit dem Hintergrund der rekombinanten Expression von LabKC in *E. coli* muss jedoch auch in Betracht gezogen werden, dass die Zyklase-Domäne partiell falsch gefaltet und somit inaktiv vorliegen könnte.

Mit den optimierten Bedingungen des *in vitro*-Enzym-Assays konnten erstmals detaillierte Untersuchungen zur Bedeutung des Leaderpeptids bei der Prozessierung durch LabKC durchgeführt werden. Durch Testierung einer Serie von LabA2-Peptiden mit Austausch einzelner Aminosäuren in der Leadersequenz, sowie verkürzter Varianten, konnte ein konserviertes *N*-terminales ILELQ-Motiv identifiziert werden, das für die Erkennung

durch LabKC essentiell ist. Im Zuge der funktionellen und strukturellen Charakterisierung dieses Sequenzabschnittes wurde ein Modell postuliert, in dem die Bindung an LabKC über Interaktion mit drei hydrophoben Seitenketten erfolgt die in einer α -Helix angeordnet sind (Abbildung 59). Der C-terminale Abschnitt des Leaderpeptids trägt nicht zur Erkennung bzw. Bindung an LabKC bei, besitzt jedoch eine wichtige Funktion als Abstandshalter zwischen dem konservierten Motiv und dem Propeptid. Die Länge dieser *Spacer*-Sequenz limitiert somit die Zugänglichkeit der Serinreste zu den aktiven Zentren der Kinase- und Lyase-Domäne. Es konnte jedoch noch nicht geklärt werden, in welcher Domäne die Bindung des Leaderpeptids erfolgt bzw. ob für jede Untereinheit eine eigene Bindetasche vorliegt. Dies könnte in Zukunft mit ITC-Bindungsstudien überprüft werden.

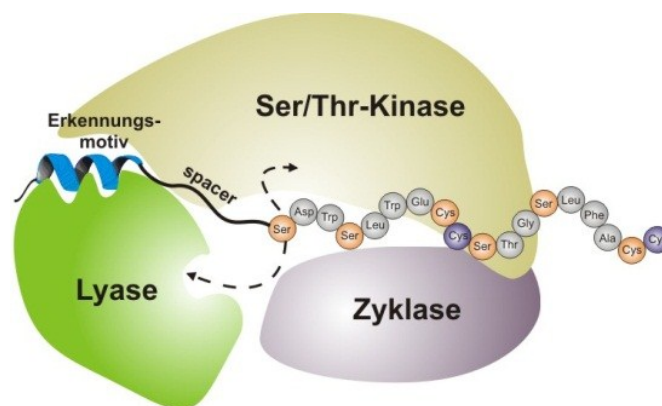


Abbildung 59: Modell zur Leaderpeptid-abhängigen Prozessierung der Labyrinthopeptine durch LabKC.

Weitere detaillierte Einblicke in die Substratbindung sowie die katalytischen Mechanismen könnte die Aufklärung der Tertiärstruktur von LabKC ermöglichen. Die für entsprechende Kristallisationsversuche benötigten Mengen an reinem, konzentriertem Protein konnten in dieser Arbeit aufgrund der geringen Löslichkeit von rekombinanten LabKC nicht bereitgestellt werden. Ein vielversprechender Ansatz ist jedoch die Kristallisation der einzelnen Untereinheiten von LabKC. So konnte z.B. bei der exprimierten Lyase-Kinase-Domäne eine deutlich verbesserte Löslichkeit erzielt werden.

Der Ablauf der Prozessierung des Präpropeptids von Labyrinthopeptin A2 ist in Abbildung 60 schematisch zusammengefasst. Demnach erfolgt zunächst die sukzessive Phosphorylierung und Eliminierung der Serin-Seitenketten in der Kinase- und Lyase-Domäne von LabKC unter Bildung des 4-fach dehydratisierten Peptids. Über die aktivierten Cystein-Seitenketten würde anschließend die Einführung des Labioninmotivs erfolgen, wobei hierfür die Dha-Aminosäuren durch die Zykklase-Domäne von LabKC in die richtige räumliche Orientierung gebracht werden müssten.

In diesem Zusammenhang ist die Aufklärung der Prozessierungsrichtung im Zuge der Dehydratisierung der Serinreste ein weiterer interessanter Aspekt für zukünftige Forschungsprojekte. Ein vielversprechender Ansatz hierbei ist die Verwendung von isotopenmarkierten Aminosäuren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits erste Peptidvarianten mit an bestimmten Positionen eingeführten deuterierten Serinen getestet. Die Abfolge der Eliminierung kann somit unter Verwendung hochauflösender Massenspektroskopie beobachtet werden. Im Vergleich zur Eliminierung von H_2O ist in diesem Fall ein Massenverlust von -19 Da detektierbar.

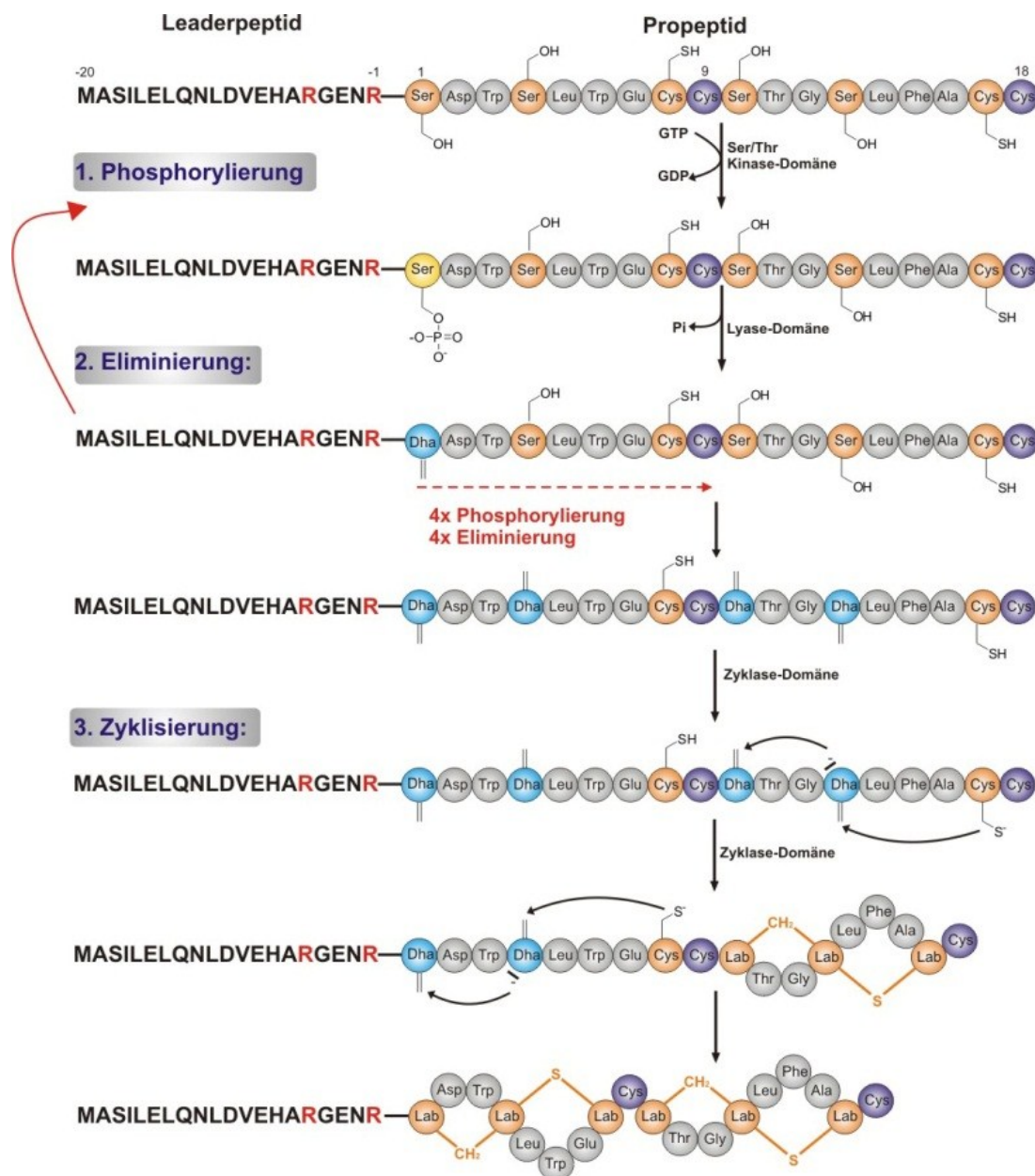


Abbildung 60: Postulierte Abfolge der Modifizierung des Labyrinthopeptin A2-Präpropeptids durch LabKC. Nach sukzessiver Phosphorylierung von Serin-Seitenketten und Phosphat-Eliminierung in der Kinase- und Lyase-Domäne erfolgt die Einführung der Labioninverbrückung in einem konzertierten Mechanismus über die aktivierten Cystein-Seitenketten.

Ein bislang gänzlicher ungeklärter Schritt in der Biosynthese der Labyrinthopeptine ist die Abspaltung des Leaderpeptids nach der Prozessierung des Propeptids. Eine im Gencluster codierende Sequenz für eine Protease bzw. eine entsprechende Proteasedomäne in den beiden Transportern, wie dies bei Klasse II-Lantibiotika beobachtet wurde, konnte nicht identifiziert werden. Denkbar ist jedoch auch eine Abspaltung durch das Einwirken unspezifischer, extrazellulärer Aminopeptidasen. Die Beobachtung, dass mit fortschreitender Kultivierungsdauer von *Actinomadura namibiensis* LabA3 mit einem zusätzlichen Aspartatrest zu LabA1 überführt wird, würde dies bestätigen.

Weiterhin können die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse über die Funktionsweise von LabKC in Zukunft für die Aufklärung der Struktur und Biosynthese weiterer, noch nicht beschriebener Klasse III-Lantibiotika herangezogen werden.

7 Anhang:

7.1 DNA- und Aminosäuresequenz von LabKC

```

1  atg gat ctg cgg tac cac gcc tat gcg atg gcc gat ccc gtc ttt tat gac tcg ccg tcc agc
   tac cta gac gcc atg gtg cgg ata cgc tac cgg cta ggg cag aaa ata ctg agc ggc agg tcg
   Start
   m d l r y h a y a m a d p v f y d s p s s

64  gac acc cgg gag acc gac ggc tac tcc gac gac ctc ccc ctg ccg gac ggc tgg gaa cgt cgg
   ctg tgg gcc ctc tgg ctg ccg atg agg ctg ctg gag ggg gac ggc ctg ccg acc ctt gca gcc
   d t r e t d g y s d d l p l p d g w e r r

127  cgc gtg ggg gtc tgg gtg atg cag ggc cac gac ggg ttg acc atg cct gac cag ggc tgg aag
   gcg cac ccc cag acc cac tac gtc cgc gtg ctg ccc aac tgg tac gga ctg gtc ccg acc ttc
   r v g v w v m q g h d g l t m p d q g w k
   K63

190  atc cat gtg tcg gcc ggt ctg gac aac gcc tgg ccc gtc ctc gaa ctg gtc gcc aaa tac tgc
   tag gta cac agc cgg cca gac ctg ttg cgg acc ggg cag gag ctt gac cag cgg ttt atg acg
   H65A
   i h v s a g l d n a w p v l e l v a k y c

253  gtc gag cag gaa atg cct ttc aag ttc ctg cgc agc aga agg acg ttg ctg gcc cgc agc agc
   cag ctc gtc ctt tac gga aag ttc aag gac ggc tcg tct tcc tgc aac gac cgg gcg tcg tcg
   K92 R95M
   v e q e m p f k f l r s r r t l l a r s s

316  aag tac gcc gaa cgc ggc ggc agc gga aag ttc atc acg atc tac ccc gcc gac gaa ggc gct
   ttc atg cgg ctt gcg ccg ccg tcg cct ttc aag tag tgc tag atg ggg cgg ctg ctt ccg cga
   K115 Y120
   k y a e r g g s g k f i t i y p a d e g a

379  ctg gaa aag acc ctc cat gaa ctc ggt gga atg ctg gaa ggg cag ccc ggc ccc tat atc ttg
   gac ctt ttc tgg gag gta ctt gag cca cct tac gac ctt ccc gtc ggc ccg ggg ata tag aac
   l e k t l h e l g g m l e g q p g p y i l

442  agc gat ctg cgc tgg cgt tcg ggg ccg ctg ttc gtg cgc tac ggc gct ttc aag gag aaa ttc
   tcg cta gac gcg acc gca agc ccc ggc gac aag cac gcg atg ccg cga aag ttc ctc ttt aag
   s d l r w r s g p l f v r y g a f k e k f

505  tgc cgg gac ggg cgc ggc gag atg gtg ccc gcg atc gcg cgc ccg gac ggc gtg ctg gtg ccc
   acg gcc ctg ccc gcg cgc ctc tac cac ggg gcg tag cgc gcg ggc ctg ccg cac gac cac ggg
   c r d g r g e m v p a i a r p d g v l v p

568  gac gcc agg gac ccg gtg ttc cgg gtg ccc gcg tgg gtg gag gtg ccc ggc ttc ctg cgg gag
   ctg cgg tcc ctg ggc cac aag gcc cac ggg gcg acc cac ctc cac ggg ccg aag gac gcc ctc
   d a r d p v f r v p a w v e v p g f l r e

631  gcc atc gac gcc cgg gag aac ggg acc gtc gag gac ttc ccc tac cgg atc gag aag gcg ctg
   cgg tag ctg cgg gcc ctc ttg ccc ctg cgc atg aag ggg atg gcc tag ctc ttc cgc gac
   a i d a r e n g t v e d f p y r i e k a l

694  cac ttc tcc aac ggc ggc ggc ctc tac cgc gcc gtg gag cgc acc ggc cgc agg gtc ctg
   gtg aag agg ttg ccg ccg ccg gag atg gcg ggc cac ctg ctc gcg tgg ccg ggc tcc cag gac
   h f s n g g g l y r a v d e r t g r r v l

757  gtg aag gag gcg cgg ccg atg gcg ggc ctg gac cgc gcc gag gac gac gcc gtc gtc cgg ctc
   cac ttc ctc gcg gcc ggc tac cgc ccg gac ctg gcg cgg ctc ctg ctg cgg cag cag gcc gag
   K254
   v k e a r p m a g l d r a e d d a v v r l

820  gaa cgc gag cac ggc ctg ctg ctc cgc ctc gcc gac ctg gac tgc atc ccc gac ctg gtc gag
   ctt gcg ctc gtg ccg gac gac gag gcg gag cgg ctg gac ctg acg tag ggg ctg gac cag ctc
   e r e h g l l l r l a d l d c i p d l v e

883  tac cgg agc tgg tgg gag cac cgc ttc ctc gtg cgg gag tac gtc gag ggc gag acc ctc acc
   atg gcc tcg acc acc ctc gtg gcg aag gag cac gcc ctc atg cag ctc ccg ctc tgg gag tgg
   y r s w w e h r f l v r e y v e g e t l t

946  cac cac atg gtg cgc cgc aac ccg atg ctg cac tac ggc gcg acg ccg cag gag gtc gcc ggc
   gtg gtg tac cac gcg gcg ttg ggc tac gac gtg atg ccg cgc tgc ggc gtc ctc cag cgg ccg
   h h m v r r n p m l h y g a t p q e v a g

```

1009 tac acc gag tgg gcg ctc ggc gtc gtc gac cgg gtg gag agc gcg ctc ggc cgg ctg cac gaa
atg tgg ctc acc cgc gag ccg cag cag ctg gcc cac ctc tcg cgc gag ccg gcc gac gtg ctt
y t e w a l g v v d r v e s a l g r l h e

1072 cgc ggc gtg gtc ttc ggc gac ctg cac ccc ggc aac atc atc gtc cgg gac gac gac tcc atc
gcg ccg cac cag aag ccg ctg gac gtg ggg ccg ttg tag tag cag gcc ctg ctg ctg agg tag
r g v v f g d l h p g n i i v r d d d s i
D364 N369

1135 gtg ttc gtc gac ttc gag ctg gtc gcc gag gcg gag gag gcg acg cac ccg gcg ctc ggc gcg
cac aag cag ctg aag ctc gac cag ccg ctc cgc ctc cgc tgc gtg ggc cgc gag ccg cgc
v f v d f e l v a e a e e a t h p a l g a
D382

1198 ccc ggc tac cag gcc ccg ccc gac tac acc ggg ttc gcc atc gac cgc tac gcg ctc ggc tgc
ggg ccg atg gtc ccg ggc ggg ctg atg tgg ccc aag ccg tag ctg gcg atg cgc gag ccg acg
p g y q a p p d y t g f a i d r y a l g c

1261 atc agg ctc gcg gtc ttc acc tcc ctc acc gcg acg ctg cac tgg gac gac cgc aag gtc gag
tag tcc gag cgc cag aag tgg agg gag tgg cgc tgc gac gtg acc ctg ctg gcg ttc cag ctc
i r l a v f t s l t a t l h w d d r k v e

1324 cag ttc ctc gac gtg atc tgc gag tcc ttc ccg ctg ccg ccg gac tac gcc gac ccg atc cgc
gtc aag gag ctg cac tag acg ctc agg aag ggc gac ggc ggc ctg atg ccg ctg gcc tag gcg
q f l d v i c e s f p l p p d y a d r i r

1387 cgc gac ctc gcc cgc ccg gcg ccg gcg gac ggc gcg ccg ccg atc tgg cgc gag ccg acg ccc
gcg ctg gag ccg gcg ggc cgc ggc cgc ctg ccg cgc ggc ggc tag acc gcg ctc ggc tgc ggg
r d l a r p a p a d g a p p i w r e p t p

1450 gcc acc tgg ccg gac acg ccg gcc ggg atc gcc gcc gcg atc ctc gac acg gcc acg ccc gag
ccg tgg acc ggc ctg tgc gcc ccg ccc tag ccg ccg cgc tag gag ctg tgc ccg tgc ggg ctc
a t w p d t r a g i a a a i l d t a t p e

1513 cgc gcc gac ccg ctc ttc ccg ggc gac atc gag cag ttc gcg acc agc gtc ggt ggg atc ggg
gcg ccg ctg gcc gag aag ggc ccg ctg tag ctc gtc aag cgc tgg tcg cag cca ccc tag ccc
r a d r l f p g d i e q f a t s v g g i g

1576 ttc ggc cac ggc gcg gcg ggc gtg ctg tgg gcg ctg gcc gag gcg ggc gcc ggc cgc ttc ccc
aag ccg gtg ccg cgc cgc ccg cac gac acc cgc gac ccg ctc cgc ccg ccg ccg gcg aag ggg
f g h g a a g v l w a l a e a g a g r f p

1639 gac cac gag gac tgg gtg ccg gac gcc gtc gcc agg gcg caa ccg ccg ccg ccc ggc ttc tac
ctg gtg ctc ctg acc cac gcc ctg ccg cag ccg tcc cgc gtt gcc ggc ggc ggg ccg aag atg
d h e d w v r d a v a r a q r p p p g f y

1702 gac ggc gtc gcg ggc gtc gcc cac gtc ctg gac ccg ctc ggc cgc gcc gac gag gcc cgc gag
ctg ccg cag cgc ccg cag ccg gtg cag gac ctg gcc gag ccg gcg ccg ctg ctc ccg gcg ctc
d g v a g v a h v l d r l g r a d e a r e

1765 ctc atg gag cac gcg ccc gcc gcg acg ggg gcg acc gac aac agc ctc tac ccg ggg ctg gcg
gag tac ctc gtg cgc ggg ccg cgc tgc ccc cgc tgg ctg ttg tcg gag atg gcc ccc gac cgc
l m e h a p a a t g a t d n s l y r g l a

1828 ggc atc ggc ctc aac cag ctc cac ttc gcc cgc gtc acg ggc gag gcg tcg ttc gcc gcg gcg
ccg tag ccg gag ttg gtc gag gtg aag ccg gcg cag tgc ccg ctc cgc agc aag ccg cgc cgc
g i g l n q l h f a r v t g e a s f a a a

1891 gcc gag gag acc gcc ggc ccg gtg gtc gcg aac ctg cgc cgc aag acg gag ggc gcc tac ccg
ccg ctc ctc tgg ccg ccg gcc cac cag cgc ttg gac gcg gcg ttc tgc ctc ccg ccg atg gcc
a e e t a g r v v a n l r r k t e g a y r

1954 gcg ggc ctg atg tac ggc tcc tcc ggc ccg gcc ctg ttc ctc gtc ccg atg ttc gag gcg acg
cgc ccg gac tac atg ccg agg agg ccg ggc ccg gac aag gag cag gcc tac aag ctc cgc tgc
a g l m y g s s g p a l f l v r m f e a t

2017 ggc gac ggc cac tgg ctg gac gag gcc gaa cgc gcc ctg cac cgc gag ctg gac gcc tgc aag
ccg ctg ccg gtg acc gac ctg ctc ccg ctt gcg ccg gac gtg gcg ctc gac ctg ccg acg ttc
g d g h w l d e a e r a l h r e l d a c k

2080 tgg acg cag aag gac agc acg ctc cag gtc gac gag ggc tgg ccg gtc ctt ccg tac gtc gcc
acc tgc gtc ttc ctg tcg tgc gag gtc cag ctg ctc ccg acc gcc cag gaa ggc atg cag ccg
w t q k d s t l q v d e g w r v l p y v a

2143 acc ggc agc gtg ggc atc ggc atc gcg ctg cac gag ttc ctg ccg cac cgc ccg gcg ccg cgc
tgg ccg tcg cac ccg tag ccg tag cgc gac gtg ctc aag gac gcc gtg gcg ggc cgc ggc gcg
t g s v g i g i a l h e f l r h r p a p r


```

2206  ttc acc gag gcg cag gag ggg atc cgg agg gcg gcg gct ccc gcg tac ttc gtg cag agc ggc
      aag tgg ctc cgc gtc ctc ccc tag gcc tcc cgc cgc cga ggg cgc atg aag cac gtc tcg ccg
      f t e a q e g i r r a a a p a y f v q s g

2269  ctg ctc aac gga cgg tcc ggc atc ctc gcc tac ctg ctg cac gtc ggg gcc ggc cgg gag gac
      gac gag ttg cct gcc agg ccg tag gag cgg atg gac gac gtg cag ccc cgg ccg gcc ctc ctg
      l l n g r s g i l a y l l h v g a g r e d

2332  ccg gtc gtc cgg acg cac ctg cgc aac ctc ggc tgg cac gcc gtc ccg tac ccc ggc cgg ggc
      ggc cag cag gcc tgc gtg gac gcg ttg gag ccg acc gtg cgg cag ggc atg ggg ccg gcc ccg
      p v v r t h l r n l g w h a v p y p g r g

2395  gag gac gcc ccg gcg ccc ggc gcg cgg cgg acc gcg ttc atc ggg gac cag ctg ctg cgc ctg
      ctc ctg cgg ggc cgc ggg ccg cgc gcc gcc tgg cgc aag tag ccc ctg gtc gac gac gcg gac
      e d a p a p g a r r t a f i g d q l l r l

2458  tcc atg gac ctc gcc acg ggc tcc gcc ggg gtc ctg gcc acg gtc gag gcg gcc ctg ggc ggc
      agg tac ctg gag cgg tgc ccg agg cgg ccc cag gac cgg tgc cag ctc cgc cgg gac ccg ccg
      s m d l a t g s a g v l a t v e a a l g g

2521  cac ccc ctg aga ctc ccc ttc ctc cat ccg gag gaa ggg gcg agc acg cga ccc cgg ggg agg
      gtg ggg gac tct gag ggg aag gag gta ggc ctc ctt ccc cgc tcg tgc gct ggg gcc ccc tcc
      h p l r l p f l h p e e g a s t r p r g r

2584  agg tga
      tcc act
      r -

```

7.2 Strukturvorhersagemodell für LabKC

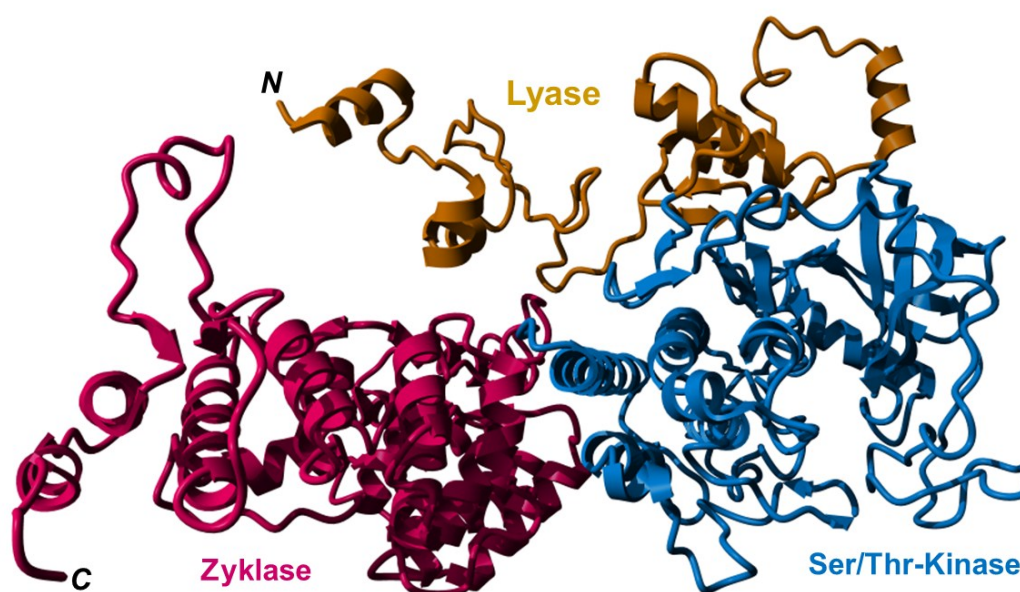


Abbildung 61: Strukturvorhersage von LabKC, modelliert mit *I-Tasser*.^[131, 132] Als Basis für die Vorhersage dienten bekannte Kristallstrukturen, darunter PknG aus *Mycobacterium tuberculosis*. Farbcodierung der Domänen: braun = Lyase, blau = Ser/Thr Kinase, magenta = Zyklase.

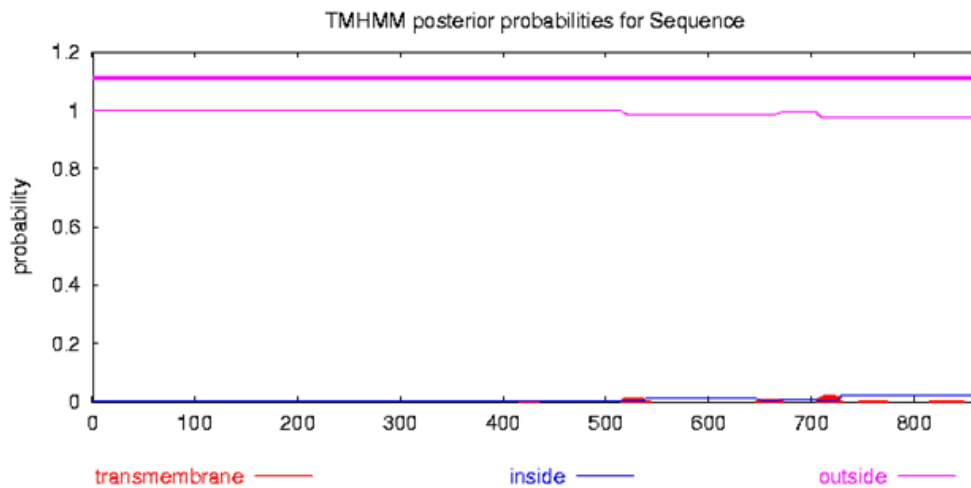


Abbildung 62: Graphische Auswertung der Vorhersage von Transmembranhelices für LabKC mit dem Programm TMHMM.^[107] Aufgetragen ist die Wahrscheinlichkeit der Lokalisation einzelner Sequenzabschnitte (transmembran = rot, cytoplasmatisch = blau, extrazellulär = pink). Die Auswertung zeigt keine vorhandenen Transmembranhelices.

7.3 Reinigung von LabKC

Reinigung von GST-LabKC mittels Affinitätschromatographie:

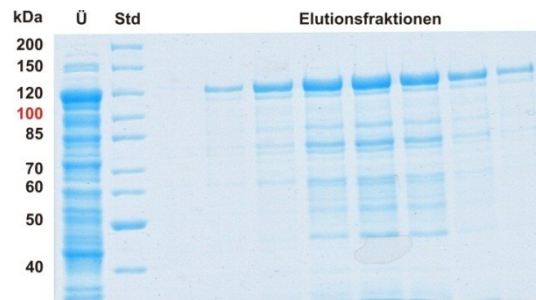


Abbildung 63: SDS-Page nach Coomassie-Färbung mit Fraktionen einer Reinigung von GST-LabKC mit dem ÄktaPurifier unter Verwendung einer 5 mL-GSH-Säule. Das eluierte Fusionsprotein besitzt eine Größe von etwa 120 kDa.

Vergleich der Aufreinigung mit *N*-terminalen und *C*-terminalen His₆-tag:

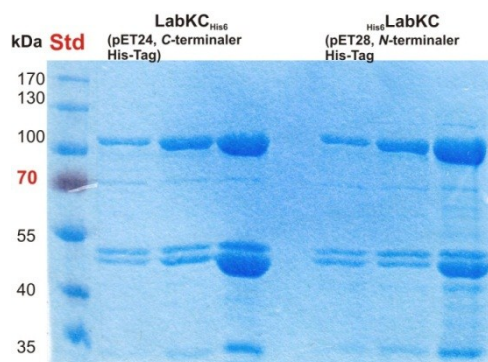


Abbildung 64: SDS-PAGE mit Elutionsfraktionen einer IMAC-Aufreinigung von LabKC mit *C*-terminalen und *N*-terminalen His₆-tag.

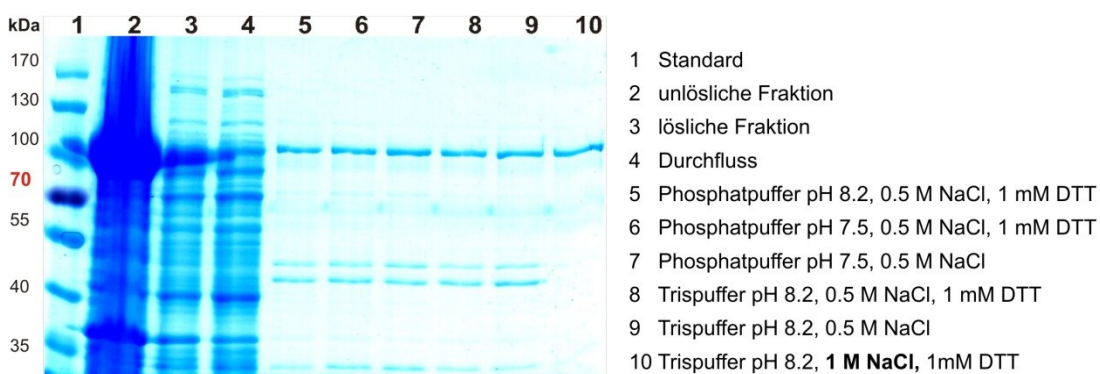


Abbildung 65: SDS-Gel nach Coomassie-Färbung mit Fraktionen verschiedener Aufreinigungen von LabKC_{His6} (Konstrukt: *labKC*-pET24a(+)). Neben den Proben des löslichen und unlöslichen Zellextraktes sind die Eluate verschiedener Pufferbedingungen aufgetragen. In Spur 10 (Tris-Puffer mit 1 M NaCl) tritt die als Doppelbande sichtbare Verunreinigung bei ~ 55 kDa nicht mehr auf.

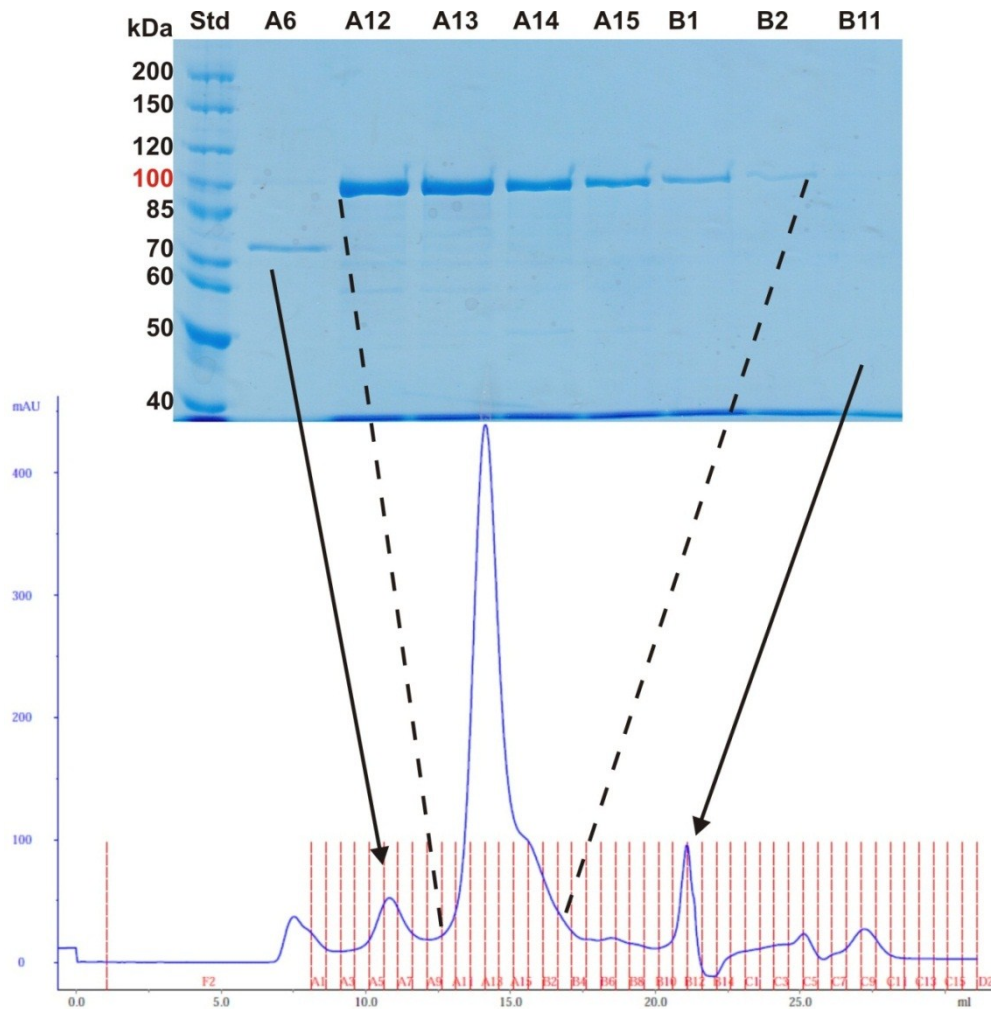


Abbildung 66: Chromatogramm eines Gelfiltrationslaufes von LabKC, vorgereinigt mit IMAC, und anschließender Analyse der Elutionsfraktionen über SDS-PAGE. Proben, welche den ausgewählten Fraktionen entsprechen, sind im Chromatogramm gekennzeichnet.

7.4 LC-MS-Spektren

7.4.1 Versuche zur Untersuchung der Zyklisierungsreaktion

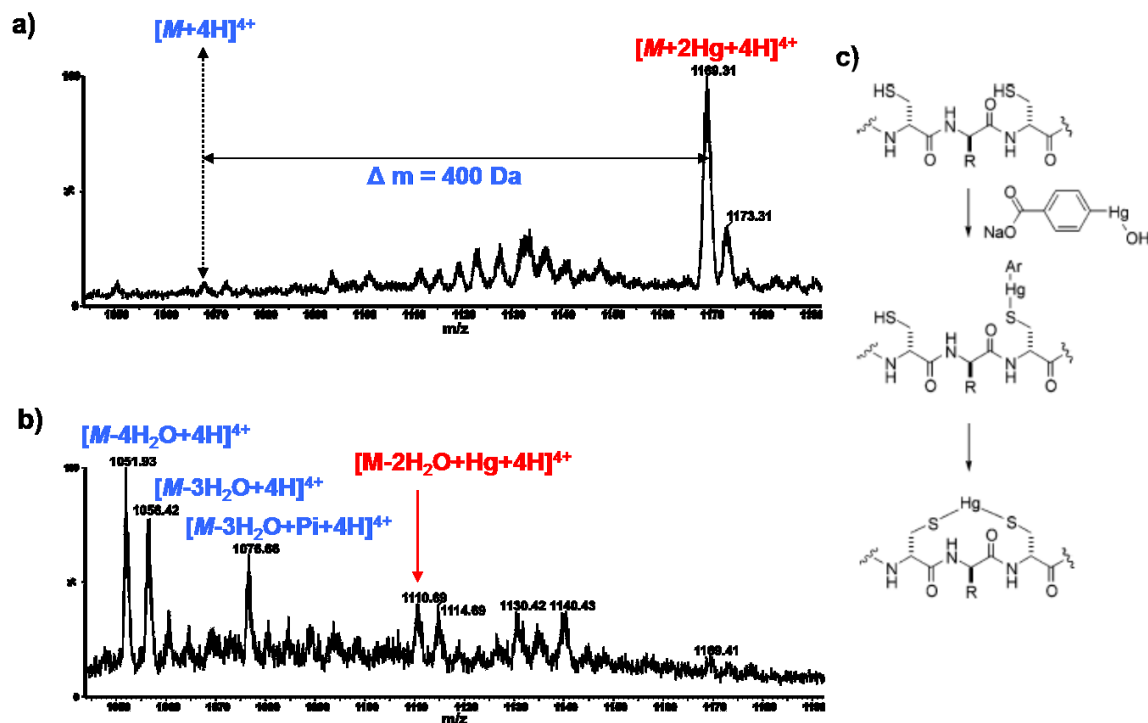


Abbildung 67: LC-ESI-MS (Q-ToF2) Spektren der Modifikation mit PHMB zum Nachweis freier Cysteine nach Inkubation des Präpropeptids von LabA2 mit LabKC_{His6}. a) Die Modifizierung des LabA2-Präpropeptids mit PHMB zeigt zwei Hg-Addukte. b) Nach Umsetzung mit LabKC_{His6} konnte für das 4-fach dehydratisierte Peptid keine Alkylierung beobachtet werden. c) Vorgeschlagene Reaktion für die Alkylierung mit PHMB. Benachbarte Cysteine zeigen eine Adduktbildung mit Quecksilber.^[40]

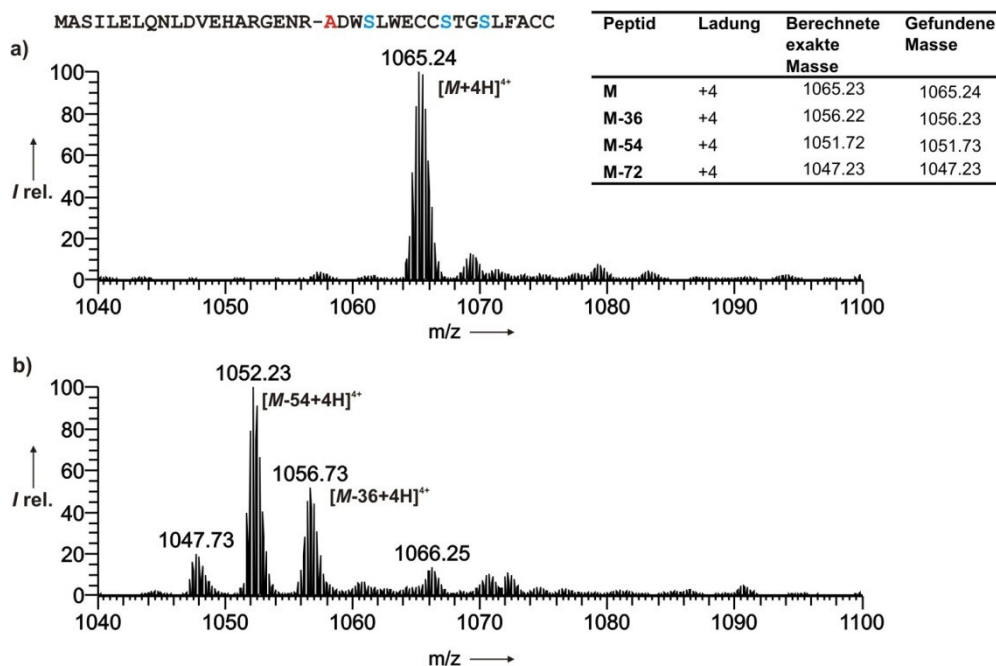


Abbildung 68: LC-HR-ESI-MS-Spektren (ESI-Exactive-MS) der Umsetzung von LabA2_{S1A} mit LabKC_{His6}. a) Kontrollansatz ohne Enzym, b) Inkubation mit LabKC_{His6} für 2 h bei 28°C unter 3-facher Dehydratisierung des Peptids ($[M-54+4H]^{4+} = 1052.23$) als Hauptprodukt.

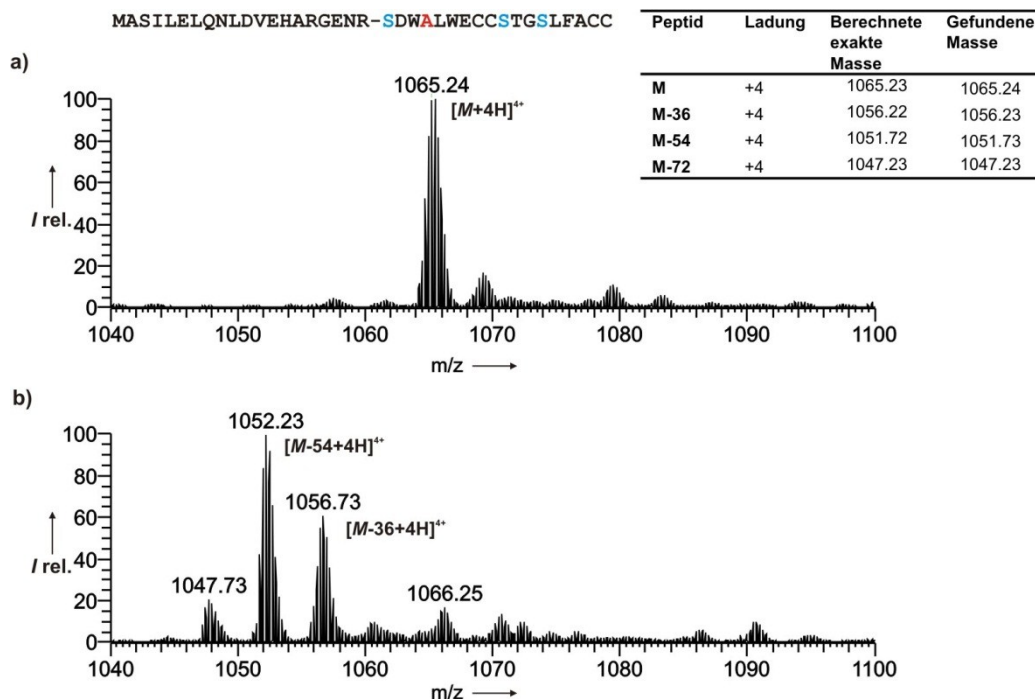


Abbildung 69: LC-HR-ESI-MS-Spektren (ESI-Exactive-MS) der Umsetzung von LabA2_{S4A} mit LabKC_{His6}. a) Kontrollansatz ohne Enzym, b) Inkubation mit LabKC_{His6} für 2 h bei 28°C unter 3-facher Dehydratisierung des Peptids ($[M-54+4H]^{4+} = 1052.23$) als Hauptprodukt.

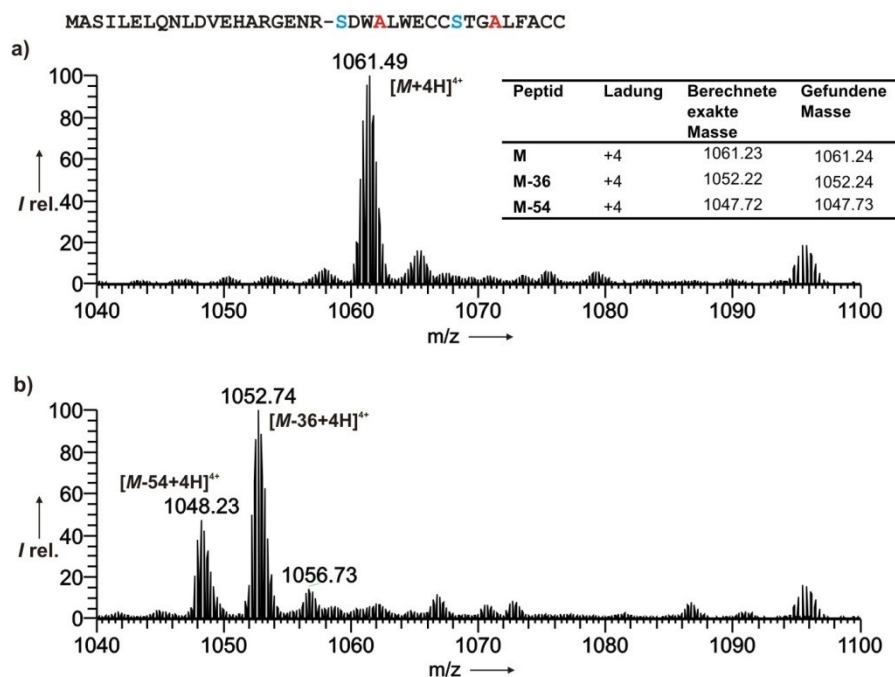
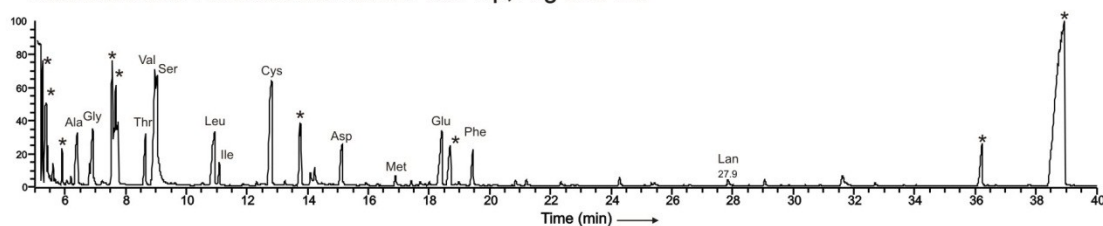
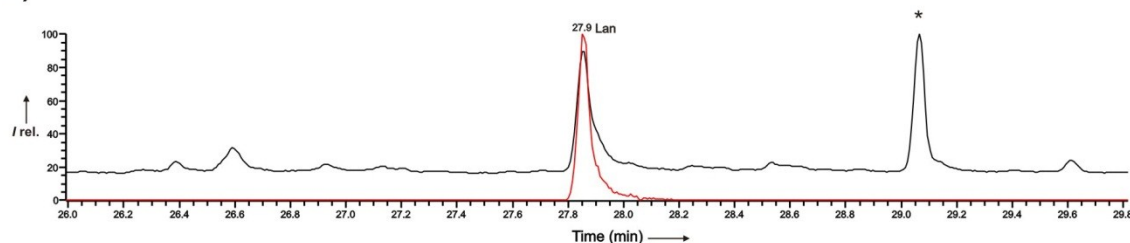


Abbildung 70: LC-HR-ESI-MS-Spektren (ESI-Exactive-MS) der Umsetzung von LabA2_{S4A_S13A} mit LabKC_{His6}. a) Kontrollansatz ohne Enzym, b) Inkubation mit LabKC_{His6} für 2 h bei 28°C unter 2-facher Dehydratisierung des Peptids ($[M-36+4H]^{4+} = 1052.23$) als Hauptprodukt. Zusätzlich ist ein Produkt mit $[M-54+4H]^{4+} = 1048.23$ zu beobachten, infolge der Dehydratisierung von Thr14.

a) Nachweis aller Aminosäuren außer von Trp, Arg und His



b)



c)

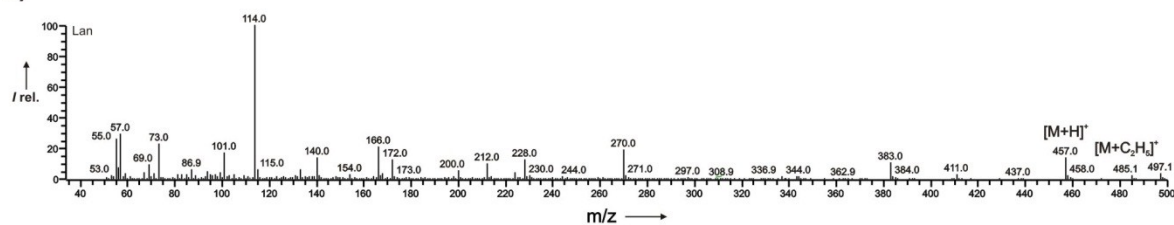
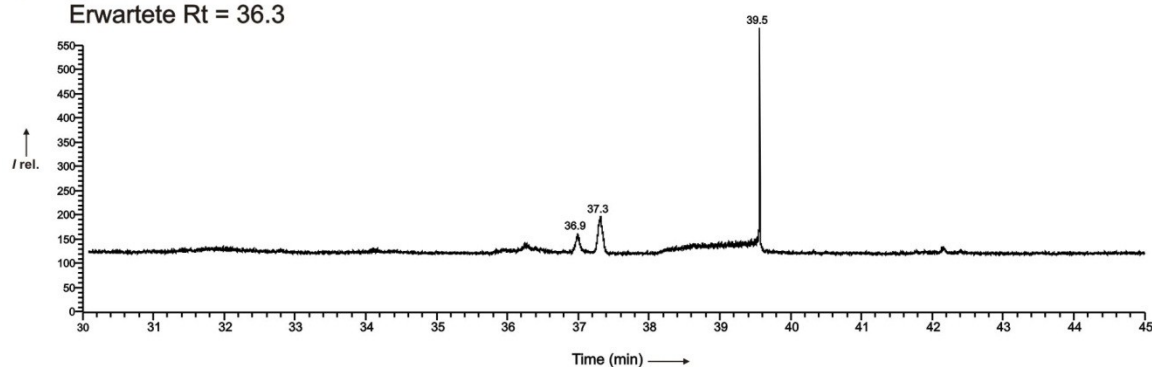
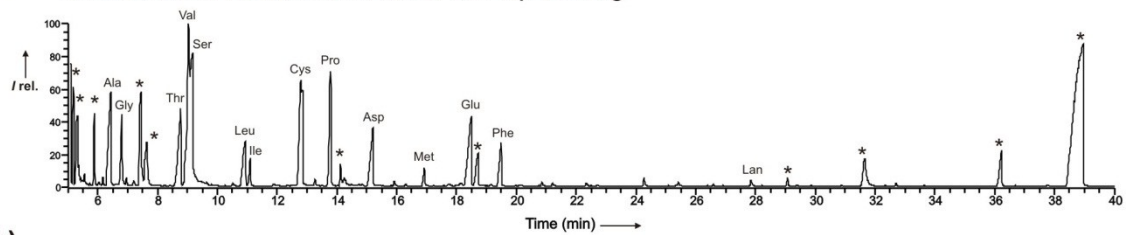
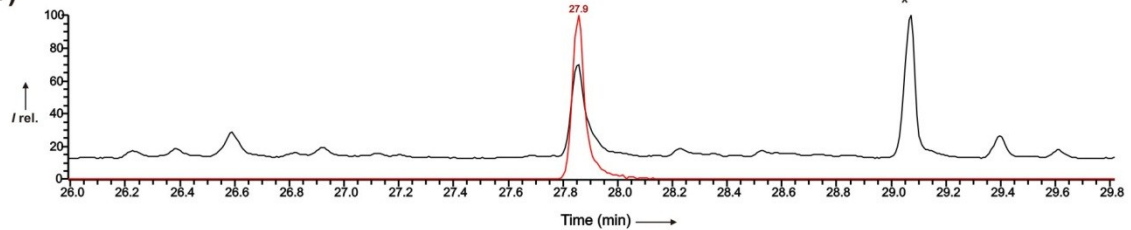
d) SIM für Labionin
Erwartete Rt = 36.3

Abbildung 71: GC-MS Analytik nach Totalhydrolyse und Aminosäurederivatisierung des Reaktionsansatzes von LabKC_{His6} mit dem Präpropeptid von LabA2. a) Chromatogramm mit Zuordnung identifizierter Aminosäuren. b) Vergrößerter Bereich bei der erwarteten Retentionszeit von derivatisiertem Lanthionin (schwarz: TIC; rot: XIC $[M+H]^+ = 457$ Da). c) Fragmentmassenspektrum von Lanthionin. d). Chromatogramm nach SIM-Scan für Labionin mit zwei Signalen im Bereich der erwartenden Retentionszeit von 36.3 min.

a) Nachweis aller Aminosäuren außer von Trp und Arg



b)



c)

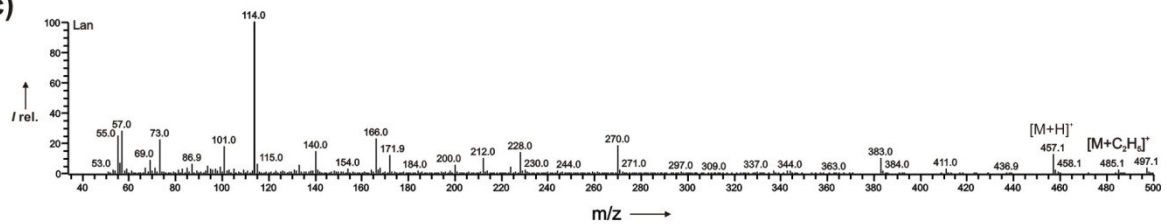
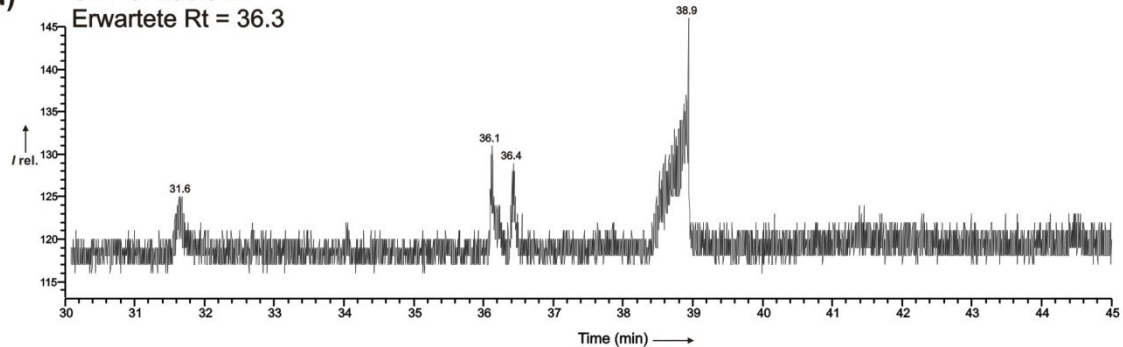
d) SIM für Labionin
Erwartete Rt = 36.3

Abbildung 72: GC-MS Analytik nach Totalhydrolyse und Aminosäurederivatisierung des Reaktionsansatzes von LabKC_{His6} mit dem Präpropeptid von LabA1. a) Chromatogramm mit Zuordnung identifizierter Aminosäuren. b) Vergrößerter Bereich bei der erwarteten Retentionszeit von derivatisiertem Lanthionin (schwarz: TIC; rot: XIC $[M+H]^+ = 457$ Da). c) Fragmentmassenspektrum von Lanthionin. d) Chromatogramm nach SIM-Scan für Labionin mit zwei Signalen im Bereich der erwartenden Retentionszeit von 36.3 min.

7.4.2 Umsetzungen zur Optimierung der Assay-Bedingungen

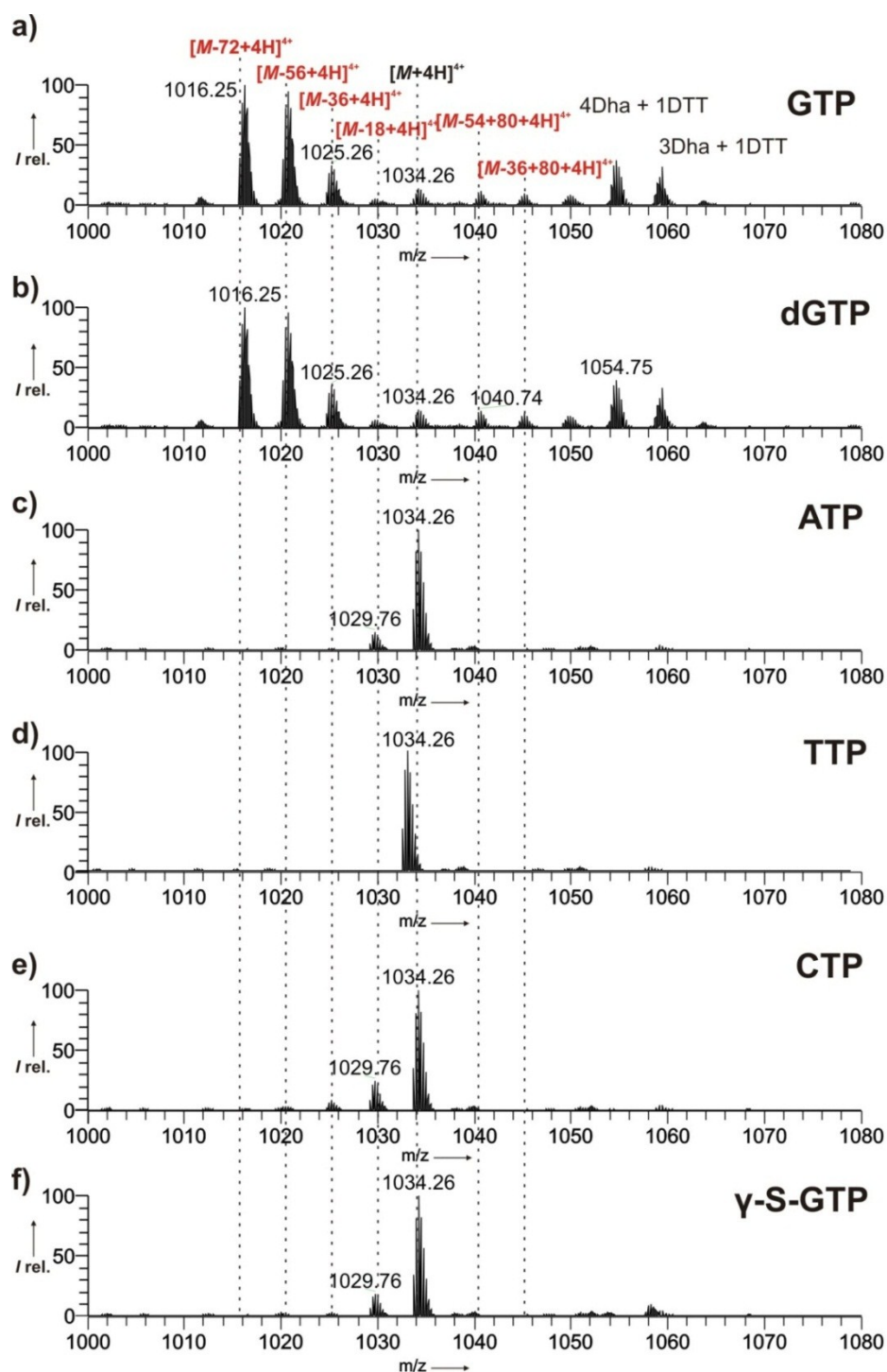


Abbildung 73: LC-HR-ESI-MS-Spektren (ESI-Exactive-MS) der Umsetzung von LabA2*_{C8A_C17G} mit LabKC_{His6} in Gegenwart verschiedener Nukleotid-Cosubstrate nach 2 h. Eine vollständige 4-fache Dehydratisierung konnte in Gegenwart von GTP (a) bzw. dGTP (b) erreicht werden. Bei Verwendung von ATP (c), TTP (d), CTP (e) und γ-S-GTP (f) erfolgte keine bzw. eine geringfügige einfache Dehydratisierung.

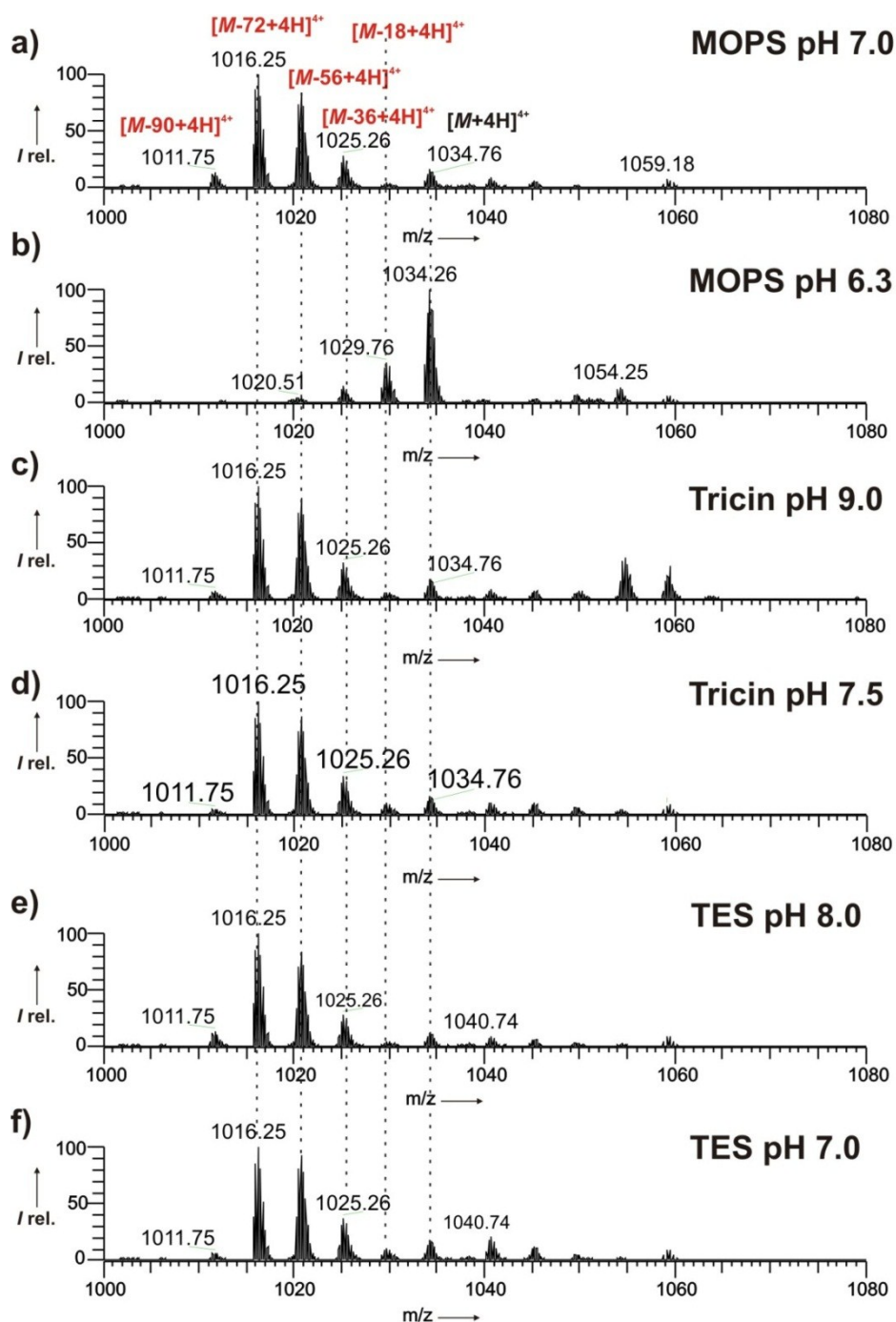


Abbildung 74: LC-HR-ESI-MS-Spektren (ESI-Exacte-MS) der Umsetzung von LabA2*_{C8A_C17G} mit LabKC_{His6} unter Variation der Pufferbedingungen: a) 20 mM MOPS pH 7.0, b) 20 mM MOPS pH 6.3, c) 20 mM Tricin pH 9.0 d) 20 mM Tricin pH 7.5, e) 20 mM TES pH 8.0, f) 20 mM TES pH 7.0.

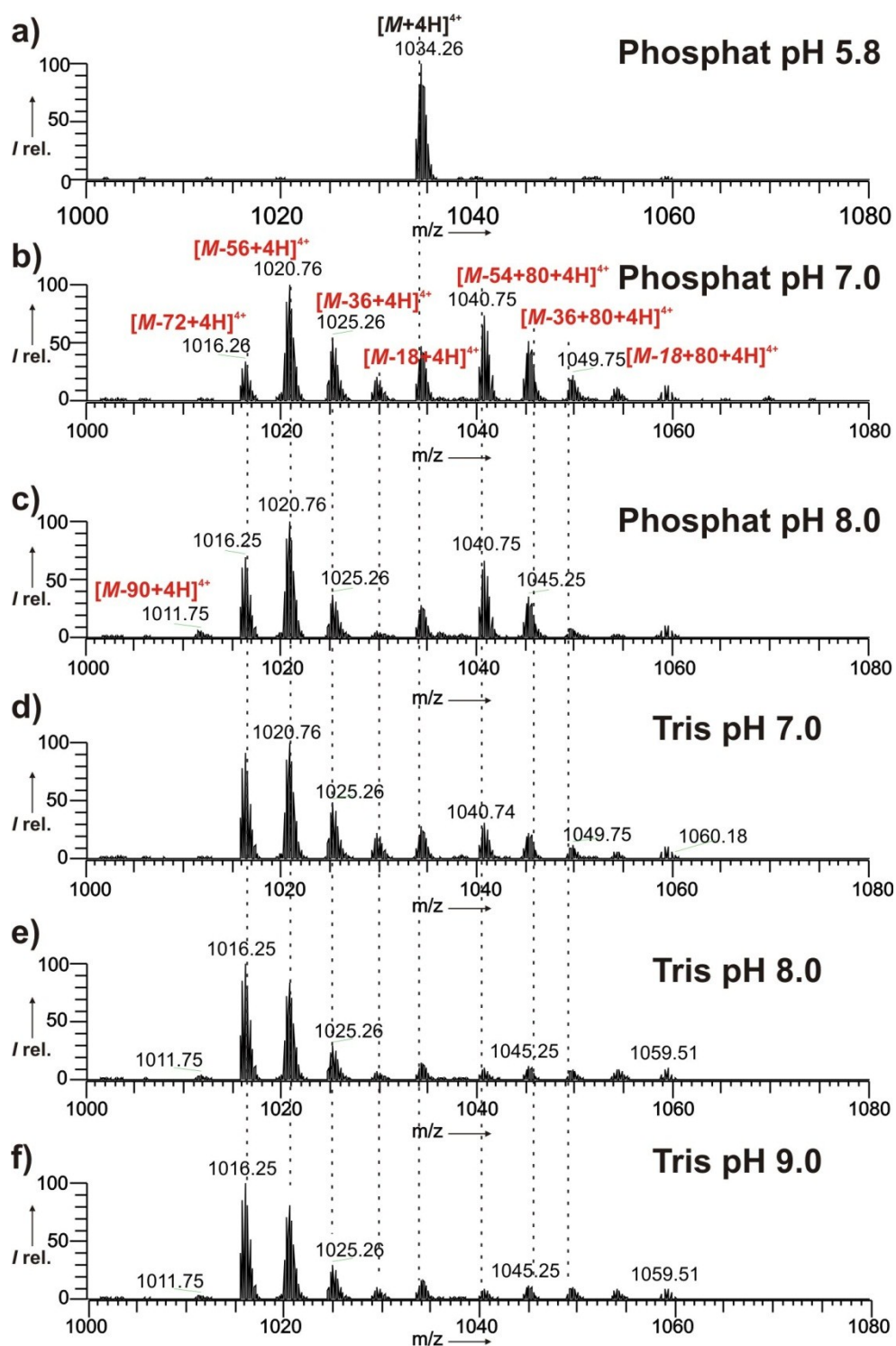


Abbildung 75: LC-HR-ESI-MS-Spektren (ESI-Exacte-MS) der Umsetzung von LabA2*_{C8A_C17G} mit LabKC_{His6} unter Variation der Pufferbedingungen: a) 20 mM NaH₂PO₄ pH 5.8, b) 20 mM NaH₂PO₄ pH 7.0, c) 20 mM NaH₂PO₄ pH 8.0 d) 20 mM Tris pH 7.0, e) 20 mM Tris pH 8.0, f) 20 mM Tris pH 9.0.

Tabelle 31: Übersicht über die getesteten Puffer (20 mM) und pH-Werte. Die weiteren, konstanten Bedingungen waren: 10 mM MgCl_2 , 2 mM GTP, 1 mM DTT, 2 μM Peptid, 0.2 μM $\text{LabKC}_{\text{His6}}$. Weiterhin sind die prozentualen Werte der XICs der Eduktmasse sowie des 4-fach dehydratisierten Peptids aufgeführt.

Puffer	pH-Wert	XIC	
		$[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ [%]*	$[\text{M}-72+4\text{H}]^{4+}$ [%]*
MOPS	pH 7.0	7.3	51.9
MOPS	pH 6.3	59.1	0.8
Tricin	pH 9.0	6.4	43.0
Tricin	pH 7.5	7.8	48.9
TES	pH 8.0	7.6	60.0
TES	pH 7.0	7.9	46.4
Tris	pH 7.0	10.0	37.8
Tris	pH 8.0	6.7	49.4
Tris	pH 9.0	7.4	47.2
NaH_2PO_4	pH 5.8	98.7	1.2
NaH_2PO_4	pH 7.0	11.6	10.6
NaH_2PO_4	pH 8.0	8.6	28.7

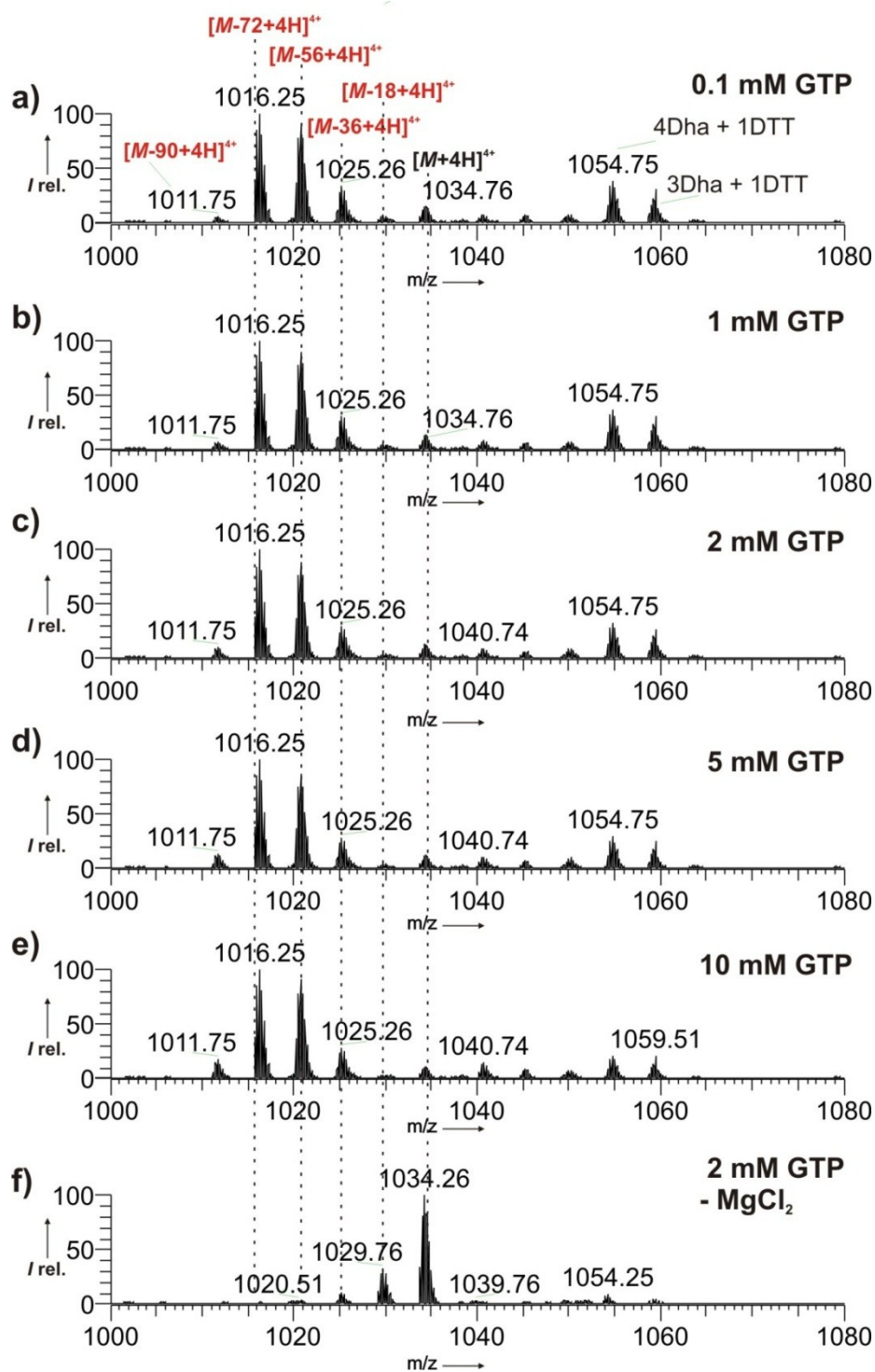


Abbildung 76: LC-HR-ESI-MS-Spektren (ESI-Exacte-MS) der Umsetzung von LabA2*_{C8A_C17G} mit LabKC_{His6} unter Variation der GTP-Konzentration und Einfluss von MgCl₂ nach 2 h Inkubation. Eine vollständige 4-fache Dehydratisierung konnte bei allen GTP-Konzentrationen beobachtet werden: a) 0.1 mM, b) 1 mM, c) 2 mM, d) 5 mM, e) 10 mM. In Abwesenheit von 10 mM MgCl₂ erfolgte nahezu keine Modifizierung (f).

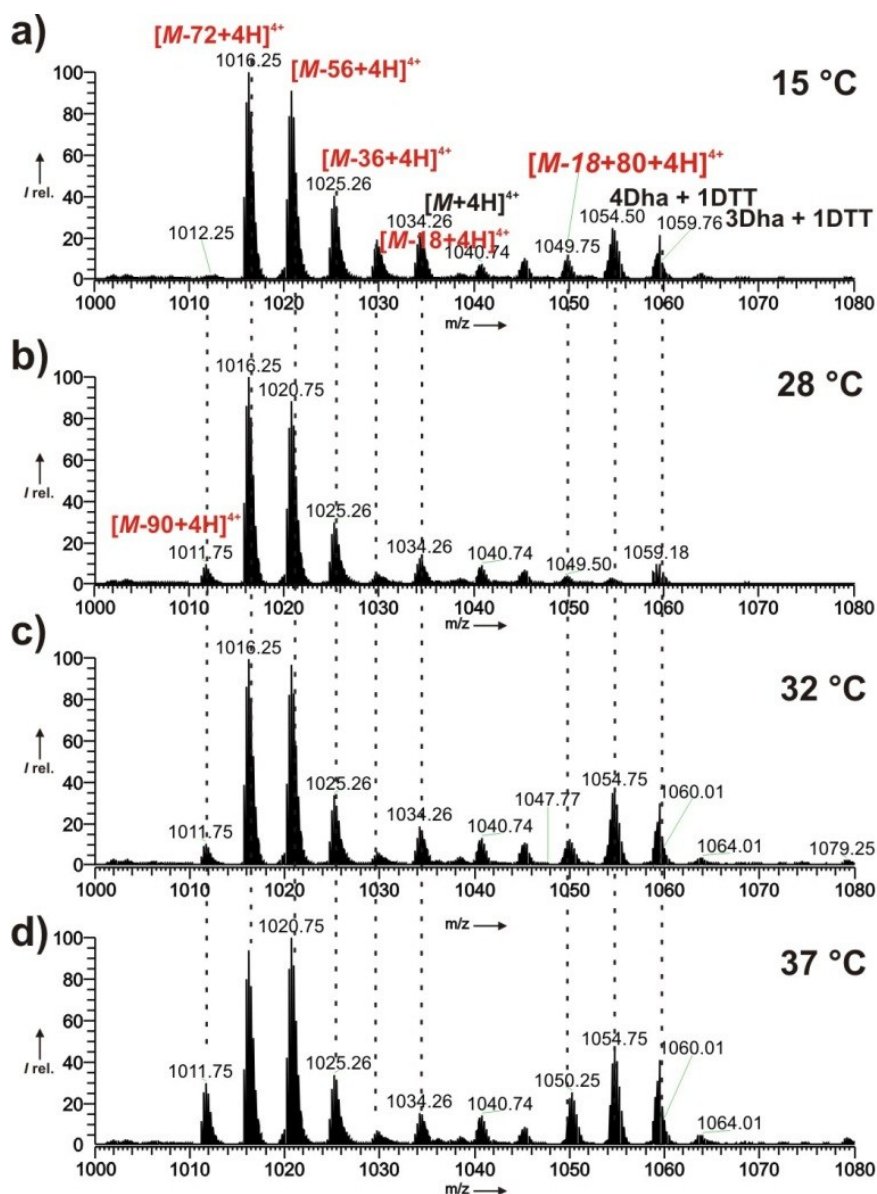


Abbildung 77: LC-HR-ESI-MS-Spektren (ESI-Exactive-MS) der Umsetzung von LabA2*_{C8A_C17G} mit LabKC_{His6} bei unterschiedlichen Temperaturen: Umsetzungen wurden bei 15 °C (a), 28 °C (b), 32 °C (c) und bei 37 °C (d) durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 2 h in 20 mM TES pH 8.0, 2 mM GTP bei einem Enzym/Substrat-Verhältnis von 1:10.

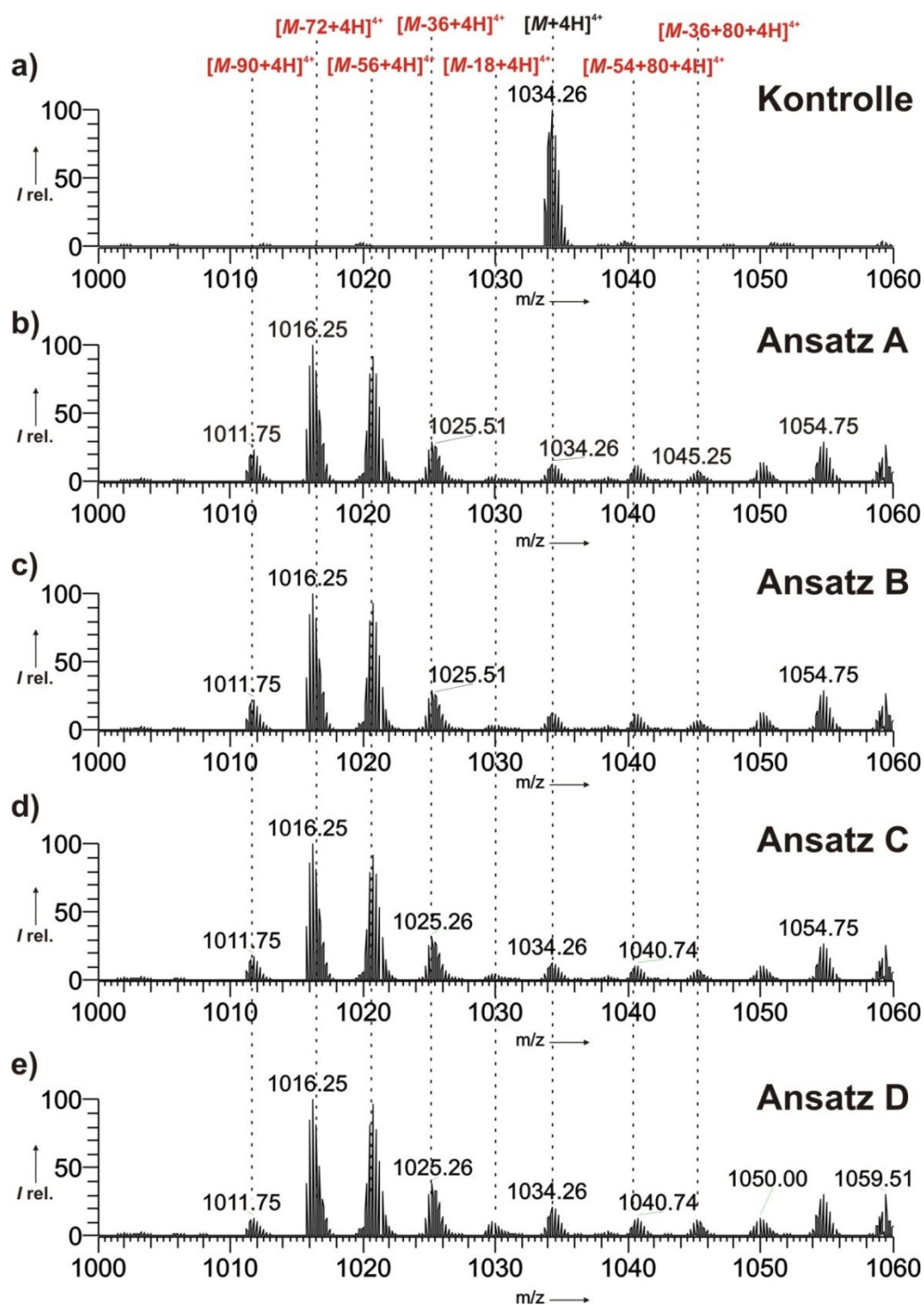


Abbildung 78: LC-ESI-MS-Spektren (ESI-Exacte-MS) zur Untersuchung der zeitabhängigen Enzymaktivität von LabKC mit LabA2*_{C8A_C17G}. Die Ansätze A-D wurden parallel über einen Zeitraum von 120 min bei 28°C inkubiert. Nach jeweils 30 min erfolgte eine erneute Zugabe von 5 µM LabA2*_{C8A_C17G} nach dem in Tabelle 32 gezeigten Schema (Ansatz B 2x, C 3x und D 4x).

Tabelle 32: Schema für die Inkubation zur Untersuchung der zeitabhängigen Enzymaktivität von LabKC (+LabA2 = erneute Zugabe von LabA2*_{C8A_C17G})

	A	B	C	D
t = 0 min	+ LabA2	+ LabA2	+ LabA2	+ LabA2
t = 30 min	-	+ LabA2	+ LabA2	+ LabA2
t = 60 min	-	-	+ LabA2	+ LabA2
t = 90 min	-	-	-	+ LabA2
t = 120 min	-	-	-	-

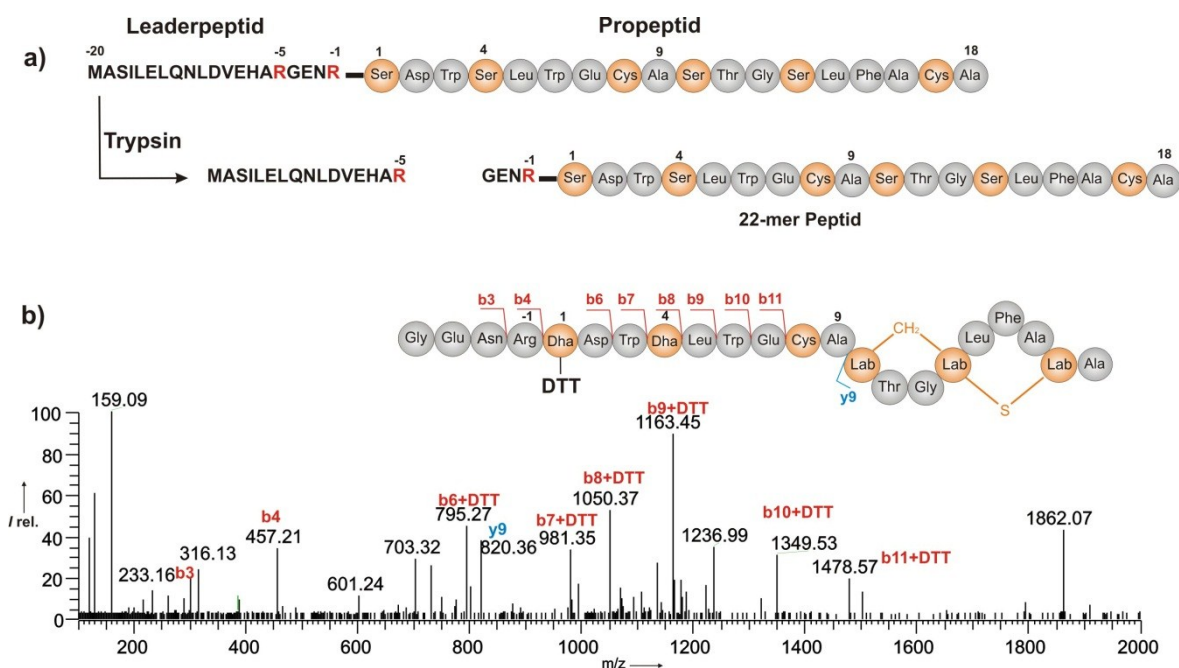


Abbildung 79: LC-ESI-MS/MS-Spektren (ESI-Orbitrap-MS) zur Identifizierung des DTT-Addukts im 4-fach dehydratisierten LabA2*-Peptid nach Umsetzung mit LabKC_{His6}. a) 22-mer Fragment nach Trypsin Verdau von LabA2*. b) LC-ESI-MS/MS-Spektrum des 4-fach dehydratisierten 22-mer Peptids mit DTT-Addukt ($[M+154+2H]^{2+}=1236.99$) nach Inkubation mit LabKC_{His6}. Das DTT-Addukt konnte dem Dha an Position 1 zugeordnet werden. Hinweis auf Zyklisierung im C-terminalen Segment aufgrund fehlender Fragment-Ionen.

7.4.3 LC-MS-Spektren zur Charakterisierung der Funktionalität des Leaderpeptids

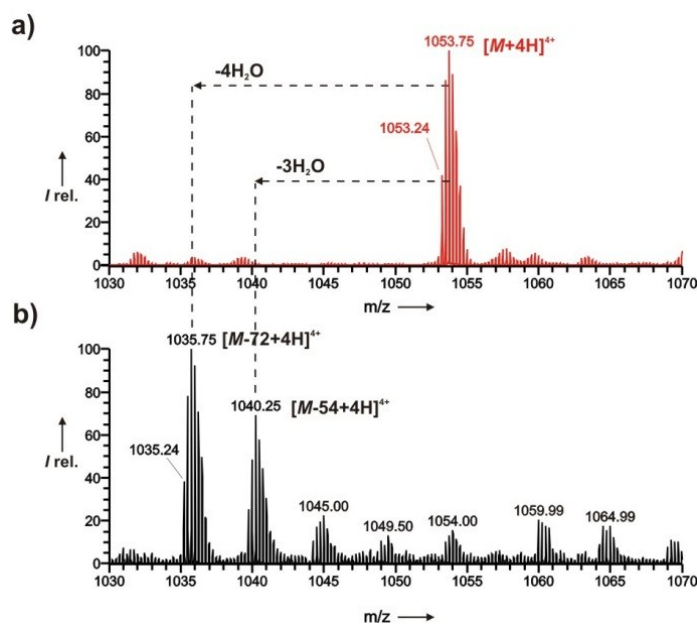


Abbildung 80: LC-HR-ESI-MS (ESI-Exactive-MS) der Umsetzung von LabA2* mit LabKC_{His6}. a) $[M+4H]^{4+}$ -Ionen der Inkubation ohne Enzym; b) $[M+4H]^{4+}$ -Ionen nach Umsetzung mit LabKC_{His6} zeigen 3-fach ($[M-54+4H]^{4+}$) und 4-fach ($[M-72+4H]^{4+}$) dehydratisierte Peptide als Hauptprodukte.

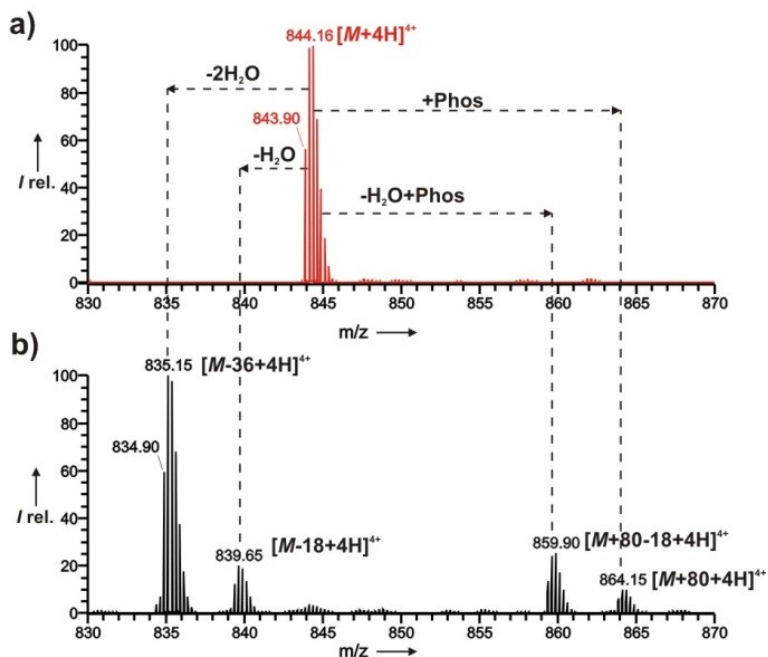


Abbildung 81: LC-HR-ESI-MS (ESI-Exactive-MS) der Umsetzung von LabA2** mit LabKCHis₆. a) $[M+4H]^{4+}$ -Ionen von LabA2** des Kontrollansatzes ohne Enzym; b) $[M+4H]^{4+}$ -Ionen nach Inkubation mit LabKC_{His6} mit dem 2-fach dehydratisierten Peptid als Hauptprodukt ($[M-36+4H]^{4+} = 834.90$).

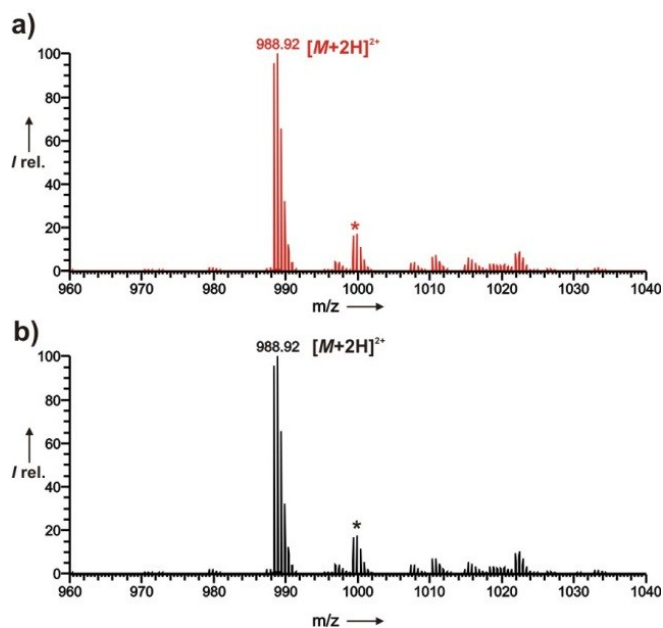


Abbildung 82: LC-HR-ESI-MS (ESI-Exactive-MS) der Umsetzung des acetylierten LabA2-Propeptids Ac-LabA2*₁₋₁₈ ($[M+2H]^{2+} = 988.41$) nach Inkubation ohne Enzym (a) und nach Umsetzung mit LabKC_{His6} (b). Im Vergleich zur Kontrollprobe konnte keine Modifizierung beobachtet werden. Die mit “*” markierten Signale kennzeichnen Nebenprodukte der Peptidsynthese.

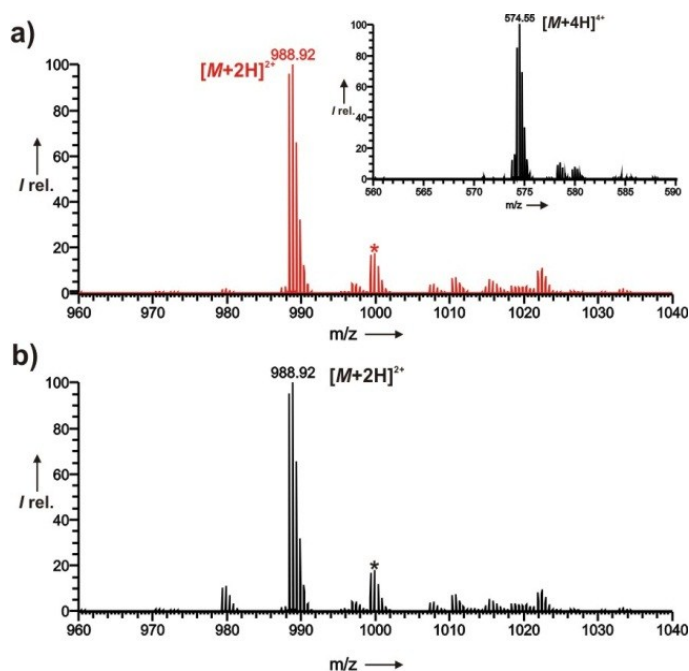


Abbildung 83: LC-HR-ESI-MS (ESI-Exactive-MS) der Umsetzung des acetylierten LabA2 Propeptids Ac-LabA2*₁₋₁₈ ($[M+2H]^{2+} = 988.41$) in Gegenwart des amidierten Leaderpeptids LabA2.20-1CONH₂ ($[M+4H]^{4+} = 574.30$) ohne Enzym (a) und nach Inkubation mit LabKC_{His6} (b). Im Vergleich zur Kontrollprobe konnte keine Dehydratisierung oder Phosphorylierung des Propeptids durch LabKC_{His6} beobachtet werden. Die mit “*” markierten Signale kennzeichnen Nebenprodukte der Peptidsynthese.

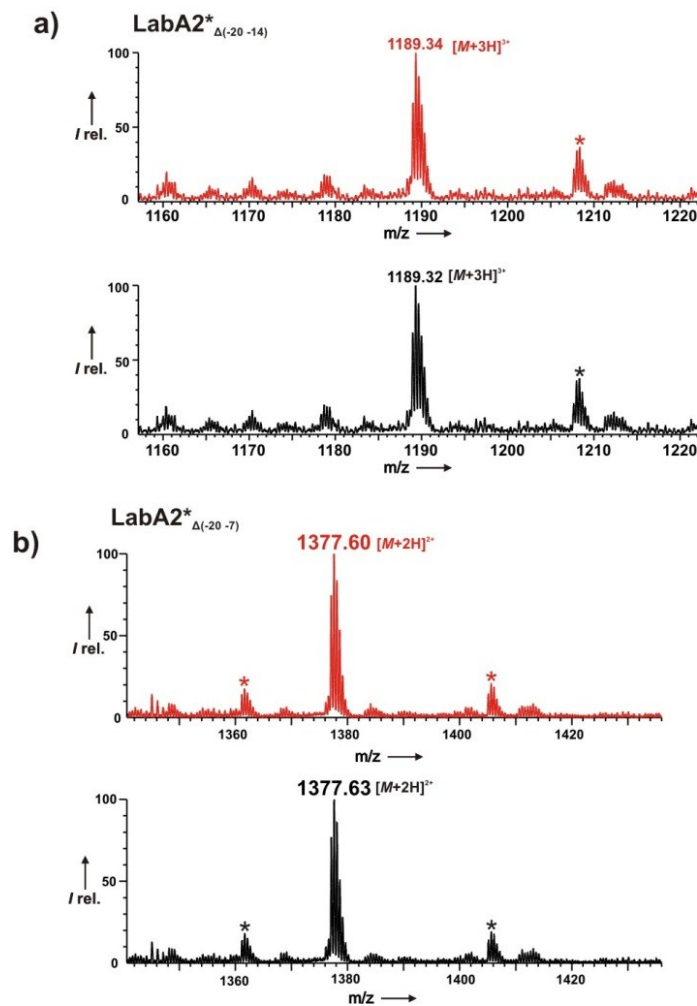


Abbildung 84: LC-ESI-MS (Q-ToF2) von Leaderpeptidvarianten mit Deletionen von a) sechs (LabA2*_{Δ(-20 -14)} $[M+3H]^{3+} = 1189.21$) bzw. b) 13 Aminosäuren (LabA2*_{Δ(-20 -7)} $[M+2H]^{2+} = 1377.61$) ausgehend vom *N*-Terminus. Nach Inkubation mit LabKC_{His6} (schwarz) konnte in beiden Fällen keine Umsetzung im Vergleich zur Kontrollinkubation ohne Enzym (rot) beobachtet werden. Mit „*“ markierte Signale entsprechen Nebenprodukten der Peptidsynthese.

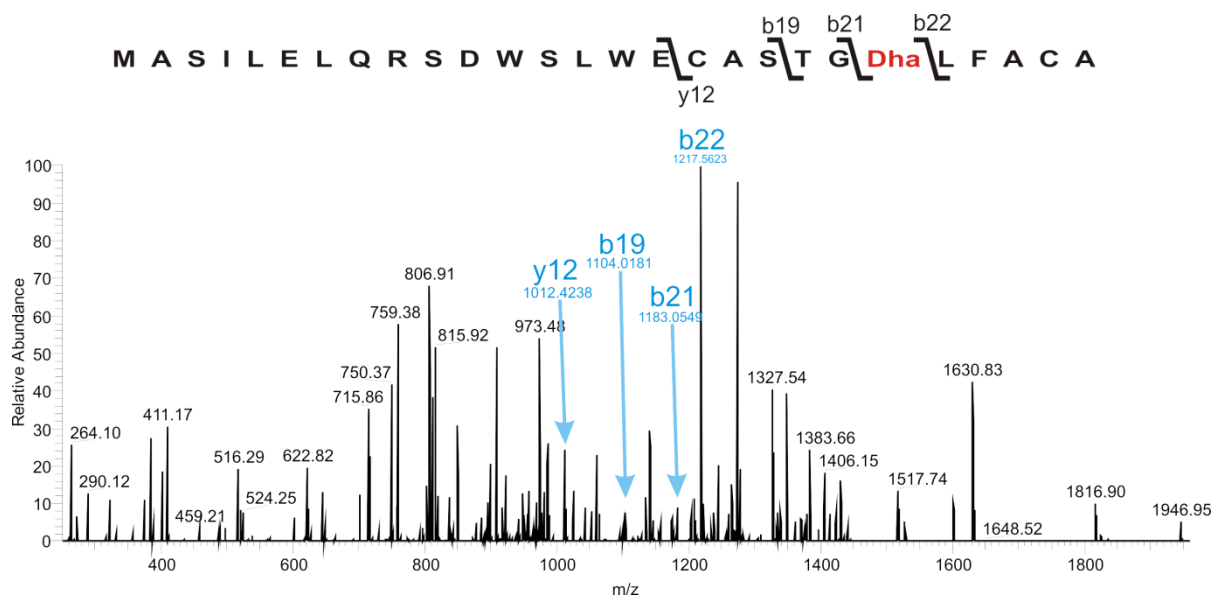


Abbildung 85: LC-ESI-MS/MS (LTQ Orbitrap) des einfach dehydratisierten Propeptids von LabA2* _{$\Delta(-12-2)$} nach Umsetzung mit LabKC_{His6} und anschließendem Verdau mit Trypsin. Aufgrund der identifizierten Fragment-Ionen konnte die erfolgte Dehydratisierung eindeutig dem Serinrest an Position 13 des Propeptids zugewiesen werden. Dieser Versuch wurde von M.Sc. Biotechnology Bartłomiej Krawczyk durchgeführt.

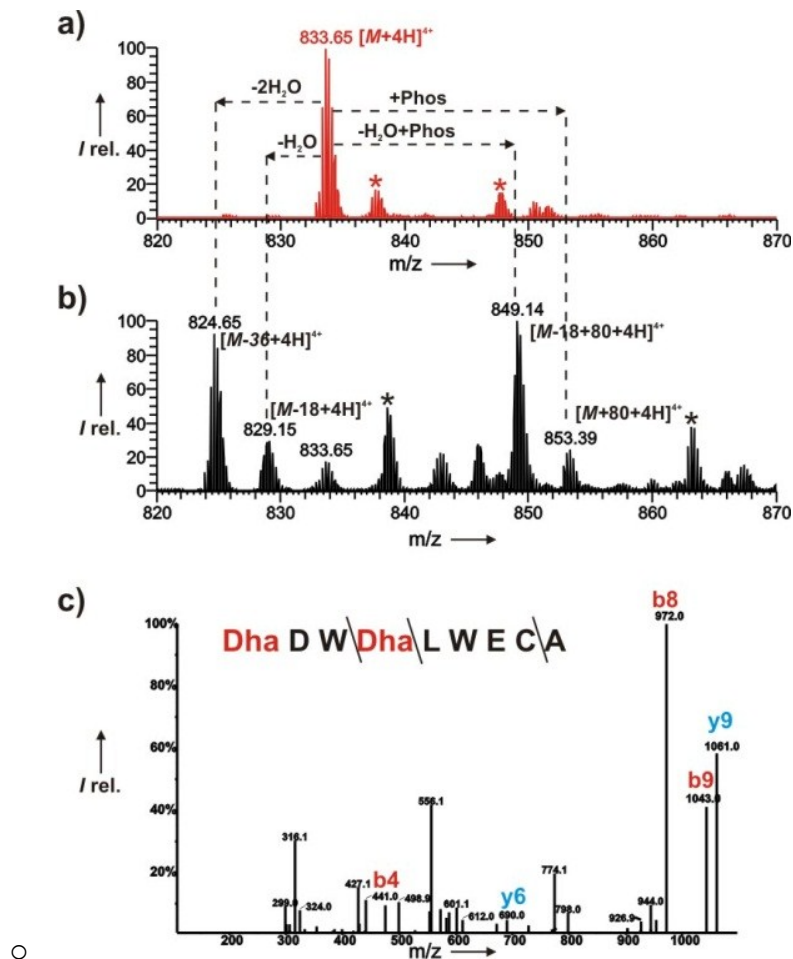


Abbildung 86: LC-ESI-HR-MS (ESI-Exactive-MS) der Umsetzung von LabA2**_{E-3S} mit LabKCHis₆ (0.7 µM). a) $[M+4H]^{4+}$ -Ionen von LabA2**_{E-3S} des Kontrollansatzes ohne Enzym ($[M+4H]^{4+} = 833.65$). b) $[M+4H]^{4+}$ -Ionen nach Inkubation mit LabKCHis₆ mit dem zweifach dehydratisierten Peptid als Hauptprodukt ($[M-36+4H]^{4+} = 824.65$). c) LC-ESI-MS/MS Spektrum (QTrap) des zweifach dehydratisierten Propeptids nach Abspaltung des Leaderpeptids mit Trypsin.

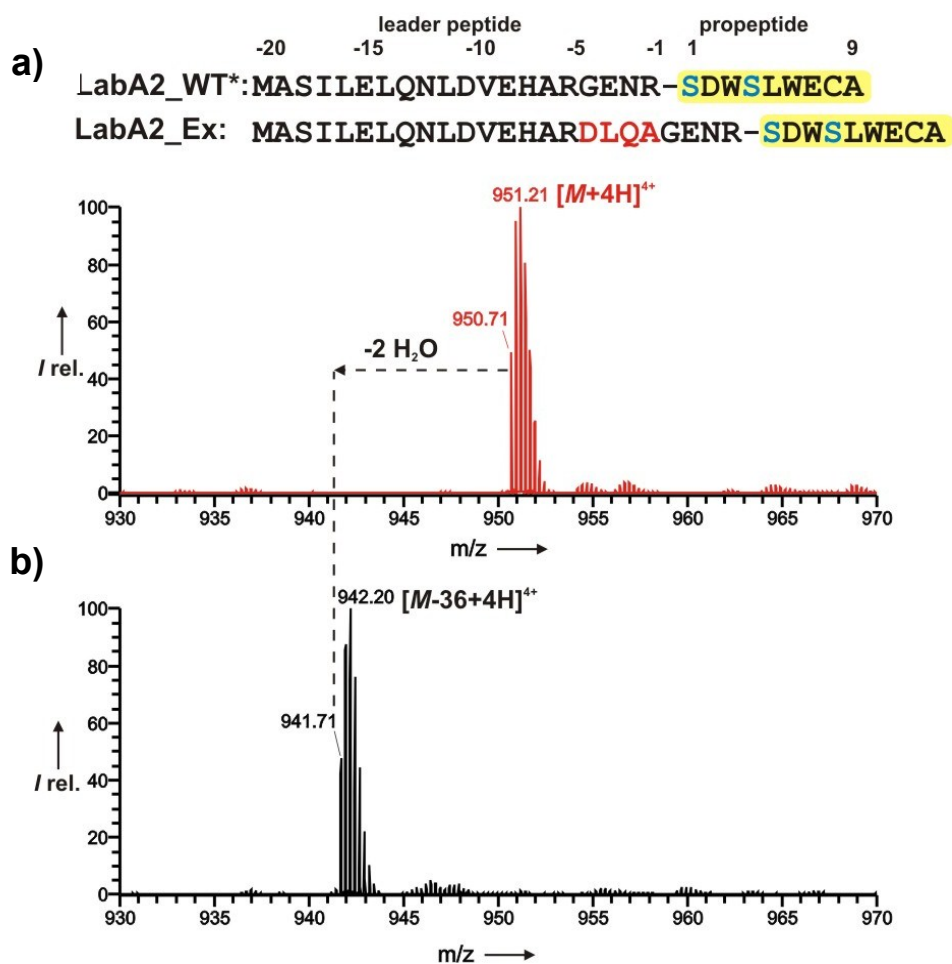


Abbildung 87: LC-ESI-HR-MS (ESI-Exacte-MS) des der um vier Aminosäuren verlängerten Leaderpeptidvariante LabA2**_ex. a) $[M+4H]^{4+}$ -Ionen des Kontrollansatzes ohne Enzym ($[M+4H]^{4+} = 950.70$); b) Spektrum des Reaktionsansatzes nach Inkubation mit LabKC_{His6} mit der zweifachen Dehydratisierung des Peptids als Hauptprodukt ($[M-36+4H]^{4+} = 941.71$).

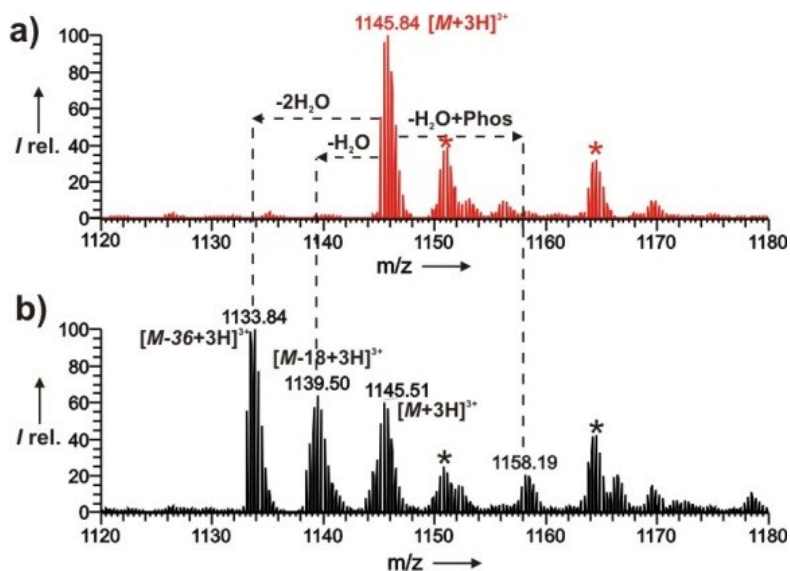


Abbildung 88: LC-ESI-HR-MS (ESI-Exactive-MS) des chimären Peptids SapB₂₀₋₁_LabA2₁₋₉ (10 μM) .a) $[M+3H]^{3+}$ -Ionen des Kontrollansatzes ohne Enzym ($[M+3H]^{3+} = 1145.84$). b) Spektrum des Reaktionsansatzes nach Inkubation mit LabKC_{His6} (0.7 μM) mit der zweifachen Dehydratisierung des Peptids als Hauptprodukt ($[M-36+3H]^{3+} = 1133.84$).

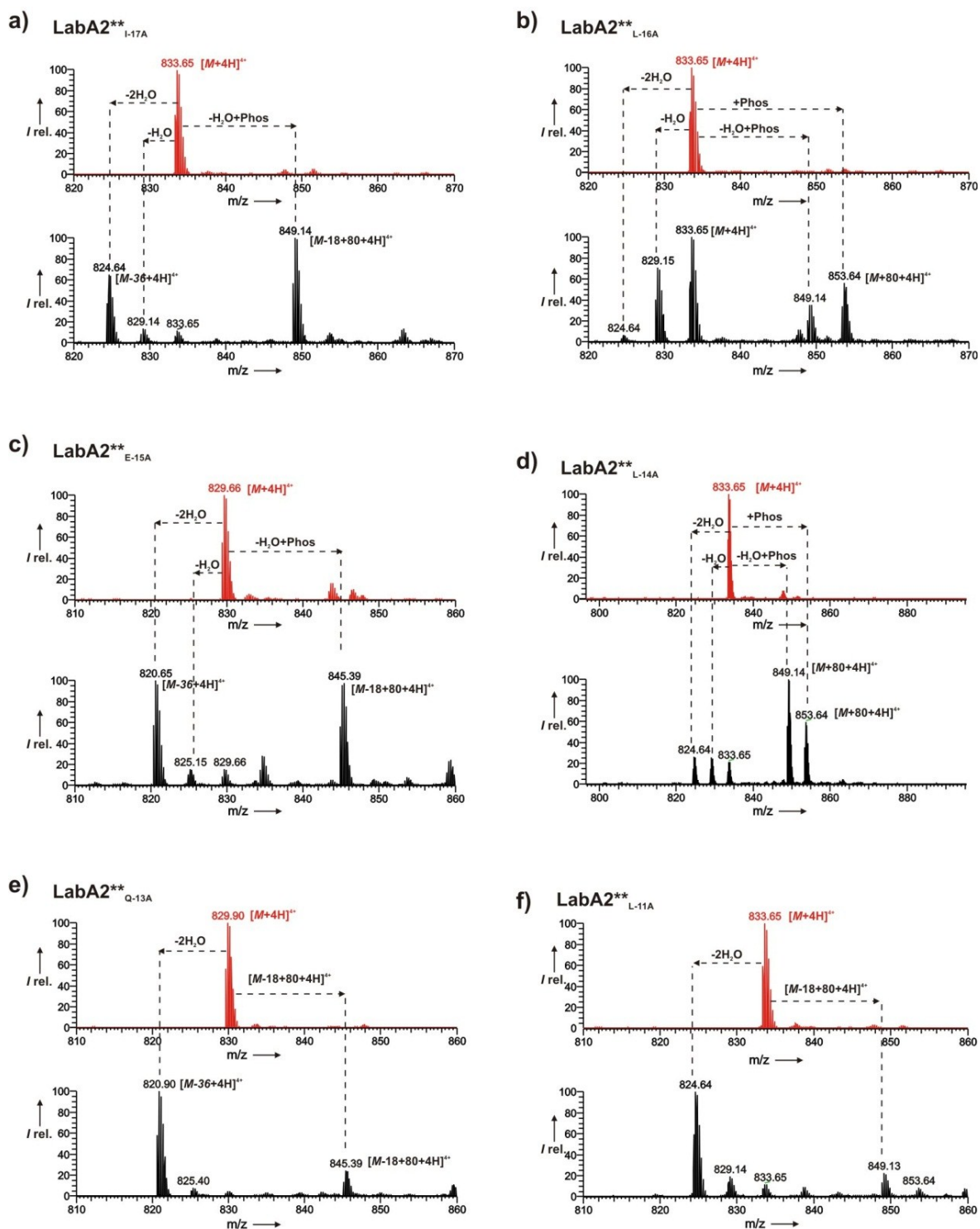


Abbildung 89: LC-HR-ESI-MS (ESI-Exactive-MS) der Testierung von Peptiden mit Alanin-Austauschen im Leaderpeptid (10 µM) nach Inkubation mit LabKC_{His6} (0.7 µM). Jeweilige Kontrollansätze ohne Enzym sind durch rote Spektren gekennzeichnet a) LabA2**_{L-17A}; b) LabA2**_{L-16A}; c) LabA2**_{E-15A}; d) LabA2**_{L-14A}; e) LabA2**_{Q-13A}; f) LabA2**_{L-11A}. Weitere Informationen bezüglich Molekülmassen und Umsatzeffizienz sind in Tabelle 33 aufgeführt.

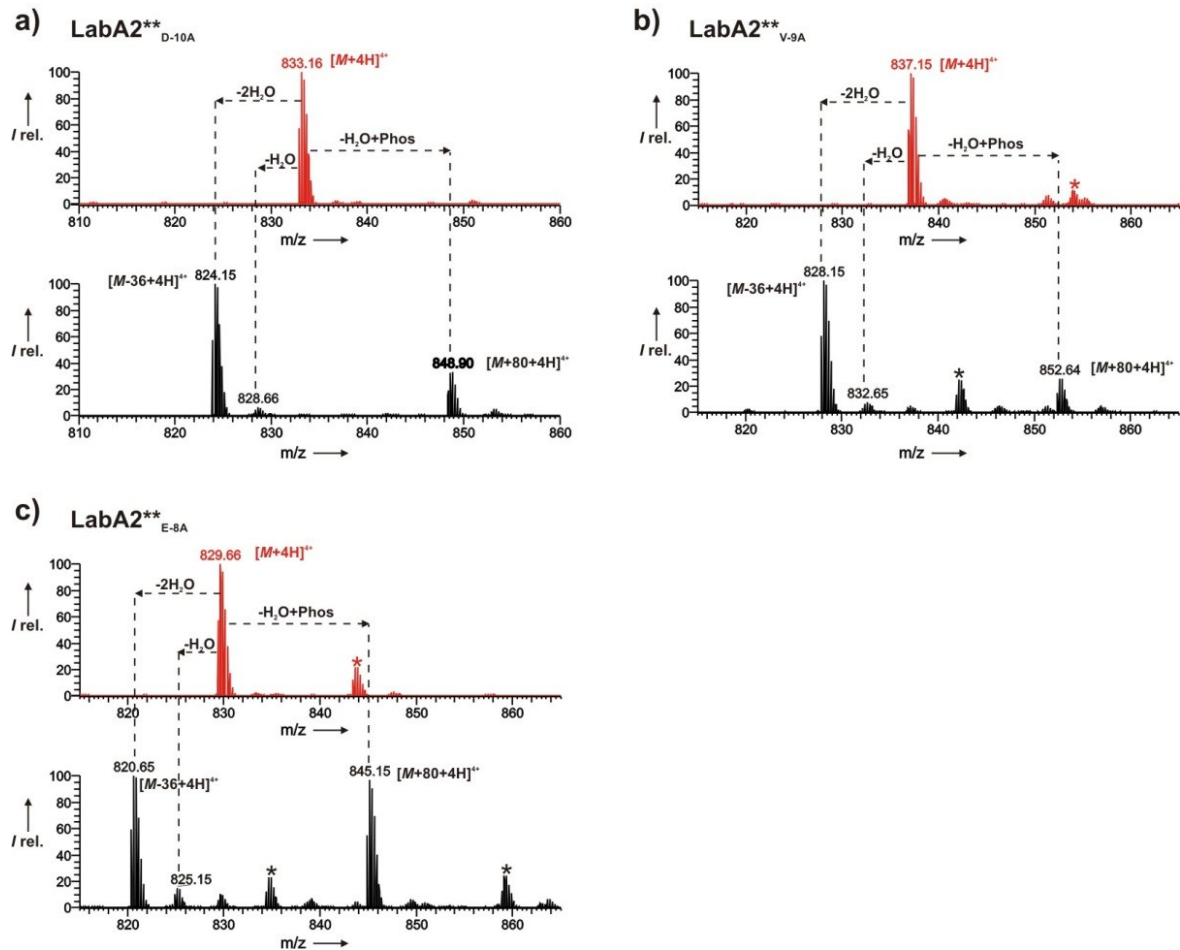


Abbildung 90: LC-HR-ESI-MS (ESI-Exacte-MS) der Testierung von Peptiden (10 µM) mit Alanin-Austauschen im C-terminalen Bereich des Leaderpeptids nach Inkubation mit LabKC_{His6} (0.7 µM). Jeweilige Kontrollansätze ohne Enzym sind durch rote Spektren gekennzeichnet a) LabA2**_{D-10A}; b) LabA2**_{V-9A}; c) LabA2**_{E-8A}. Weitere Informationen bezüglich Molekülmassen und Umsatzeffizienz sind in Tabelle 33 aufgeführt.

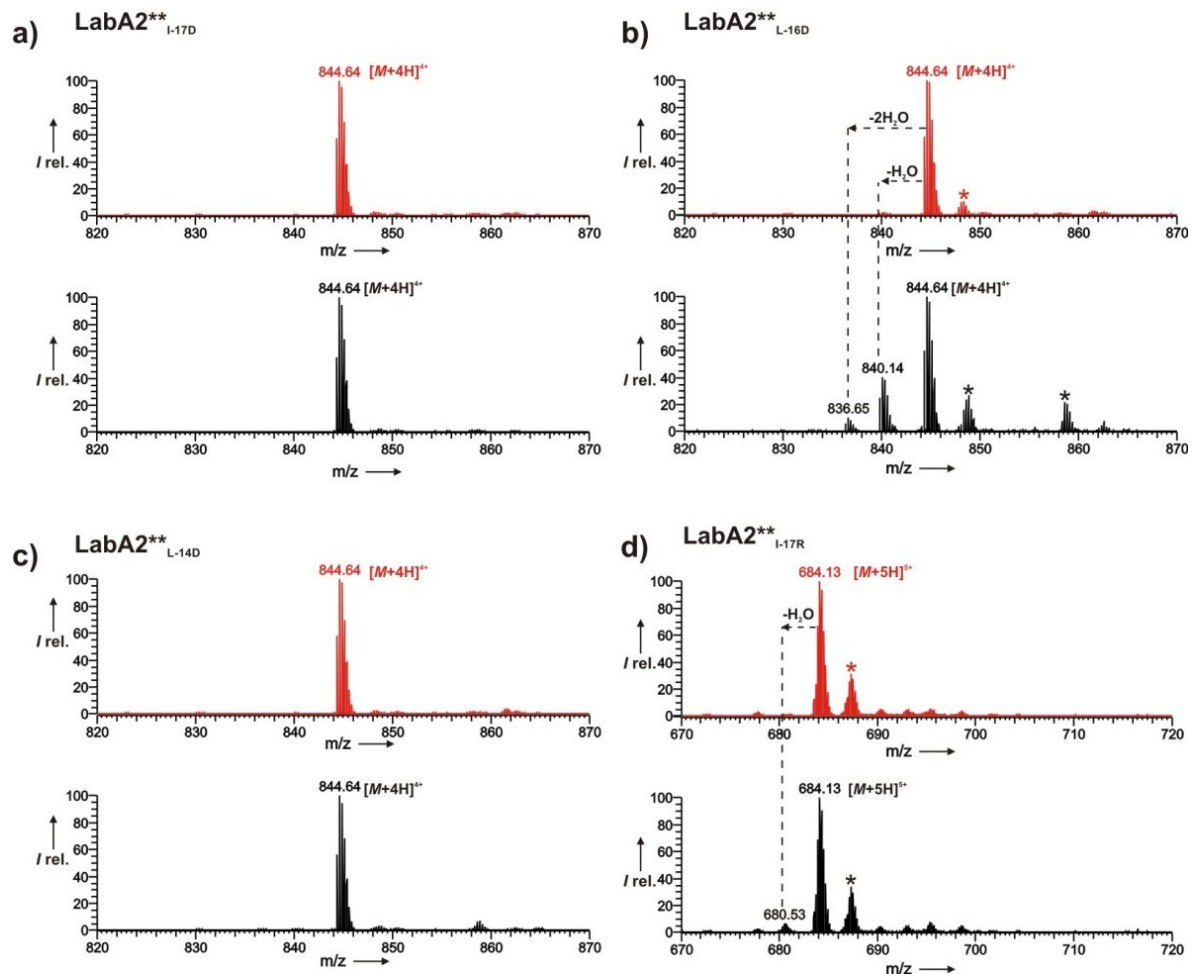


Abbildung 91: LC-HR-ESI-MS-Spektren (ESI-Exactive-MS) der Testierung von Peptiden (10 μ M) mit Einzelaustauschen im C-terminalen Bereich des Leaderpeptids nach Inkubation mit LabKC_{His6} (0.7 μ M). Jeweilige Kontrollansätze ohne Enzym sind durch rote Spektren gekennzeichnet a) LabA2**_{L-17D}; b) LabA2**_{L-16D}; c) LabA2**_{L-14D}; d) LabA2**_{L-17R}. Weitere Informationen bezüglich der Molekülmassen und Umsatzeffizienz sind in Tabelle 33 aufgeführt.

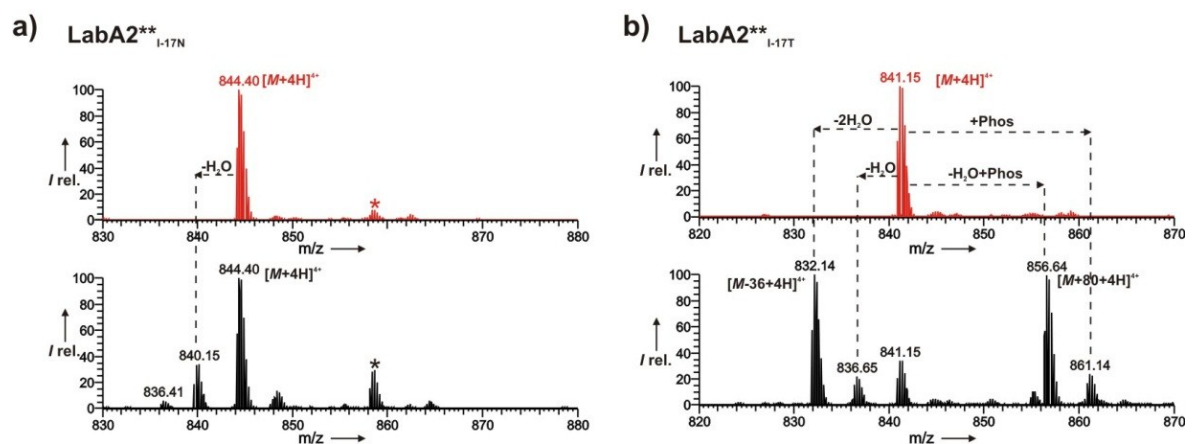


Abbildung 92: LC-HR-ESI-MS (ESI-Exactive-MS) der LabA2-Peptide mit Austausch von Ile-17 gegen a) Asn LabA2**_{L-17N} und b) Thr LabA2**_{L-17T} nach Inkubation mit LaKC_{His6} (0.7 μ M). Jeweilige Kontrollansätze ohne Enzym sind durch rote Spektren gekennzeichnet. Weitere Informationen bezüglich der Molekülmassen und Umsatzeffizienz sind in Tabelle 33 aufgeführt.

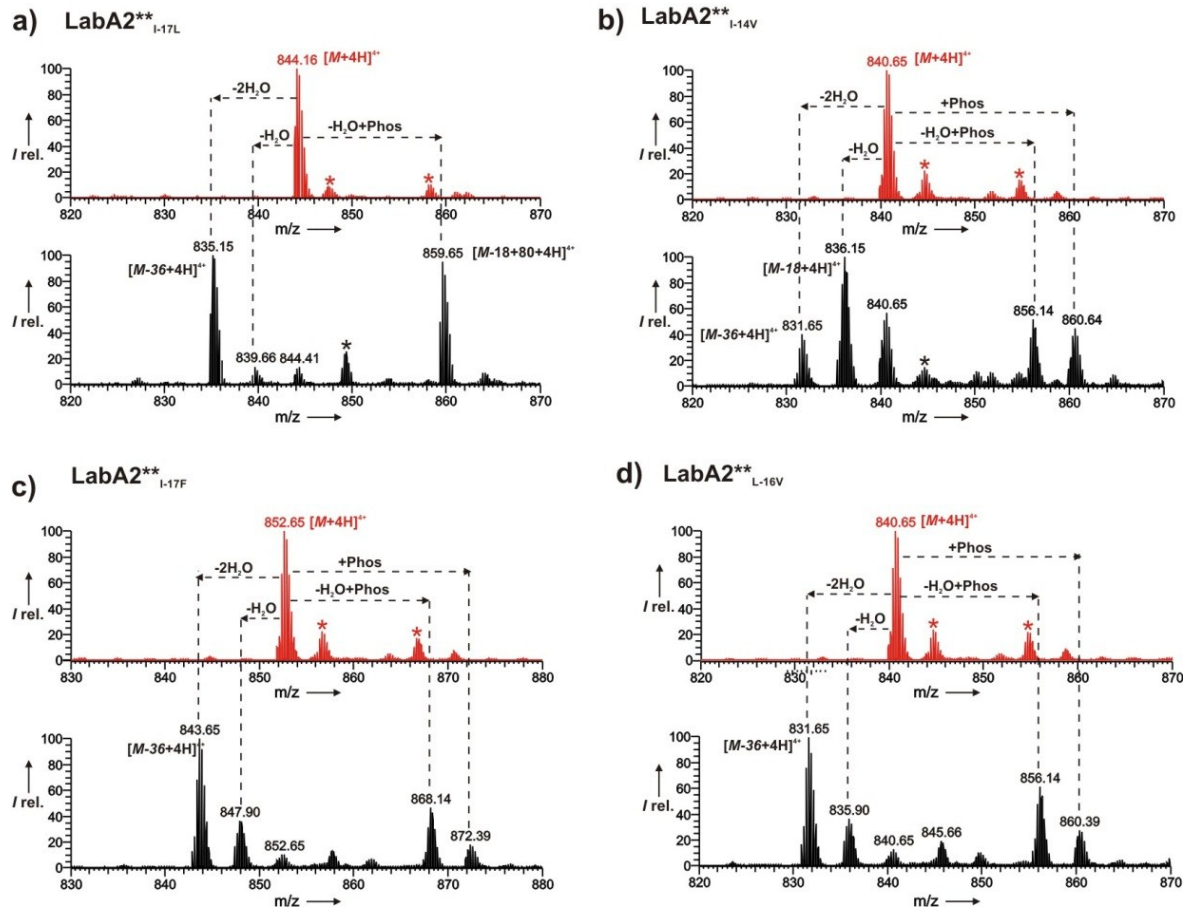
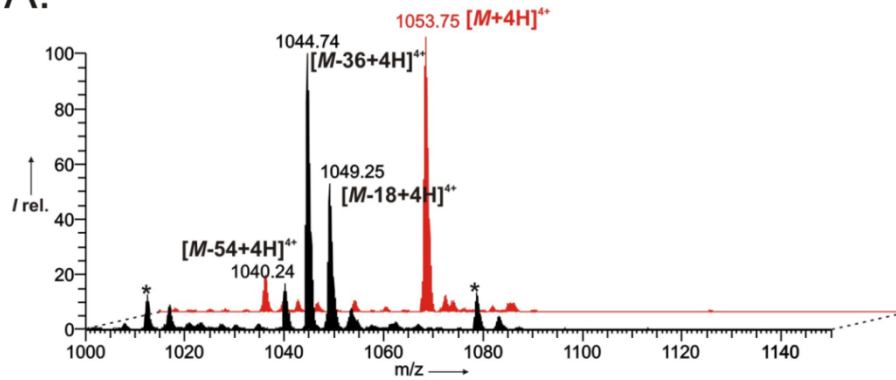
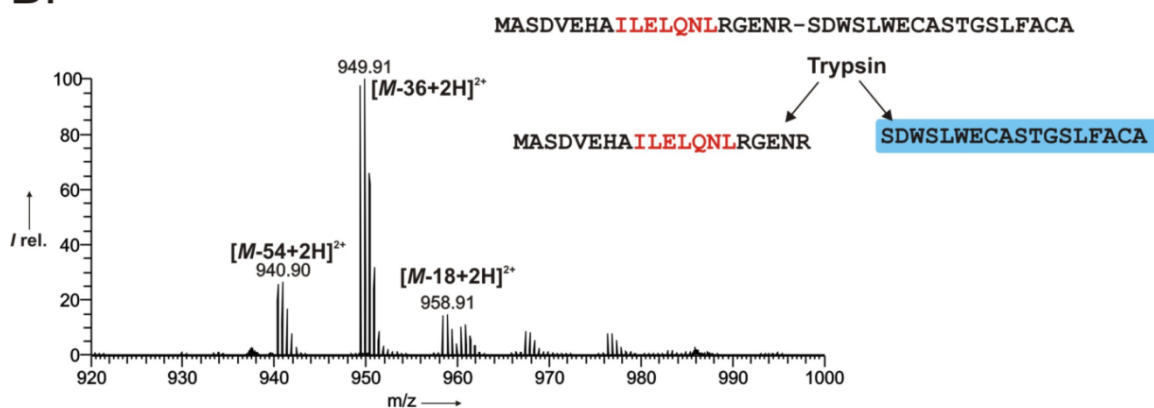


Abbildung 93: LC-HR-ESI-MS (ESI-Exactive-MS) der LabA2-Peptide mit konservativen Austauschen im Leaderpeptid nach Inkubation mit LabKC_{His6} (0.7 μ M). a) LabA2**_{L-17L}, b) LabA2**_{L-14V}, c) LabA2**_{L-17F} und d) LabA2**_{L-16V}. Jeweilige Kontrollansätze ohne Enzym sind durch rote Spektren gekennzeichnet. Weitere Informationen bezüglich der Molekülmassen und Umsatzeffizienz sind in Tabelle 33 aufgeführt.

A.



B.



C.

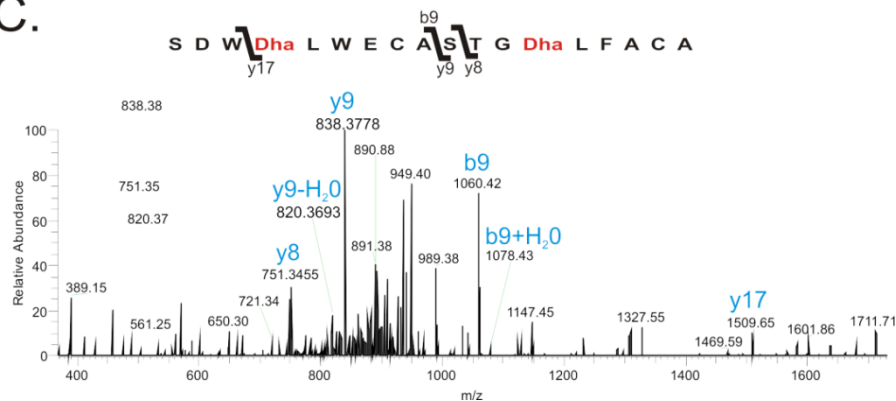


Abbildung 94: a) LC-HR-ESI-HR-MS (ESI-Exacte-MS) des Peptids mit der Versetzung des konservierten Motivs (LabA2*_{shift}) nach Umsetzung mit LabKC_{His6}. Als Kontrollansatz diente eine Inkubation ohne Enzym (rot). Die mit "*" markierten Signale kennzeichnen Nebenprodukte der Peptidsynthese. b) Massenspektrum des tryptischen Verdaus des Reaktionsansatzes. c) LC-ESI-MS/MS (LTQ-Orbitrap) des 2-fach dehydratisierten LabA2*_{shift}-Peptids nach Verdau mit Trypsin. Nach Zuordnung der Fragment-Ionen konnten die beiden Dehydratisierungen den ursprünglichen Positionen von Ser4 und Ser13 zugewiesen werden.

Tabelle 33: Zusammenfassung von Leaderpeptidvarianten mit Einzelaustauschen, die auf Dehydratisierungsaktivität durch LabKC getestet wurden. Die prozentuale Zusammensetzung der gebildeten Intermediate wurde aus den extrahierten Ionenchromatogrammen (XICs) der zugehörigen Molekülmassen berechnet.

Bezeichnung	Modifizierung	Ladung	Masse calcd	Masse gefunden	Effektivität des Umsatzes
LabA2**_{L-17A}	M	+4	833.39	833.40	M 7,4
	M+80	+4	853.38	853.41	M+80 23,3
	M-18	+4	828.88	828.89	M-18 13,6
	M-18+80	+4	848.88	848.89	M-18+80 34,2
	M-36	+4	824.38	824.39	M-36 21,4
LabA2**_{L-16A}	M	+4	833.39	833.40	M 28,6
	M+80	+4	853.38	853.39	M+80 17,6
	M-18	+4	828.88	828.89	M-18 19,4
	M-18+80	+4	848.88	848.89	M-18+80 31,4
	M-36	+4	824.38	824.39	M-36 3,0
LabA2**_{E-15A}	M	+4	829.40	829.41	M 3,3
	M+80	+4	849.39	849.40	M+80 7,6
	M-18	+4	824.90	824.90	M-18 5,8
	M-18+80	+4	844.89	844.89	M-18+80 17,1
	M-36	+4	820.39	820.40	M-36 66,2
LabA2**_{L-14A}	M	+4	833.39	833.40	M 11,1
	M+80	+4	853.38	853.39	M+80 24,0
	M-18	+4	828.88	828.89	M-18 17,7
	M-18+80	+4	848.88	848.89	M-18+80 36,6
	M-36	+4	824.38	824.39	M-36 10,6
LabA2**_{Q-13A}	M	+4	829.64	829.65	M 6,5
	M+80	+4	849.64	849.66	M+80 6,5
	M-18	+4	825.14	825.15	M-18 14,5
	M-18+80	+4	845.13	845.14	M-18+80 18,1
	M-36	+4	820.64	820.65	M-36 54,4
LabA2**_{L-11A}	M	+4	833.39	833.40	M 5,0
	M+80	+4	853.38	853.41	M+80 7,1
	M-18	+4	828.88	828.89	M-18 12,1
	M-18+80	+4	848.88	848.88	M-18+80 10,3
	M-36	+4	824.38	824.39	M-36 65,6

LabA2**_{D-10A}	M	+4	832.90	832.91	
	M+80	+4	852.89	852.90	
	M-18	+4	828.40	828.40	
	M-18+80	+4	848.39	848.40	
	M-36	+4	823.90	823.90	
LabA2**_{V-9A}	M	+4	836.89	836.90	
	M+80	+4	856.88	856.91	
	M-18	+4	832.39	832.40	
	M-18+80	+4	852.38	852.39	
	M-36	+4	827.89	827.90	
LabA2**_{E-8A}	M	+4	829.40	829.41	
	M+80	+4	849.39	849.42	
	M-18	+4	824.90	824.90	
	M-18+80	+4	844.89	844.89	
	M-36	+4	820.39	820.40	
LabA2**_{L-17D}	M	+4	844.39	844.39	
	M+80	+4	864.38	n.a.	
	M-18	+4	839.88	n.a.	
	M-18+80	+4	859.87	n.a.	
	M-36	+4	835.38	n.a.	
LabA2**_{L-16D}	M	+4	844.39	844.39	
	M+80	+4	864.38	864.38	
	M-18	+4	839.88	839.89	
	M-18+80	+4	859.87	n.a.	
	M-36	+4	835.38	n.a.	
LabA2**_{L-14D}	M	+4	844.39	844.39	
	M+80	+4	864.38	864.38	
	M-18	+4	839.88	n.a.	
	M-18+80	+4	859.87	n.a.	
	M-36	+4	835.38	n.a.	
LabA2**_{L-17G}	M	+4	829.88	829.89	
	M+80	+4	849.88	849.88	
	M-18	+4	825.38	825.39	
	M-18+80	+4	845.37	n.a.	
	M-36	+4	820.88	n.a.	

LabA2**_{L-17N}	M	+4	844.14	844.15	
	M+80	+4	864.13	864.14	
	M-18	+4	839.64	839.64	
	M-18+80	+4	859.63	859.67	
	M-36	+4	835.13	n.a.	
LabA2**_{L-17T}	M	+4	840.89	840.90	
	M+80	+4	860.88	860.91	
	M-18	+4	836.39	836.40	
	M-18+80	+4	856.38	856.39	
	M-36	+4	831.89	831.89	
LabA2**_{L-17R}	M	+5	684.13	684.13	
	M+80	+5	700.12	n.a.	
	M-18	+5	680.52	680.53	
	M-18+80	+5	696.52	n.a.	
	M-36	+5	676.92	n.a.	
LabA2**_{L-17L}	M	+4	843.90	843.91	
	M+80	+4	863.89	863.92	
	M-18	+4	839.40	839.41	
	M-18+80	+4	859.39	859.40	
	M-36	+4	834.89	834.90	
LabA2**_{L-17F}	M	+4	852.40	852.40	
	M+80	+4	872.39	872.39	
	M-18	+4	847.89	847.90	
	M-18+80	+4	867.88	867.89	
	M-36	+4	843.39	843.40	
LabA2**_{L-14V}	M	+4	840.40	840.40	
	M+80	+4	860.39	860.39	
	M-18	+4	835.89	835.90	
	M-18+80	+4	855.88	855.89	
	M-36	+4	831.39	831.40	
LabA2**_{L-16V}	M	+4	840.40	840.40	
	M+80	+4	860.39	860.39	
	M-18	+4	835.89	835.90	
	M-18+80	+4	855.88	855.89	
	M-36	+4	831.39	831.90	

LabA2** _{E-15P}	M	+4	835.90	835.91	M 33,6 M+80 13,3 M-18 38,2 M-18+80 8,4 M-36 6,6
	M+80	+4	855.89	855.90	
	M-18	+4	831.40	831.41	
	M-18+80	+4	851.39	851.40	
	M-36	+4	826.90	826.90	

7.4.4 LC-MS Spektren zu Phosphopeptiden:

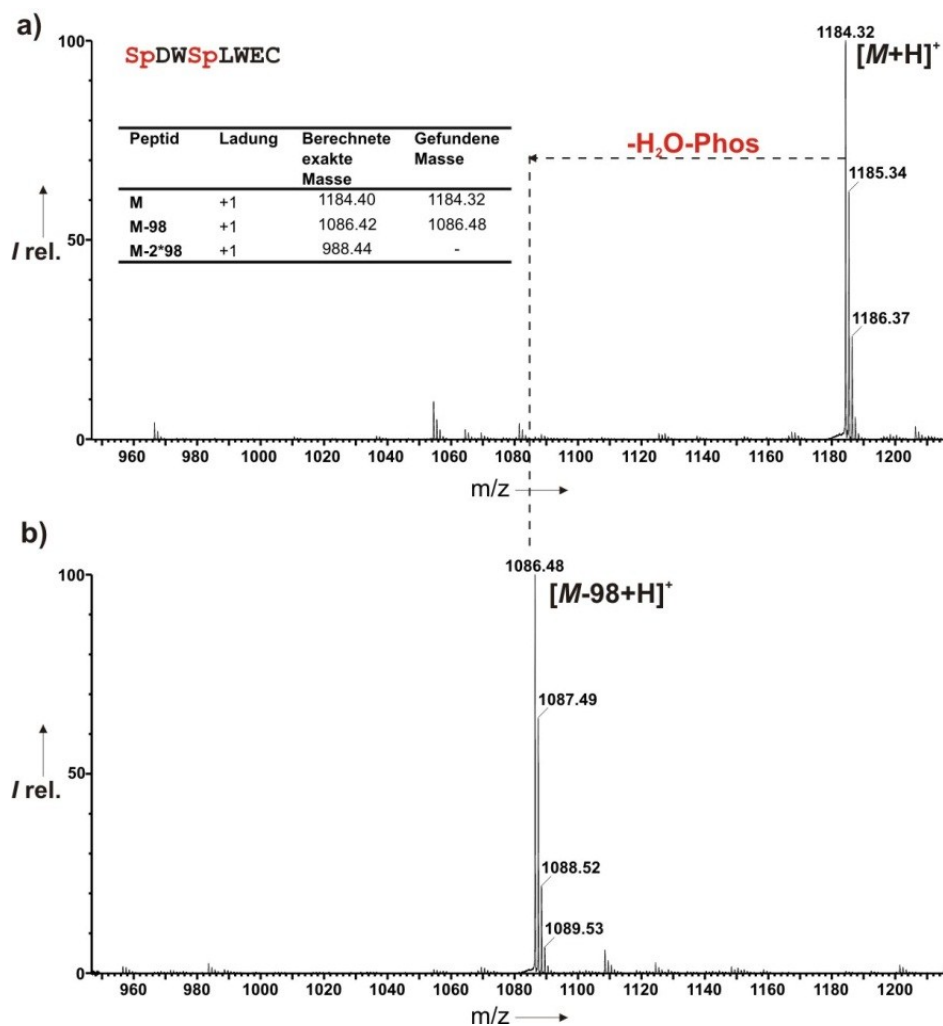


Abbildung 95: LC-ESI -Massenspektren (Q-ToF2) der Umsetzung von LabA2**_{Δ(-20-1)pS1pS4} mit LabKC_{His6}. a) Kontrollansatz ohne Enzym, b) nach Inkubation (2 h) mit LabKC (0.7 μM) ohne GTP. Berechnete und beobachtete Massen der [M+H]⁺-Ionen der Reaktion sind in einer Tabelle zusammengefasst.

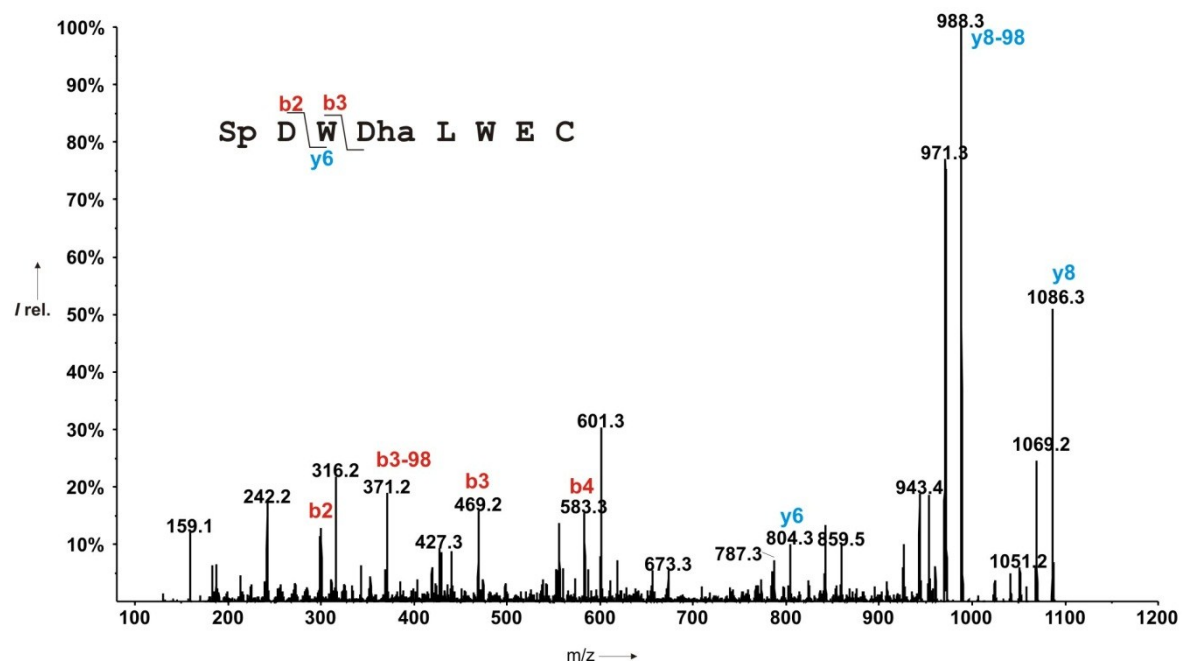


Abbildung 96: LC-ESI-MS/MS (QTrap) des LabA2** $\Delta(-20-1)$ pS1pS4-Peptids nach Umsetzung mit LabKC_{His6}. Fragmentiert wurde das einfach eliminierte Peptid mit der Molekülmasse $[M+H]^+ = 1086.5$ (Kollisionsenergie 50 eV).

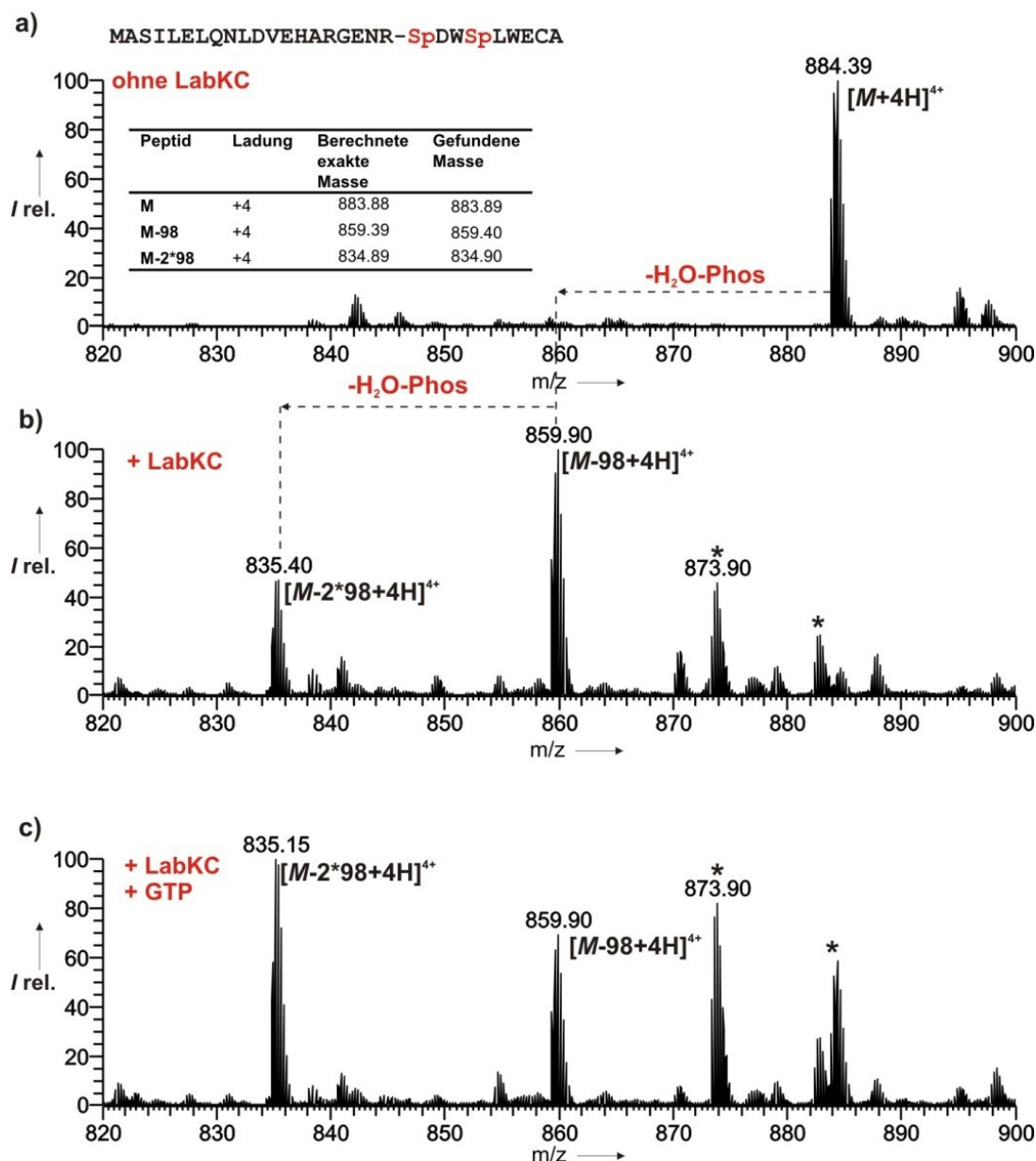


Abbildung 97: LC-ESI-HR-MS (ESI-Exactive-MS) der Umsetzung von LabA2**_{pS1_pS4} (10 μ M) mit LabKC_{His6} (0.7 mM). a) Kontrollansatz ohne Enzym, b) nach Inkubation (2 h) mit LabKC ohne GTP und c) in Anwesenheit von GTP (2 mM) im Reaktionsansatz. Die mit „*“ markierten Signale kennzeichnen Nebenprodukte der Peptidsynthese die in Folge der RP-Reinigung nicht abgetrennt werden konnten. Berechnete und beobachtete Massen der $[M+4H]^{4+}$ -Ionen der Reaktion sind in einer Tabelle zusammengefasst.

7.4.5 Mutagenesestudien

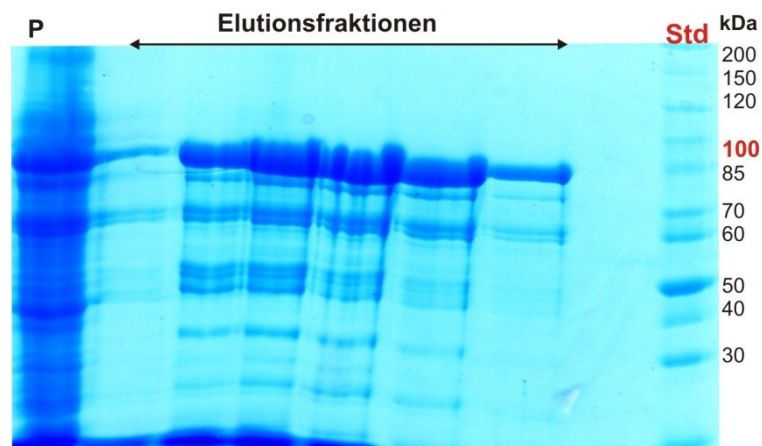


Abbildung 98: SDS-Gel nach Coomassiefärbung mit IMAC-Elutionsfraktionen der Reinigung von Sumo-Lyase-STK (P = Probe der unlöslichen Fraktion nach Zellaufschluss).

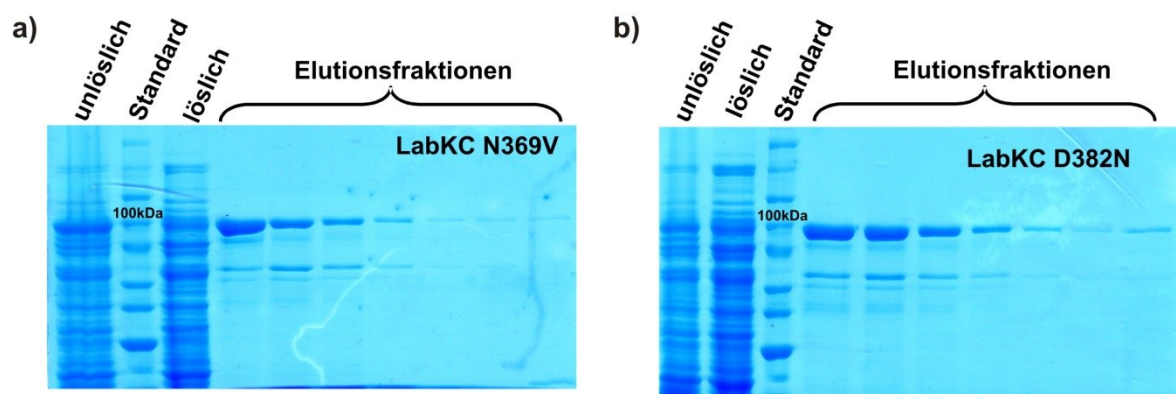


Abbildung 99: SDS-Gele nach Coomassiefärbung mit IMAC-Fractionen der Reinigung von a) LabKC_N369V und b) LabKC_D382N.

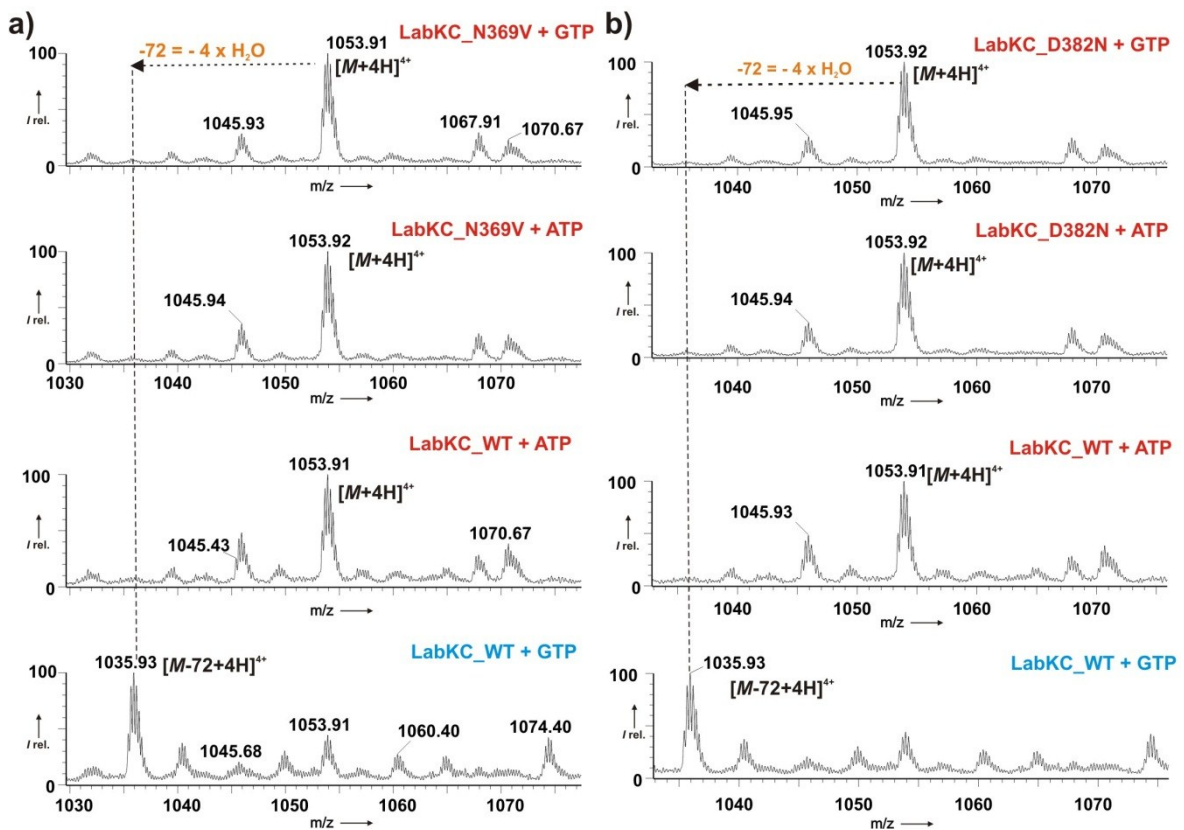


Abbildung 100: a) LC-ESI-MS (QToF2)-Spektren der Umsetzung von LabA2* mit LabKC_N369V. Keine Modifizierung des LabA2*-Peptids konnte bei Inkubation mit ATP und GTP beobachtet werden. Kontrollansätze zeigen die Umsetzung mit dem LabKC_WT-Enzym (ATP und GTP). $[M+4H]^{4+}$ -Ionen zeigen die vollständige 4-fache Dehydratisierung des Peptids bei Verwendung von GTP ($[M-72+4H]^{4+} = 1035.93$). b) LC-ESI-MS (QToF2)-Spektren der Umsetzung von LabA2* mit LabKC_D382N. Auch hier wurde LabA2* bei Inkubation mit LabKC_D382N unter Verwendung von ATP und GTP nicht modifiziert. Als Vergleich diente wiederum die Inkubation mit dem LabKC-Wildtyp-Enzym.

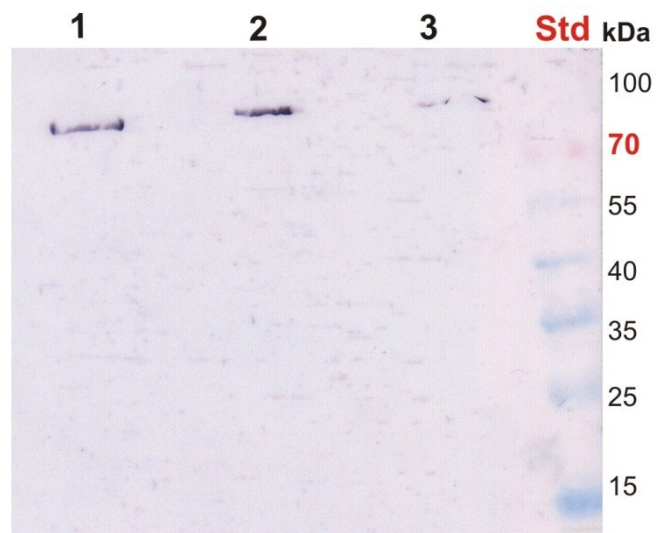


Abbildung 101: Western-Blot nach SDS-PAGE mit Proben der Inkubation von aufgereinigtem LabKC_{His6} mit LabA2. Die Detektion erfolgte mit dem Anti-pSer-Antikörper: Spur 1 und 2 = Proben der Umsetzung von LabKC_{His6} mit LabA2 und GTP; Spur 3 = aufgereinigtes LabKC_{His6} ohne Inkubation.

8 Literaturverzeichnis

- [1] R. Finking, M. A. Marahiel: „Biosynthesis of nonribosomal peptides” *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, 58, 453 – 488.
- [2] M. A. Marahiel: „Working outside the protein-synthesis rules: insights into non-ribosomal peptide synthesis.” *J. Pept. Sci.* **2009**, 15, 799 – 807.
- [3] R. W. Jack, G. Jung: „Lantibiotics and microcins: polypeptides with unusual chemical diversity.” *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 310 – 317.
- [4] E. M. Nolan, C. T. Walsh: „How nature morphs peptide scaffolds into antibiotics” *ChemBioChem* **2009**, 10, 34 – 53.
- [5] D. Schwarzer, R. Finking, M. A. Marahiel: „Nonribosomal peptides: from genes to products.” *Nat. Prod. Rep.* **2003**, 20, 275 – 287.
- [6] B. Kalyon, S. E. Helaly, R. Scholz, J. Nachtigall, J. Vater, R. Borriss, R. D. Süssmuth: „Plantazolicin A and B: structure elucidation of ribosomally synthesized thiazole/oxazole peptides from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42.” *Org. Lett.*, **2011**, 13, 2996 – 2999.
- [7] A. Bayer, S. Freund, G. Jung: „Post-translational heterocyclic backbone modifications in the 43-peptide antibiotic microcin B17.” *Eur. J. Biochem.* **1995**, 234, 414 – 426.
- [8] L. C. Wieland Brown, M. G. Acker, J. Clardy, C. T. Walsh, M. A. Fischbach: „Thirteen posttranslational modifications convert a 14-residue peptide into the antibiotic thiocillin” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 2549 – 2553.
- [9] R. Liao, L. Duan, C. Lei, H. Pan, Y. Ding, Q. Zhang, D. Chen, B. Shen, Y. Yu, W. Liu: „Thiopeptide biosynthesis featuring ribosomally synthesized precursor peptides and conserved posttranslational modifications.” *Chem. Biol.* **2009**, 16, 141 – 147.
- [10] W. L. Kelly, L. Pan, C. Li: „Thiostrepton biosynthesis: prototype for a new family of bacteriocins.” *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 4327 – 4334.
- [11] R. P. Morris, J. A. Leeds, H.-U. Nägeli, L. Oberer, K. Memmert, E. Weber, M. J. LaMarche, C. N. Parker, N. Burrer, S. Esterow, A. E. Hein, E. K. Schmitt, P. Krastel: „Ribosomally synthesized thiopeptide antibiotics targeting elongation factor Tu.” *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 5946 – 5955.
- [12] H.-D. Arndt, S. Schoof, J.-Y. Lu: „Zur Biosynthese von Thiopeptidantibiotika“ *Angew. Chem.* **2009**, 121, 6900 – 6904; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 6770 – 6773.

- [13] J. M. Willey, W. A. van der Donk: „Lantibiotics: peptides of diverse structure and function.” *Annu. Rev. Microbiol.* **2007**, *61*, 477 – 501.
- [14] N. Schnell, K. D. Entian, U. Schneider, F. Götz, H. Zähner, R. Kellner, G. Jung: „Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings.” *Nature* **1988**, *333*, 276 – 278.
- [15] C. Chatterjee, M. Paul, L. Xie, W. A. van der Donk: „Biosynthesis and mode of action of lantibiotics.” *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 633 – 684.
- [16] M. J. Horn, D. B. Jones, S. J. Ringel: „Isolation of a new sulfur-containing amino acid (lanthionine) from sodium carbonate-treated wool.” *J. Biol. Chem.* **1941**, *138*, 141 – 149.
- [17] A. G. Beck-Sickinger, G. Jung, **1991** in „Nisin and novel lantibiotics” (G. Jung, H. G. Sahl), 218 – 230, ESCOM, Leiden.
- [18] U. Pag, H.-G. Sahl: „Multiple activities in lantibiotics-models for the design of novel antibiotics?” *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 815 – 833.
- [19] J. Delves-Broughton, P. Blackburn, R. J. Evans, J. Hugenholtz: „Applications of the bacteriocin, nisin.” *Antonie Van Leeuwenhoek* **1996**, *69*, 193 – 202.
- [20] L. A. Rogers: „The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*.” *J. Bacteriol.* **1928**, *16*, 321 – 325.
- [21] L. A. Rogers, E. O. Whittier: „Limiting factors in the lactic fermentation.” *J. Bacteriol.* **1928**, *16*, 211 – 229.
- [22] R. E. Wirawan, N. A. Klesse, R. W. Jack, J. R. Tagg: „Molecular and genetic characterization of a novel nisin variant produced by *Streptococcus uberis*.” *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 1148 – 1156.
- [23] L. Xie, L. M. Miller, C. Chatterjee, O. Averin, N. L. Kelleher, W. A. van der Donk: „Lacticin 481: *in vitro* reconstitution of lantibiotic synthetase activity.” *Science* **2004**, *303*, 679 – 681.
- [24] O. McAuliffe, C. Hill, R. P. Ross: „Each peptide of the two-component lantibiotic lacticin 3147 requires a separate modification enzyme for activity.” *Microbiology* **2000**, *146*, 2147 – 2154.
- [25] A. L. McClerren, L. E. Cooper, C. Quan, P. M. Thomas, N. L. Kelleher, W. A. van der Donk: „Discovery and *in vitro* biosynthesis of haloduracin, a two-component lantibiotic.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2006**, *103*, 17243 – 17248.

- [26] B. Li, D. Sher, L. Kelly, Y. Shi, K. Huang, P. J. Knerr, I. Joewono, D. Rusch, S. W. Chisholm, W. A. van der Donk: „Catalytic promiscuity in the biosynthesis of cyclic peptide secondary metabolites in planktonic marine cyanobacteria.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 10430 – 10435.
- [27] S. Kodani, M. E. Hudson, M. C. Durrant, M. J. Buttner, J. R. Nodwell, J. M. Willey: „The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene ramS in *Streptomyces coelicolor*.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2004**, *101*, 11448 – 11453.
- [28] S. Kodani, M. A. Lodato, M. C. Durrant, F. Picart, J. M. Willey: „SapT, a lanthionine-containing peptide involved in aerial hyphae formation in the streptomycetes.” *Mol. Microbiol.* **2005**, *58*, 1368 – 1380.
- [29] K. Ueda, K. Miyake, S. Horinouchi, T. Beppu: „A gene cluster involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus* encodes proteins similar to the response regulators of two-component regulatory systems and membrane translocators.” *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 2006 – 2016.
- [30] K. Ueda, K.-I. Oinuma, G. Ikeda, K. Hosono, Y. Ohnishi, S. Horinouchi, T. Beppu: „AmfS, an extracellular peptidic morphogen in *Streptomyces griseus*.” *J. Bacteriol* **2002**, *184*, 1488 – 1492.
- [31] Y. Goto, B. Li, J. Claesen, Y. Shi, M. J. Bibb, W. A. van der Donk: „Discovery of unique lanthionine synthetases reveals new mechanistic and evolutionary insights.” *PLoS Biol.* **2010**, *8*, e1000339.
- [32] G. Engelke, Z. Gutowski-Eckel, M. Hammelmann, K.-D. Entian: „Biosynthesis of the lantibiotic nisin: genomic organization and membrane localization of the NisB protein.” *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 3730 – 3743.
- [33] L. Xie, C. Chatterjee, R. Balsara, N. M. Okeley, W. A. van der Donk: „Heterologous expression and purification of SpaB involved in subtilin biosynthesis.” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *295*, 952 – 957.
- [34] C. Meyer, G. Bierbaum, C. Heidrich, M. Reis, J. Suling, M. I. Iglesias-Wind, C. Kempter, E. Molitor, H.-G. Sahl: „Nucleotide sequence of the lantibiotic Pep5 biosynthesis gene cluster and functional analysis of PepP and PepC. Evidence for a role of PepC in thioether formation.” *Eur. J. Biochem* **1995**, *232*, 478 – 489.

- [35] B. Li, J. P. J. Yu, J. S. Brunzelle, G. N. Moll, W. A. van der Donk, S. K. Nair: „Structure and mechanism of the lantibiotic cyclase involved in nisin biosynthesis.” *Science* **2006**, *311*, 1464 – 1467.
- [36] B. Li, W. A. van der Donk: „Identification of essential catalytic residues of the cyclase NisC involved in the biosynthesis of nisin.” *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 21169 – 21175.
- [37] G. Jung: „Die enzymkatalysierte Bildung von Sulfidbrücken in Lantibiotika.“ *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6063 – 6065; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5919 – 5921.
- [38] Y. O. You, W. A. van der Donk: „Mechanistic investigations of the dehydration reaction of lacticin 481 synthetase using site-directed mutagenesis.” *Biochemistry* **2007**, *46*, 5991 – 6000.
- [39] C. Chatterjee, L. M. Miller, Y. L. Leung, L. Xie, M. Yi, N. L. Kelleher, W. A. van der Donk: „Lacticin 481 synthetase phosphorylates its substrate during lantibiotic production.” *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15332 – 15333.
- [40] M. Paul, G. C. Patton, W. A. van der Donk: „Mutants of the zinc ligands of lacticin 481 synthetase retain dehydration activity but have impaired cyclization activity.” *Biochemistry* **2007**, *46*, 6268 – 6276.
- [41] J. M. Willey, A. Willems, S. Kodani, J. R. Nodwell: „Morphogenetic surfactants and their role in the formation of aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor*.” *Mol. Microbiol.* **2006**, *59*, 731 – 742.
- [42] T. J. O'Connor, P. Kanellis, J. R. Nodwell: „The ramC gene is required for morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* and expressed in a cell type-specific manner under the direct control of RamR.” *Mol. Microbiol.* **2002**, *45*, 45 – 57.
- [43] M. E. Hudson, J. R. Nodwell: „Dimerization of the RamC morphogenetic protein of *Streptomyces coelicolor*.” *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 1330 – 1336.
- [44] M. E. Hudson, D. Zhang, J. R. Nodwell: „Membrane association and kinase-like motifs of the RamC protein of *Streptomyces coelicolor*.” *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 4920 – 4924.
- [45] C. Kempter, T. Kupke, D. Kaiser, J. W. Metzger, G. Jung: „Thioenole aus Peptidyl-Cysteinen: oxidative Decarboxylierung eines ¹³C-markierten Substrats.“ *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2235 – 2238; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 2104 – 2107.
- [46] M. Blaesse, T. Kupke, R. Huber, S. Steinbacher: „Crystal structure of the peptidyl-cysteine decarboxylase EpiD complexed with a pentapeptide substrate.” *The EMBO Journal* **2000**, *19*, 6299 – 6310.

- [47] P. Hernández-Acosta, D. G. Schmid, G. Jung, F. A. Culiáñez-Macià, T. Kupke: „Molecular characterization of the *Arabidopsis thaliana* flavoprotein AtHAL3a reveals the general reaction mechanism of 4'-phosphopantothenoylecysteine decarboxylases.” *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 20490 – 20498.
- [48] T. Kupke, M. Uebele, D. Schmid, G. Jung, M. Blaessel, S. Steinbacher: „Molecular characterization of lantibiotic-synthesizing enzyme EpiD reveals a function for bacterial Dfp proteins in coenzyme A biosynthesis.” *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 31838 – 31846.
- [49] Dissertation Dr. Timo Schmiederer, Technische Universität Berlin **2008**.
- [50] T. J. Oman, W. A. van der Donk: „Follow the leader: the use of leader peptides to guide natural product biosynthesis.” *Nat. Chem. Biol.* **2010**, 6, 9 – 18.
- [51] J. R. van der Meer, H. S. Rollema, R. J. Siezen, M. M. Beerthuyzen, O. P. Kuipers, W. M. de Vos: „Influence of amino acid substitutions in the nisin leader peptide on biosynthesis and secretion of nisin by *Lactococcus lactis*.” *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 3555 – 3562.
- [52] G. Izaguirre, J. N. Hansen: „Use of alkaline phosphatase as a reporter polypeptide to study the role of the subtilin leader segment and the SpaT transporter in the posttranslational modifications and secretion of subtilin in *Bacillus subtilis* 168.” *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, 63, 3965 – 3971.
- [53] A. Kuipers, E. de Boef, R. Rink, S. Fekken, L. D. Kluskens, A. J. M. Driessen, K. Leenhouts, O. P. Kuipers, G. N. Moll: „NisT, the transporter of the lantibiotic nisin, can transport fully modified, dehydrated, and unmodified prenisin and fusions of the leader peptide with non-lantibiotic peptide.” *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 22176 – 22182.
- [54] R. Rink, J. Wierenga, A. Kuipers, L. D. Kluskens, A. J. M. Driessen, O. P. Kuipers, G. N. Moll: „Production of dehydroamino acid-containing peptides by *Lactococcus lactis*.” *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, 73, 1792 – 1796.
- [55] L. D. Kluskens, A. Kuipers, R. Rink, E. de Boef, S. Fekken, A. J. Driessen, O. P. Kuipers, G. N. Moll: „Post-translational modification of therapeutic peptides by NisB, the dehydratase of the lantibiotic nisin.” *Biochemistry* **2005**, 44, 12827 – 12834.
- [56] M. R. Levensgood, G. C. Patton, W. A. van der Donk: „The leader peptide is not required for post-translational modification by lactacin 481 synthetase.” *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 10314 – 10315.
- [57] M. V. Lee, L. A. Furgerson Ihnken, Y. O. You, A. L. McClerren, W. A. van der Donk, N. L. Kelleher: „Distributive and directional behavior of lantibiotic synthetases revealed by high-resolution tandem mass spectrometry.” *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 12258 – 12264.

- [58] E. Breukink, B. de Kruijff: „Lipid II as a target for antibiotics.” *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, 5, 321 – 332.
- [59] E. Ruhr, H.-G. Sahl: „Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles.” *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, 27, 841 – 845.
- [60] E. Breukink, H. E. van Heusden, P. J. Vollmerhaus, E. Swiezewska, L. Brunner, S. Walker, A. J. Heck, B. de Kruijff: „Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes.” *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 19898 – 19903.
- [61] S. T. Hsu, E. Breukink, E. Tischenko, M. A. Lutters, B. de Kruijff, R. Kaptein, A. M. Bonvin, N. A. van Nuland: „The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics.” *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, 11, 963 – 967.
- [62] J. C. Barna, D. H. Williams: „The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group.” *Annu. Rev. Microbiol.* **1984**, 38, 339 – 357.
- [63] E. A. Somner, P. E. Reynolds: „Inhibition of peptidoglycan biosynthesis by ramoplanin.” *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, 34, 413 – 419.
- [64] H. Brötz, G. Bierbaum, P. E. Reynolds, H.-G. Sahl: „The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis at the level of transglycosylation.” *Eur. J. Biochem.* **1997**, 246, 193 – 199.
- [65] D. Kruszewska, H.-G. Sahl, G. Bierbaum, U. Pag, S. O. Hynes, A. J. Ljungh: „Mersacidin eradicates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse rhinitis model.” *Antimicrob. Chemother.* **2003**, 54, 648 – 653.
- [66] F. Märki, E. Hänni, A. Fredenhagen, J. van Oostrum: „Mode of action of the lanthionine-containing peptide antibiotics duramycin, duramycin B and C, and cinnamycin as indirect inhibitors of phospholipase A₂.” *Biochem. Pharmacol.* **1991**, 42, 2027 – 2035.
- [67] G. Machaidze, J. Seelig: „Specific binding of cinnamycin (Ro 09-0198) to phosphatidylethanolamine. Comparison between micellar and membrane environments.” *Biochemistry* **2003**, 42, 12570 – 12576.
- [68] L. M. Molina y Vedia, M. J. Stutts, J. R. C. Boucher, D. C. Henke: „Method of treating retained pulmonary secretions.” U.S. Patent No. 5716931, **1995**.
- [69] J. D. Hillmann: „Genetically modified *Streptococcus* mutans for the prevention of dental caries.” *Antonie van Leeuwenhoek* **2002**, 82, 361 – 366.

- [70] J. Wink, R. M. Kroppenstedt, G. Seibert, E. Stackebrandt: „*Actinomadura namibiensis* sp. nov.“ *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2003**, 53, 721 – 724.
- [71] G. Seibert, L. Vértessy, J. Wink, I. Winkler, R. Süssmuth, G. Sheldrick, K. Meindl, M. Broenstrup, H. Hoffmann, H. Guehring, L. Toti: „Antibacterial and antiviral peptides from *Actinomadura namibiensis*.“ WO2008/040469, **2008**.
- [72] K. Meindl, T. Schmiederer, K. Schneider, A. Reicke, D. Butz, S. Keller, G. Nicholson, H. Gühring, L. Vertesy, J. Wink, H. Hoffmann, M. Brönstrup, G. M. Sheldrick, R. D. Süssmuth: „Labyrinthopeptine – eine neue Klasse carbacyclischer Lantibiotika.“ *Angew. Chem.* **2010**, 122, 1169 – 1173; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 1151 – 1154.
- [73] R. Dorenbos, T. Stein, J. Kabel, C. Bruand, A. Bolhuis, S. Bron, W. J. Quax, J. M. van Dij: „Thiol-disulfide oxidoreductases are essential for the production of the lantibiotic sublancin 168.“ *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 16682 – 16688.
- [74] T. J. Oman, J. M. Boettcher, H. Wang, X. N. Okalibe, W. A. van der Donk: „Sublancin is not a lantibiotic but an S-linked glycopeptide.“ *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 78 – 80.
- [75] A. L. Davidson, J. Chen: „ATP-binding cassette transporters in bacteria.“ *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, 73, 241 – 268.
- [76] I. Decosterd, C. J. Woolf: „Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain.“ *Pain* **2000**, 87, 149 – 158.
- [77] B. M. Olivera: „Conus peptides: biodiversity-based discovery and exogenomics.“ *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 31173 – 31177.
- [78] K. Garber: „Peptide leads new class of chronic pain drugs.“ *Nat. Biotechnol.* **2005**, 23, 399.
- [79] F. W. Studier, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, J. W. Dubendorff: „Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes.“ *Methods Enzymol.* **1990**, 185, 60 – 89.
- [80] D. Hanahan: „Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.“ *J. Mol. Biol.* **1983**, 166, 557 – 580.
- [81] M. Dagert, S. D. Ehrlich: „Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells.“ *Gene* **1979**, 6, 23 – 28.
- [82] H. Inoue, H. Nojima, H. Okayama: „High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids.“ *Gene* **1990**, 96, 23 – 28.
- [83] J. Sambrook, D. W. Russell: „Molecular cloning: a laboratory manual.“ Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, USA, **2001**.

- [84] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich: „Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction.” *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1986**, 51, 263 – 273.
- [85] N. Chester, D. R. Marshak: Dimethyl sulfoxide-mediated primer T_m reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction.” *Anal. Biochem.* **1993**, 209, 284 – 290.
- [86] <http://www.bioinformatics.org/primerx/index.htm> (27.06.2011)
- [87] H. C. Birnboim, J. Doly: „A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.” *Nucleic Acids Res.* **1979**, 7, 1513 – 1523.
- [88] G. G. Wilson, N. E. Murray: „Restriction and modification systems.” *Annu. Rev. Genet.* **1991**, 25, 585 – 627.
- [89] A. Ullmann, D. Perrin: „Complementation in β -galactosidase”, aus „The lactose operon” J. R., Beckwith, D. Zipser, (Hrsg.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1970**, 143 – 172.
- [90] J. Porat: „Immobilized metal ion affinity chromatography.” *Protein expression and purification* **1992**, 3, 263 – 281.
- [91] T. T. Yip, T. W. Hutchens: „Immobilized metal ion affinity chromatography.” *Mol. Biotechnol.* **1994**, 1, 151 – 164.
- [92] U. K. Lämmli: „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.” *Nature* **1970**, 227, 680 – 685.
- [93] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon: „Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1979**, 76, 4350 – 4354.
- [94] C. N. Pace, F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, T. Gray: „How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein.” *Protein Sci.* **1995**, 11, 2411 – 2423.
- [95] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel, A. Bairoch, *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server* in: M. J. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press **2005**, 571 – 607. (<http://expasy.org/cgi-bin/protparam>) (29.06.2011)
- [96] W. C. J. Johnson: „Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide.” *Proteins* **1990**, 7, 205 – 214.

- [97] N. J Greenfield: „Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure.” *Nat. Protoc.* **2006**, 6, 2876 – 2890.
- [98] P. Edman: „A method for the determination of amino acid sequence in peptides.” *Arch. Biochem.* **1949**, 22, 475.
- [99] P. Edman, G. Begg: „A protein sequenator.” *Eur. J. Biochem.* **1967**, 1, 80 – 91.
- [100] P. Roepstorff, J. Fohlmann: „Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides.” *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**, 11, 601.
- [101] <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (27.06.2011)
- [102] Y. Zhu, H. Li, C. Long, L. Hu, H. Xu, X. Hao, L. Liu, S. Chen, D. C. Wang, F. Shao: „Structural insights into the enzymatic mechanism of the pathogenic MAPK phosphothreonine lyase.” *Mol. Cell.* **2007**, 28, 899 – 913.
- [103] L. Chen, H. Wang, J. Zhang, L. Gu, N. Huang, J. M. Zhou, J. Chai: „Structural basis for the catalytic mechanism of phosphothreonine lyase.” *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, 15, 101 – 102.
- [104] H. Li, H. Xu, Y. Zhou, J. Zhang, C. Long, S. Li, S. Chen, J. M. Zhou, F. Shao, *Science*, **2007**, 315, 1000–1003. The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family.
- [105] N. Scherr, S. Honnappa, G. Kunz, P. Mueller, R. Jayachandran, F. Winkler, J. Pieters, M. O. Steinmetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007** Structural basis for the specific inhibition of protein kinase G, a virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*. 104, 12151–12156.
- [106] T. A. Young, B. Delagoutte, J. A. Endrizzi, A. M. Falick, T. Alber: „Structure of *Mycobacterium tuberculosis* PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases.” *Nat. Struct. Biol.* **2003**, 10, 168 – 174.
- [107] <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/> (27.06.2011)
- [108] T. Vomastek, R. Nadvornik, J. Janecek, Z. Technikova, J. Weiser, P. Branny: „Characterisation of two putative protein Ser/Thr kinases from actinomycete *Streptomyces granaticolor* both endowed with different properties.” *Eur. J. Biochem.* **1998**, 257, 55 – 61.
- [109] H. Urabe, N. Aoyagi, H. Ogawara, K. Motojima: „Expression and characterization of the *Streptomyces coelicolor* serine/threonine protein kinase PkaD.” *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, 72, 778 – 785.
- [110] <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/> (27.06.2011)

- [111] V. M. Bolanos-Garcia, O. R. Davies: „Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography.” *Biochim. Biophys. Acta.* **2006**, 1760, 1304 – 1313.
- [112] K. Niefind, B. Guerra, I. Ermakowa, O. G. Issinger: „Crystal structure of human protein kinase CK2: insights into basic properties of the CK2 holoenzyme.” *The EMBO Journal* **2001**, 20, 5320 – 5331.
- [113] J. C. Milne, A. C. Eliot, N. L. Kelleher, C. T. Walsh: „ATP/GTP hydrolysis is required for oxazole and thiazole biosynthesis in the peptide antibiotic microcin B17.” *Biochemistry* **1998**, 37, 13250 – 13261.
- [114] W. M. Müller, T. Schmiederer, P. Ensle, R. D. Süssmuth: „*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, 2436 – 2440 und *Angew. Chem.* **2010**, 122, 2486 – 2490.
- [115] R. Rink, L. D. Kluskens, A. Kuipers, A. J. M. Driessen, O. P. Kuipers, G. N. Moll: „NisC, the cyclase of the lantibiotic nisin, can catalyze cyclization of designed nonlantibiotic peptides.” *Biochemistry* **2007**, 46, 13179 – 13189.
- [116] H. E. Meyer, M. Heber, B. Eisermann, H. Korte, J. W. Metzger, G. Jung: „Sequence analysis of Lantibiotics: Chemical derivatization procedures allow a fast access to complete Edman degradation.” *Anal. Biochem.* **1994**, 223, 185 – 190.
- [117] A. Pesic, M. Henkel, R. D. Süssmuth: „Identification of the amino acid labionin and its desulfurised derivative in the type-III lantibiotic LabA2 by means of GC/MS.” *Chem. Commun.* **2011**, 47, 7401 – 7403.
- [118] B. Rost, G. Yachdav, J. Liu: „The PredictProtein server” *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32 (Web Server Ausgabe), W321 – W326.
- [119] C. Cole, J. D. Barber, G. J. Barton: „The JPRED 3 secondary structure prediction server.” *Nucleic Acids Res.* **2008**, 35, (suppl. 2) W197 – W201.
- [120] J. Nagao, Y. Morinaga, M. R. Islam, S. M. Asaduzzaman, Y. Aso, J. Nakamayama, K. Sonomoto: „Mapping and identification of the region and secondary structure required for the maturation of the nukacin ISK-1 prepeptide.” *Peptides* **2009**, 30, 1412 – 1420.
- [121] P. Chen, F. Qi, J. Novak, R. E. Krull, P. W. Caufield: „Effect of amino acid substitutions in conserved residues in the leader peptide on biosynthesis of the lantibiotic mutacin II.” *FEMS Microbiology Letters* **2001**, 195, 139 – 144.

- [122] K. T. O'Neil, W. F. DeGrado: „A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino acids.” *Science* **1990**, 250, 646 – 651.
- [123] G. C. Patton, M. Paul, L. E. Cooper, C. Chatterjee, W. A. van der Donk: „The importance of the leader sequence for directing lanthionine formation in Lacticin 481.” *Biochemistry* **2008**, 47, 7342 – 7351.
- [124] A. Plat, L. D. Kluskens, A. Kuipers, R. Rink, G. N. Moll: „Requirements of the engineered leader peptide of nisin for inducing modification, export, and cleavage.” *Appl Environ Microbiol.* **2011**, 77, 604 – 611.
- [125] C. Chatterjee, G. C. Patton, L. Cooper, M. Paul, W. A. van der Donk: „Engineering dehydro amino acids and thioethers into peptides using lacticin 481 synthetase” *Chem Biol.* **2006**, 13, 1109 – 1117.
- [126] W. L. Cheung, S. J. Pan, A. J. Link: „Much of the Microcin J25 Leader Peptide is Dispensable.” *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 2514 – 2515.
- [127] Y. M. Li, J. C. Milne, L. L. Madison, R. Kolter, C. T. Walsh: „From peptide precursors to oxazole and thiazole-containing peptide antibiotics: microcin B17 synthase.” *Science* **1996**, 274, 1188 – 1193.
- [128] R. S. Roy, P. J. Belshaw, C. T. Walsh: „Mutational analysis of posttranslational heterocycle biosynthesis in the gyrase inhibitor microcin B17: distance dependence from propeptide and tolerance for substitution in a GSCG cyclizable sequence.” *Biochemistry* **1997**, 37, 4125 – 4136.
- [129] L. N. Johnson, M. E. M. Noble, D. J. Owen: „Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation.” *Cell* **1996**, 85, 149 – 158.
- [130] Y. Goto, A. Ökesli, W. A. van der Donk: „Mechanistic studies of Ser/Thr dehydration catalyzed by a member of the LanL lanthionine synthetase family.” *Biochemistry* **2011**, 50, 891 – 898.
- [131] A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang: „I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction.” *Nat. Protoc.* **2010**, 5, 725 – 738.
- [132] Y. Zhang: „Template-based modeling and free modeling by I-TASSER in CASP7.” *Proteins* **2007**, 69, 108 – 117.