

**Studien zur α - und β -Hydroxylierung des Cyclodepsipeptides
Skylamycin aus *Streptomyces* sp. Acta 2897**

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin
Stefanie Uhlmann
aus Buchholz in der Nordheide

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:
Vorsitzender: Prof. Dr. Michael Gradzielski
Erstgutachter: Prof. Dr. Roderich D. Süßmuth
Zweitgutachter: Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 25. November 2013

Berlin 2014

D83

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht:

Uhlmann, S.; Süßmuth, R. D.; Cryle, M. J. Cytochrome P450_{sky} Interacts Directly with the Non-ribosomal Peptide Synthetase to Generate Three Amino Acid Precursors in Skyllamycin Biosynthesis. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2586-2596.

Studien zur α - und β -Hydroxylierung des Cyclodepsipeptides

Skyllamycin aus *Streptomyces* sp. Acta 2897

Bakterien und Pilze produzieren eine große Vielfalt an Naturstoffen, die vom Menschen für viele verschiedene Zwecke genutzt werden können. Die meisten dieser Sekundärmetaboliten werden durch nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) oder Polyketid-Synthetasen (PKS) generiert und durch weitere modifizierende Enzyme (sogenannte *Tailoring*-Enzyme) strukturell verändert. Die Totalsynthese solcher Naturstoffe ist häufig kompliziert und sehr kostenintensiv, darüber hinaus ist für die industrielle Anwendung oft eine Derivatisierung der ursprünglichen Struktur sinnvoll und notwendig. Zur biotechnologischen, semisynthetischen oder chemoenzymatischen Darstellung dieser Naturstoffe oder deren Derivate ist das detaillierte Wissen über deren Biosynthese und die Mechanismen der beteiligten Enzyme unerlässlich.

In dieser Arbeit wurde die Einführung der Hydroxylierungen in die Struktur des Skyllamycins, einem Naturstoff aus *Streptomyces* sp. Acta 2897 untersucht. Skyllamycin ist ein nichtribosomal synthetisiertes Cyclodepsipeptid bestehend aus 11 Aminosäuren mit mehreren ungewöhnlichen Strukturmerkmalen. Neben der α -Hydroxylierung von Glycin an Position 9 (Gly₉) und den drei β -Hydroxylierungen an L-Phe⁵, L-Tyr⁷ und D-Leu¹¹ trägt L-Asp⁷ eine β -Methylierung und L-Tyr⁷ ist zusätzlich *O*-methyliert. Schließlich ist die erste Aminosäure Threonin mit einem ungewöhnlichen 2-[1'-Z-Propenyl]-Zimtsäurerest am N-Terminus verknüpft.

Die α -Hydroxylierung von Glycin wird von einer flavinabhängigen Monooxygenase (SkyMono) und der zugehörigen Flavin-Reduktase (SkyRed) eingeführt. Die beiden Enzyme wurden heterolog in *Escherichia coli* exprimiert und aufgereinigt und anschließend spektroskopisch und strukturell charakterisiert. Die Untersuchungen ergaben, dass SkyRed als Homodimer vorliegt und die Reduktion von FMN und FAD unter NADH-Verbrauch katalysiert. Dabei wird ein schwacher SkyRed-Flavin_{red}:::NAD⁺-charge transfer-Komplex ausgebildet. Die Bindung des Flavins erfolgt dabei lediglich über den Isoalloxazinring des Flavins. Die Monooxygenase liegt ebenfalls als Homodimer vor und bindet reduziertes FAD mit einem K_D -Wert von 128 ± 28 nM.

Die β -Hydroxylierungen von L-Phe₅, L-Tyr₇ und D-Leu₁₁ werden von einer Cytochrom P450-Monooxygenase (P450_{sky}) eingeführt. Durch *in vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass P450_{sky} diese Hydroxylierung einführt, während die Aminosäuren an den entsprechenden PCP-Domänen der Skyllamycin-Synthetase gebunden sind. P450_{sky} akzeptiert nur PCP-gebundene Substrate, arbeitet in Interaktion mit der NRPS und differenziert zudem zwischen den drei Substrat-PCP-Domänen und anderen Nicht-Substrat-PCP-Domänen der NRPS. Dies unterscheidet P450_{sky} von den bekannten β -hydroxylierenden P450-Monooxygenasen und deren Wirkungsweise an externen AT-Modulen. Darüber hinaus konnte die Kristallstruktur von P450_{sky} bis zu einer Auflösung von 1,9 Å gelöst werden. Diese Ergebnisse zeigen einen neuen Weg der Hydroxylierung von Naturstoffen auf und erweitern damit das Wissen über die Komplexität von nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	i
1 Einleitung.....	3
1.1 Die nichtribosomale Peptidsynthese	3
1.1.1 Nichtribosomale Peptidsynthetasen	4
1.1.2 Modifizierende Enzyme	7
1.2 Hydroxylierungen.....	8
1.2.1 Flavin-Monooxygenasen und Flavin-Reduktasen	8
1.2.2 Cytochrom P450-Monooxygenasen	10
1.3 Naturstoffe aus Streptomyceten	13
1.3.1 Skyllamycin A und B aus <i>Streptomyces</i> sp. Acta 2897	14
2 Zielsetzung.....	21
3 Material	23
3.1 Geräte und Software	23
3.2 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien	24
3.3 Oligonukleotide	24
3.4 Vektoren	25
3.5 Mikroorganismen	26
3.6 Kulturmedien	26
4 Methoden	27
4.1 Molekularbiologische Methoden.....	27
4.1.1 Konstruktion der Plasmide	27
4.1.1.1 Konstrukte zur Untersuchung der α -Hydroxylierung von Skyllamycin	27
4.1.1.2 Konstrukte zur Untersuchung der β -Hydroxylierungen von Skyllamycin	28
4.1.2 Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i>	29
4.1.3 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	29
4.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA.....	30
4.1.5 Konzentrationsbestimmung und Sequenzierung von DNA	30
4.2 Proteinbiochemische Methoden	31
4.2.1 Genexpression	31
4.2.2 Zellaufschluss.....	31
4.2.3 Chromatographische Methoden zur Proteinaufreinigung.....	32
4.2.3.1 Nickelchelat-Affinitätschromatographie.....	32
4.2.3.2 Größenausschlusschromatographie	33

4.2.3.3	Anionenaustauschchromatographie.....	33
4.2.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
4.2.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	35
4.3	Biochemische und analytische Methoden.....	36
4.3.1	Spektroskopische Untersuchungen von SkyRed und SkyMono.....	36
4.3.2	Bestimmung des Flavin-Cofaktors.....	36
4.3.3	Isotherme Kalorimetrie (ITC).....	36
4.3.4	Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse.....	37
4.3.5	Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS).....	38
4.3.6	Beladungsreaktion mit Sfp.....	39
4.3.7	Bindungsstudien mit P450 _{sky}	39
4.3.8	Hydroxylierungsassay mit P450 _{sky}	40
4.4	Synthetische Methoden.....	43
4.4.1	Synthese der Aminoacyl-Coenzym A-Derivate.....	43
5	Ergebnisse und Diskussion.....	45
5.1	α -Hydroxylierung von Glycin.....	45
5.1.1	Flavin-Reduktase SkyRed.....	45
5.1.1.1	Biochemische Charakterisierung.....	45
5.1.1.2	Kristallstruktur.....	49
5.1.2	Flavin-Monooxygenase SkyMono.....	53
5.1.2.1	Biochemische Charakterisierung.....	53
5.1.2.2	Kristallisationsversuche.....	58
5.2	β -Hydroxylierungen von L-Phe ⁵ , L-(OMe)-Tyr ⁷ und D-Leu ¹¹	59
5.2.1	Klonierung und Aufreinigung von P450 _{sky} und PCP-Domänen.....	59
5.2.2	UV-Vis-Charakterisierung und Substrat-Bindungsstudien.....	62
5.2.3	Hydroxylierungsassays mit P450 _{sky}	65
5.2.4	Kristallstruktur von P450 _{sky}	71
6	Ausblick.....	77
6.1	α -Hydroxylierung von Glycin.....	77
6.2	β -Hydroxylierungen von L-Phe ⁵ , L-(OMe)-Tyr ⁷ und D-Leu ¹¹	78
7	Anhang.....	81
8	Literatur.....	87
	Danksagung.....	iii

Abkürzungen

A-Domäne	Adenylierungsdomäne
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
C-Domäne	Kondensationsdomäne
CoA	Coenzym A
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
E-Domäne	Epimerisierungsdomäne
eq.	Äquivalente
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie/-Massenspektrum
MIC	<i>Multiple Ion Current</i>
MS	Massenspektrometer/Massenspektrometrie/Massenspektrum
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase
(OMe)Tyr	(<i>O</i> -Methyl)-Tyrosin
PCP	Peptidyl-Carrier-Protein
PPant	Phosphopantethein
PP _i	Pyrophosphat
RMSD	<i>root-mean-square deviation</i> (Wurzel aus der mittleren quadratischen Abweichung)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SAXS	<i>Small-angle X-ray scattering</i> (Röntgenkleinwinkelstreuung)
SIM	<i>Single Ion Monitoring</i>
T-Domäne	Thiolierungsdomäne
TE-Domäne	Thioesterasedomäne

TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Triisopropylsilan

Abkürzungen kanonischer Aminosäuren

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

1 Einleitung

Naturstoffe spielen schon seit Jahrtausenden eine wichtige Rolle in der Medizin. Ein großer Teil der heute zugelassenen Medikamente basiert auf Naturstoffen,^[1] die meisten davon werden von Bakterien produziert. So sind zwei Drittel der heutigen Antibiotika ursprünglich aus Streptomyces isolierte Sekundärmetaboliten oder deren Derivate.^[2,3] Auch viele andere Pharmazeutika wie Anti-Tumor-Medikamente, Fungizide, Immunsuppressiva oder auch Herbizide und Insektizide sind Naturstoffe oder von diesen abgeleitete Strukturen.^[4] Bei vielen Naturstoffen ist die chemische Totalsynthese zu aufwendig und somit unwirtschaftlich. Eine Alternative stellt die biotechnologische Produktion von maßgeschneiderten Peptiden, Polyketiden oder anderen kleinen Molekülen dar.^[5] Um dementsprechend einzelne Enzyme oder gar ganze Biosynthesewege gezielt zu verändern und mit neuen Funktionen zu versehen, ist eine fundierte Kenntnis über deren Funktionsweise und Regulierung grundlegend.

Der Großteil der von Bakterien und Pilzen produzierten Sekundärmetaboliten wird ribosomal, nichtribosomal oder durch Polyketid-Synthese hergestellt. Da sich die vorliegende Arbeit mit der Biosynthese eines nichtribosomal produzierten Peptides befasst, soll im Folgenden die nichtribosomale Peptidsynthese kurz erläutert werden.

1.1 Die nichtribosomale Peptidsynthese

Bakterien und Pilze nutzen die nichtribosomale Peptidsynthese für die Produktion eines großen Spektrums biologisch aktiver Naturstoffe. Deren Synthese findet an großen Multienzym-Komplexen, den nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) statt. Die Grundvoraussetzung ist dabei der Aufbau eines Peptidrückgrats aus Aminosäuren durch die NRPS. Die Vorläufermoleküle sind beispielsweise proteinogene, nicht-proteinogene, Hydroxysäuren, N-methylierte Aminosäuren und sogar D-Aminosäuren. Das Grundgerüst kann während oder nach der Peptidsynthese durch

sogenannte *Tailoring*-Enzyme noch weiter modifiziert werden. Sowohl der modulare Aufbau der NRPS als auch die verschiedensten Arten der *Tailoring*-Enzyme ermöglichen die große Vielfalt nichtribosomal synthetisierter Peptide (s. Abbildung 1).^[6]

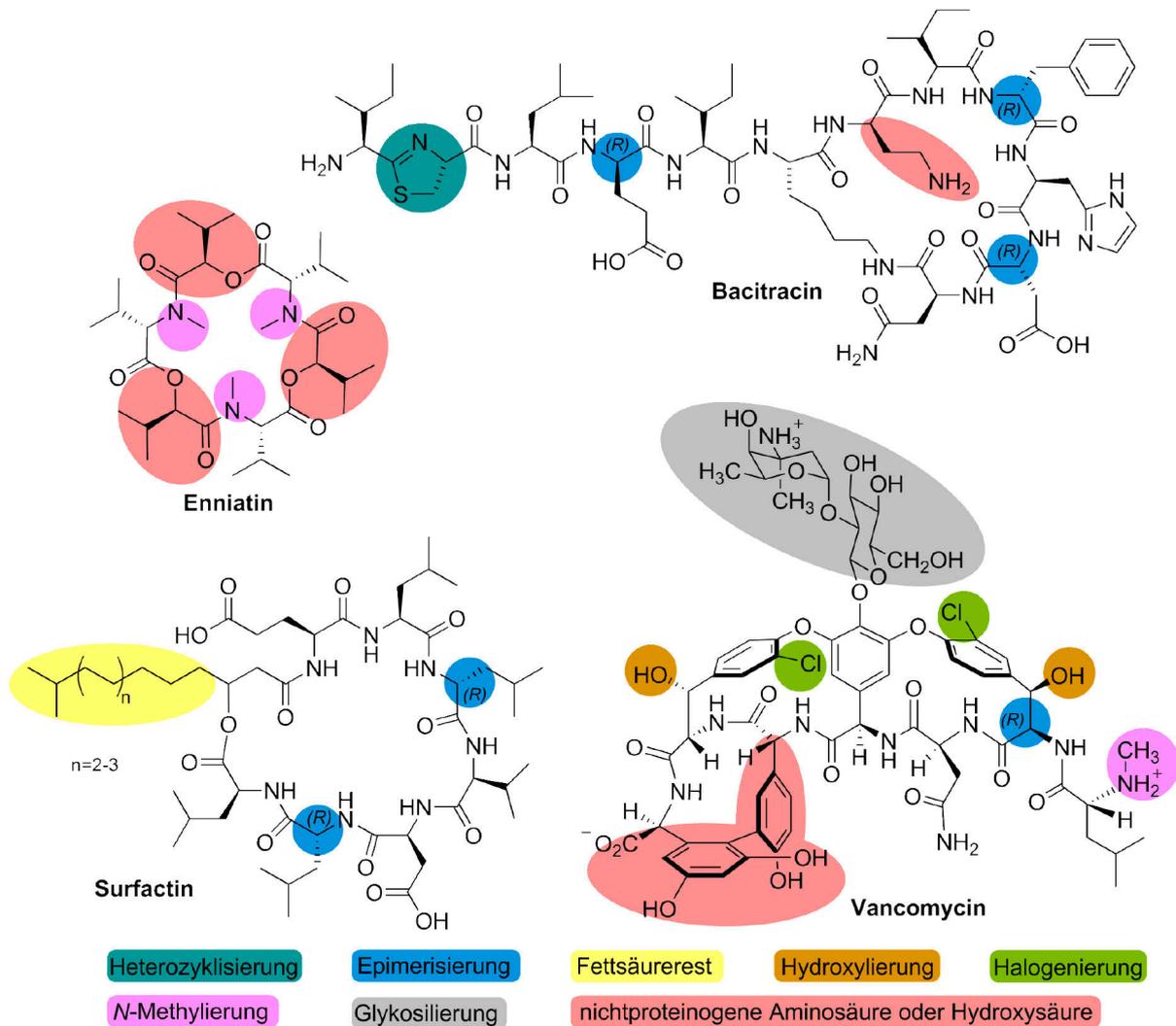


Abbildung 1. Beispiele nichtribosomal synthetisierter Peptide und deren Modifikationen.

1.1.1 Nichtribosomale Peptidsynthetasen

Nichtribosomale Peptidsynthetasen sind modular aufgebaut, deren einzelne Module wiederum aus verschiedenen Domänen bestehen. Dabei ist jedes Modul für die Inkorporation einer Aminosäure des Peptides zuständig (s. Abbildung 2). Bei Bakterien setzt sich eine NRPS oft aus zwei oder mehr Enzymen zusammen, während die meisten fungalen Synthetasen aus einer einzigen Polypeptidkette bestehen.^[7] NRPS lassen sich in verschiedene Klassen einteilen: linear, iterativ und nichtlinear.^[7] Lineare Systeme, wie die Skylamycin-Synthetase,^[8,9] folgen streng der sogenannten „*colinearity rule*“, nach der die Synthetase genauso viele Module aufweist, wie Aminosäuren im fertigen Peptid vorhanden sind.^[10] Nacheinander wird hier von jedem Modul eine wei-

Nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS)

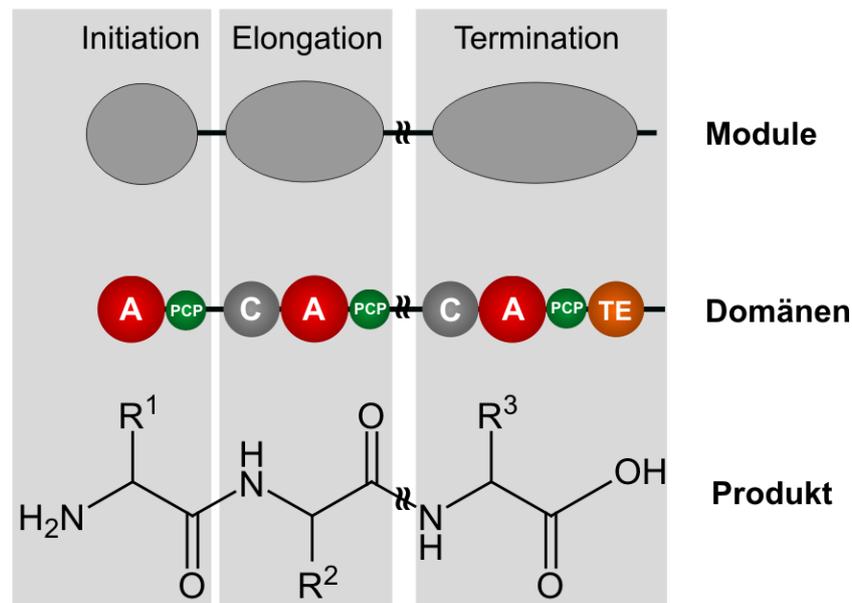


Abbildung 2. Modularer Aufbau von nichtribosomalen Peptidsynthetasen.

tere Aminosäure an die wachsende Peptidkette angefügt. Iterative NRPS, wie beispielsweise die Enterobactin-Synthetase oder die Enniatin-Synthetase, nutzen die vorhandenen Module mehrere Male hintereinander; das fertige Peptid besteht dann aus einer sich wiederholenden Abfolge der eingebauten Aminosäuren.^[11-13] Bei nichtlinearen Systemen, wie in der Syringomycin- oder Vibriobactin-Synthetase,^[14-18] weicht mindestens ein Modul von der typischen C-A-PCP-Abfolge (s. unten) ab. Hier werden ein oder mehrere Module mehrmals durchlaufen, externe Module mit einbezogen^[14] oder Verzweigungen durch den Einbau von kleinen Molekülen eingefügt.^[16]

Lineare NRPS bestehen aus einem Initiationsmodul, einem oder mehreren Elongationsmodulen und einem abschließenden Terminationsmodul (s. Abbildung 2). Ein Elongationsmodul enthält mindestens eine Kondensationsdomäne (C-Domäne), die die Bildung der Peptidbindung katalysiert, eine Adenylierungsdomäne (A-Domäne), die für die Substraterkennung und -aktivierung verantwortlich ist und eine *Peptidyl-Carrier-Protein*-Domäne (PCP-Domäne), die die aktivierte Aminosäure bindet. Das erste Modul, das Initiationsmodul, besteht meist nur aus einer A- und einer PCP-Domäne. Wenn der N-Terminus der ersten Aminosäure jedoch mit einem anderen Molekül verknüpft wird, kann hierfür ebenfalls eine C-Domäne vorhanden sein. So katalysiert die Starter-C-Domäne der Surfactin-Synthetase die Bildung der Amidbindung zwischen der CoA-aktivierten 3-Hydroxy-Fettsäure und der ersten PCP-gebundenen Aminosäure Glutamat.^[19] Das letzte Modul von linearen NRPS ist das Terminationsmodul, welches zusätzlich zu den drei essentiellen Domänen C, A und PCP eine Thioesterasedomäne (TE-Domäne) zur Produktfreisetzung besitzt.

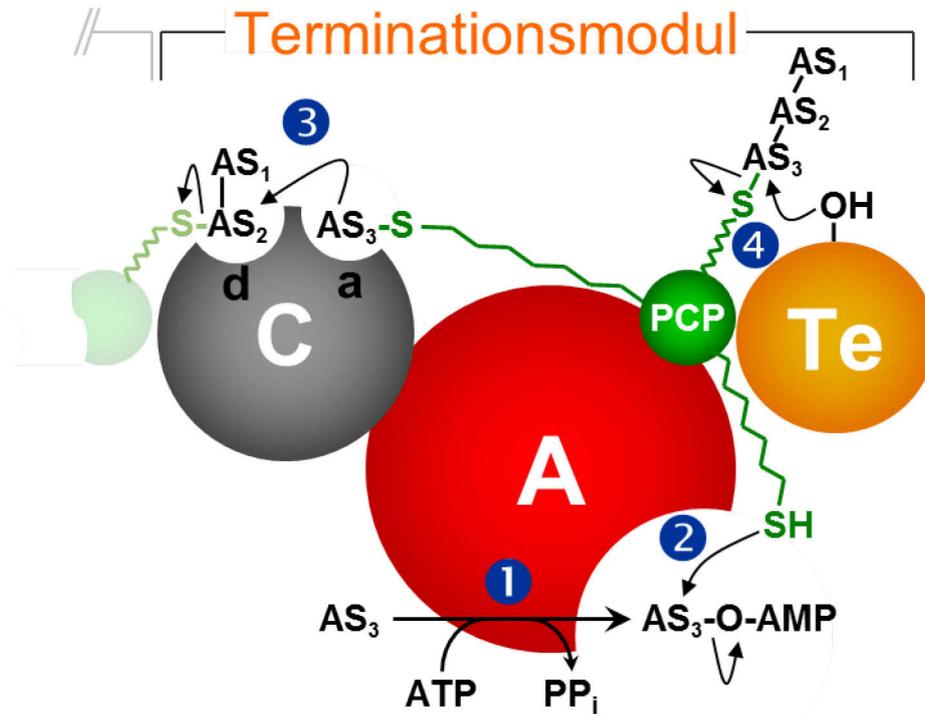


Abbildung 3. Einzelne Reaktionen der verschiedenen Domänen eines NRPS-Moduls am Beispiel eines Terminationsmoduls. 1) Adenylierung der einzubauenden Aminosäure (AS₃) unter ATP-Verbrauch durch die A-Domäne (A), 2) Übertragung des Aminoacyladenylats (AS₃-O-AMP) auf den PPant-Arm der PCP-Domäne (der PPant-Arm ist durch eine grüne, gezackte Linie dargestellt), 3) Kondensation mit dem bereits synthetisierten Peptid (durch AS₁-AS₂ dargestellt) an der stromaufwärts gelegenen Kondensationsdomäne (C) und 4) Freisetzung des Peptids an der Thioesterase-Domäne (TE). Die Abbildung wurde nach Weber *et al.* modifiziert.^[20]

Die an den einzelnen Domänen stattfindenden Reaktionen sind schematisch in Abbildung 3 zusammengefasst. Die erste Reaktion eines Moduls ist die spezifische Erkennung und Adenylierung der einzubauenden Aminosäure durch die A-Domäne (Schritt 1 in Abbildung 3). Dieses Aminoacyladenylat wird anschließend auf die PCP-Domäne übertragen (2). Da die Aminosäure nun als Thioester an der PCP-Domäne gebunden ist, wird diese auch Thiolierungsdomäne (T-Domäne) genannt. Die PCP-Domäne muss vor Beginn der nichtribosomalen Peptidsynthese posttranslational modifiziert werden. Bei diesem sogenannten „*priming*“ wird der Phosphopantethein-Arm (PPant-Arm) durch die Phosphopantetheintransferase von Coenzym A auf einen hochkonservierten Serinrest der *apo*-PCP-Domäne übertragen. Die so entstandene *holo*-PCP-Domäne fungiert als Transporteinheit für die aktivierten Aminosäuren beziehungsweise die wachsende Polypeptidkette zwischen den einzelnen katalytischen Zentren. Die von der A-Domäne aktivierte und nun PCP-gebundene Aminosäure wird an der C-Domäne mit der Polypeptidkette verknüpft (3). Hierbei katalysiert die C-Domäne die Bildung einer Peptidbindung zwischen dem nukleophilen Aminoacyl-Rest und dem *N*-terminal benachbarten elektrophilen Peptidylrest. Hat die Polypeptidkette das Terminationsmodul erreicht, findet die Produktfreisetzung an der TE-Domäne statt (4). Hierfür wird der PCP-Peptidylthioester durch einen Serinrest im

aktiven Zentrum der TE-Domäne nukleophil angegriffen. Es entsteht ein kovalentes Acyl-Enzym-Intermediat, welches hydrolysiert werden kann, um ein lineares Peptid freizusetzen. Für die Synthese eines zyklischen Produktes wird die Esterbindung von einem Nukleophil innerhalb der Polypeptidkette angegriffen.^[21] Solche Makrozyklisierungen werden jedoch nicht immer von der TE-Domäne vermittelt. Bei pilzlichen NRPS ist statt einer TE-Domäne oft eine abschließende C_T-Domäne vorhanden, die die Makrozyklisierung ausführt.^[22]

Zusätzlich zu den essentiellen Domänen C, A und PCP kann ein Elongationsmodul noch weitere Domänen enthalten, um das Peptid zu modifizieren. Zu diesen Modulen gehören unter anderem N-Methylierungs-, Heterozyklisierungs- und Epimerisierungsdomänen. Die N-Methylierungsdomänen (N-Mt-Domänen) kommen beispielsweise bei der Enniatin-Synthetase vor. Hier sind die N-Mt-Domänen in der A-Domäne des entsprechenden Moduls implementiert.^[23] Heterozyklisierungsdomänen sind sowohl strukturell und mechanistisch mit C-Domänen verwandt und können diese in der Synthetase ersetzen, wie bei der Synthese von Bacitracin und Vibriobactin.^[24] Die Epimerisierungsdomäne (E-Domäne) katalysiert die Racemisierung und damit die Einstellung des Gleichgewichtes zwischen L- und D-Aminosäuren. Die E-Domänen, die sich in Initiationsmodulen befinden, besitzen dabei eine Aminoacyl-Epimerase-Funktion, E-Domänen aus Elongationsmodulen sind dagegen Peptidyl-Epimerasen. Die jeweils stromabwärts gelegene C-Domäne besitzt eine enantioselektive Donor-Bindungsstelle und sorgt damit für den spezifischen Einbau der D-Aminosäure in das Peptid.^[25] Darüber hinaus spielen E-Domänen in C-terminalen Modulen eine wichtige Rolle bei der Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen den einzelnen Teilen einer Synthetase.^[26]

1.1.2 Modifizierende Enzyme

Während und nach der Synthese des Peptidgrundgerüsts kann dieses durch sogenannte *Tailoring*-Enzyme noch weiter modifiziert werden. Im Gegensatz zu Epimerisierungen, N-Methylierungen und Heterozyklisierungen, die meist an den entsprechenden Domänen innerhalb der NRPS (*in vivo*) während der Synthese des Peptidgrundgerüsts ablaufen, finden Halogenierungen, Glykosylierungen, Hydroxylierungen und oxidative Ringschlüsse oft durch externe modifizierende Enzyme statt.^[27] Die *Tailoring*-Enzyme führen diese Veränderung entweder an der PCP-gebundenen Aminosäure beziehungsweise Peptidkette ein (*in trans* zur NRPS) oder sie dekorieren das Peptid erst nach Freisetzung von der Synthetase.^[28] Die Gene, welche für die *Tailoring*-Enzyme kodieren, sind in den meisten Fällen Bestandteil des entsprechenden Genclusters. Dies erlaubt die Regulie-

rung zusammen mit den anderen Biosynthesegenen durch gemeinsame Transkription.^[27] Viele Reaktionen von *Tailoring*-Enzymen verleihen den Naturstoffen Strukturmerkmale, die für deren Bioaktivität entscheidend sind. So ist die antibiotische Aktivität des Vancomycin-Typ Glykopeptidantibiotikums Balhimycin um das 8 bis 16fache erniedrigt, wenn die Chlor-Substituenten fehlen.^[29] Die Chlorierung wird dabei von der Halogenase BhaA eingeführt.^[30] Glycosyltransferasen spielen zum Beispiel in der Biosynthese von Vancomycin und Teicoplanin eine wichtige Rolle.^[31,32] Die für die oxidativen Ringschlüsse von Vancomycin verantwortlichen Enzyme OxyA, OxyB und OxyC sind gut untersucht.^[33–40] Diese Cytochrom P450-Monooxygenasen katalysieren nacheinander die Verknüpfung von Ring C+D (OxyB), D+E (OxyA) und A+B (OxyC), während die Peptidkette an der Synthetase gebunden ist.^[33] Diese Ringschlüsse formen aus dem sehr flexiblen, linearen Heptapeptid die starre Struktur, die es Vancomycin ermöglicht, das charakteristische D-Ala-D-Ala-Dipeptidmotiv zu binden und so die Zellwandbiosynthese zu blockieren bzw. seine antibiotische Wirkung zu entfalten. Auch die β -Hydroxylierung von Tyrosin wird bei der Vancomycin-Synthese von einer Cytochrom P450-Monooxygenase (OxyD) ausgeführt, in diesem Fall findet die Oxidation jedoch außerhalb der Haupt-NRPS an einem einzelständigen AT-Modul statt.^[41]

1.2 Hydroxylierungen

Eine wichtige Modifizierung von nicht zu überschätzender Bedeutung bei der Biosynthese von Naturstoffen sind Hydroxylierungen. Sie sind sowohl bei Vorläufern und Intermediaten zu finden, bei denen diese Hydroxygruppe weiterreagiert,^[42,43] als auch in der endgültigen Struktur von Sekundärmetaboliten.^[9,41] Dort tragen sie oft einen erheblichen Teil zur Bioaktivität bei. Die Hydroxylierungen werden durch verschiedene Enzyme katalysiert, wie den Nicht-Häm-Eisen-Oxygenasen, den flavinabhängigen Monooxygenasen oder den Häm-Oxygenasen, deren Prototyp die Cytochrom P450-Monooxygenase ist.^[44] Da sich diese Arbeit auf die von einer flavinabhängigen Monooxygenase katalysierte α -Hydroxylierung und die β -Hydroxylierungen katalysiert durch eine Cytochrom P450-Monooxygenase befasst, werden diese beiden Enzym-Klassen im Folgenden näher beschrieben.

1.2.1 Flavin-Monooxygenasen und Flavin-Reduktasen

Flavin-Reduktasen sind Enzyme, die Riboflavin, Flavinmononukleotid (FMN) oder Flavinadenindinukleotid (FAD, s. Abbildung 4), unter NADH- oder NADPH-Verbrauch reduzieren können (s. Abbildung 5 links).^[45] Sie lassen sich in zwei Klassen einteilen: Die erste Klasse besteht

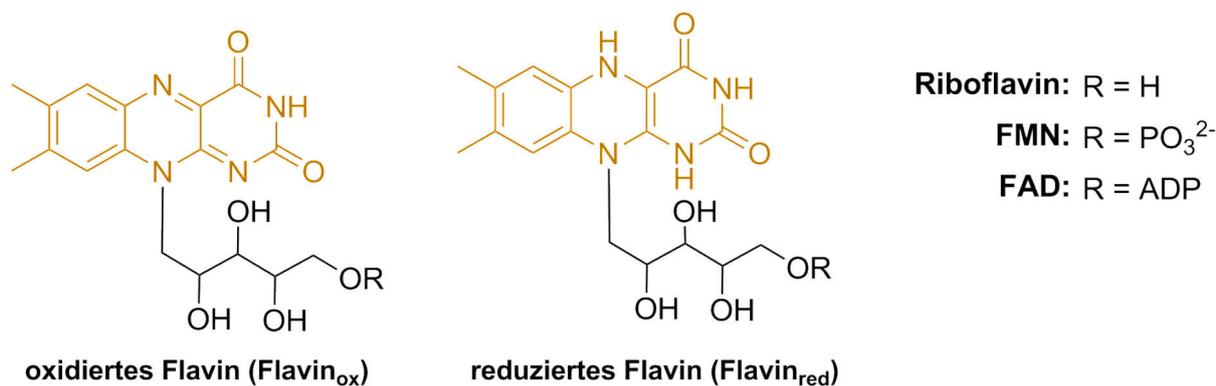


Abbildung 4. Strukturen der oxidierten und reduzierten Form von Flavinen. Der Isoalloxazinring (gelb markiert) ist der mechanistisch relevante Teil der Flavine und verleiht ihnen zudem deren gelbe Farbe.

aus Reduktasen, die z.B. in *Escherichia coli* und phosphoreszierenden Bakterien gefunden wurden.^[46–48] Die Flavin-Reduktase Fre aus *E. coli* akzeptiert sowohl NADH als auch NADPH als Elektronendonator sowie mehrere Flavine und -analoge als Elektronenakzeptor. Dies deutet darauf hin, dass die Substraterkennung hier nur über den Isoalloxazinring der Flavine erfolgt.^[47,49] Die zweite und neueste Klasse besteht aus Flavin-Reduktasen, die in Kombination mit einer flavinabhängigen Monooxygenase arbeiten (s. Abbildung 5). Diese sogenannten kurzkettingen Flavin-Reduktasen (*short-chain flavin reductases*) haben keine Sequenzähnlichkeit mit Reduktasen der ersten Klasse und sind in vielen unterschiedlichen Reaktionen involviert, wie z.B. der Oxidation von Aromaten,^[50] der Desulfurierung fossiler Brennstoffe^[51] und der Biosynthese von Antibiotika.^[52–54]

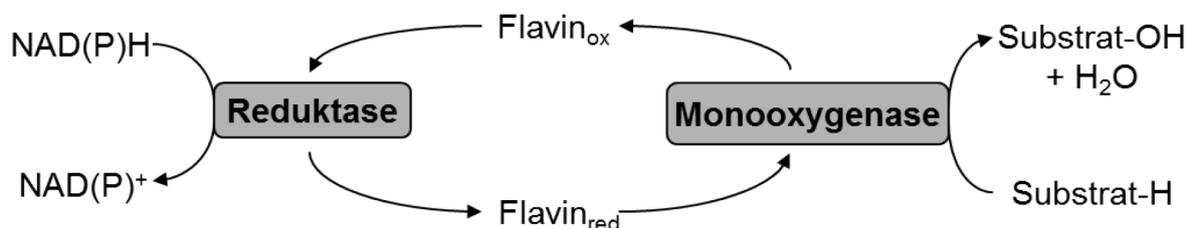


Abbildung 5. Reaktionsmechanismus von Flavin-Reduktasen und Flavin-Monooxygenasen.

Im Unterschied zu den Flavoproteinen, bei denen die Flavine eine prosthetische Gruppe darstellen, werden die Flavine bei den Flavin-Reduktasen nicht fest gebunden. Stattdessen bindet das Flavin und das NAD(P)H nur vorübergehend im aktiven Zentrum der Reduktase. Hierbei liegt der Nicotinamidring direkt über dem Isoalloxazinring des Flavins. Damit kann der Hydrid-Transfer sehr schnell stattfinden.^[55] Das Flavin nimmt hier also eher die Rolle eines Cosubstrates als die einer prosthetischen Gruppe ein. Das reduzierte Flavin wird von der Flavin-Monooxygenase genutzt, um mit Hilfe von molekularem Sauerstoff das Substrat zu hydroxylieren. Es konnte gezeigt werden, dass das reduzierte Flavin von der Reduktase zur Monooxygenase diffundiert, ohne dass die beiden Enzyme direkt miteinander interagieren.^[50,56] Während Reduktasen oft

mehrere Flavine als Substrat akzeptieren (meist FMN und FAD), sind Monooxygenasen in den meisten Fällen auf ein Flavin spezialisiert. So reduziert die Reduktase PheA2 aus *Bacillus thermoglucosidasius* A7 Riboflavin, FMN sowie FAD, die Aktivität der dazugehörigen Reduktase PheA1 ist jedoch streng FAD-abhängig.^[57] Der postulierte Mechanismus der Flavin-Monooxygenasen verläuft über ein Hydroperoxyflavin-Intermediat und ist in Abbildung 6 dargestellt.^[58] Das von der Reduktase reduzierte Flavin bindet an die Monooxygenase, wo die Addition von molekularem Sauerstoff an das Kohlenstoffatom C_{4a} zur Ausbildung eines Peroxyflavin-Intermediates führt. Dieses Peroxyflavin ist sehr instabil und zerfällt ohne Bindung an ein Enzym schnell zu Wasserstoffperoxid und oxidiertem Flavin. Die Monooxygenase stabilisiert hingegen dieses Intermediat in der Weise, dass das Substrat oxidiert werden kann. Je nach Beschaffenheit des Substrates findet eine nukleophile oder eine elektrophile Oxidation statt. Während das eine Sauerstoffatom in das Substrat eingefügt wird, wird das andere zu Wasser reduziert. Nach Oxidation wird das oxidierte Flavin von der Reduktase mit Hilfe von NAD(P)H wieder reduziert und steht einem neuen Katalysezyklus zur Verfügung.

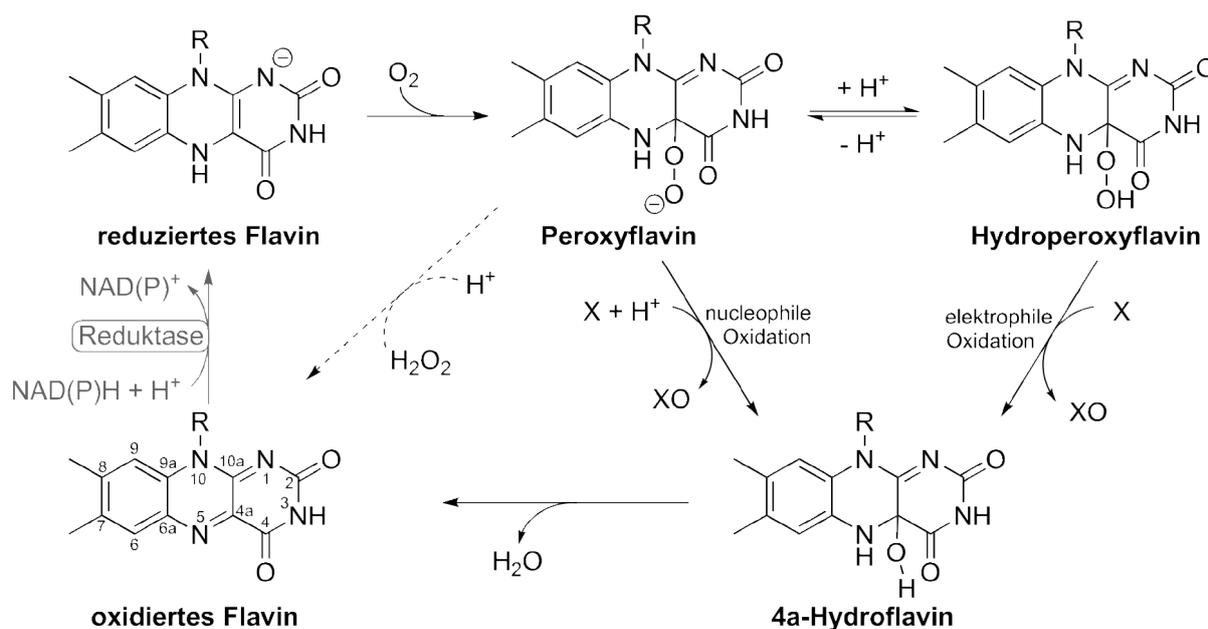


Abbildung 6. Putativer Mechanismus der von Flavin-Monooxygenasen durchgeführten Oxidation. Nach der Oxidation wird das oxidierte Flavin von der Reduktase wieder reduziert (in grau dargestellt). In Abwesenheit der Monooxygenase reoxidiert das reduzierte Flavin schnell über das Peroxyflavin-Intermediat zu oxidiertem Flavin (gestrichelte Pfeile). Die Abbildung wurde nach Berkel *et al.* modifiziert.^[58]

1.2.2 Cytochrom P450-Monooxygenasen

Die Familie der Cytochrom P450-Monooxygenasen (CYP450) umfasst einen großen Teil der Häm-bindenden Enzyme. Der Häm-Cofaktor ist an das Protein-Rückgrat über ein Thiolat gebunden, welches von einem konservierten Cysteinrest gebildet wird. Die von den CYP450-

Oxygenasen katalysierten Reaktionen lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen: Zum einen spielen sie eine wichtige Rolle in dem Metabolismus von Xenobiotika, indem sie diese Stoffe abbauen oder hydroxylieren, um deren Ausscheidung zu ermöglichen. Zum anderen sind CYP450 in vielen biosynthetischen, anabolen Stoffwechselwegen vorhanden. Beim Menschen sind sie beispielsweise für die Synthese von Steroid-Hormonen und fettlöslichen Vitaminen wichtig, bei Bakterien sind sie häufig an der Herstellung von Sekundärmetaboliten beteiligt.^[59]

Der Mechanismus der CYP450-vermittelten Oxidation ist innerhalb dieser großen Enzymfamilie bemerkenswert ähnlich. Der in Abbildung 7 dargestellte katalytische Zyklus beginnt mit der Substratbindung an das aktive Zentrum (2). Durch die Verdrängung des Wassermoleküls durch das Substrat ändert sich der Spin-Zustand des Eisens von *low-spin* zu *high-spin*. Häufig ist diese Spinzustandsänderung nur bei einem Teil der Enzyme zu beobachten, bei einigen Systemen ist sie nicht obligatorisch.^[60] Der *high-spin*-Zustand von Fe(III) ist thermodynamisch instabil, dieses wird daher leichter zu Fe(II) reduziert (3). Nun kann molekularer Sauerstoff binden (4) und nach erneuter Reduktion bildet sich ein Eisen-Peroxyanion (5). Nach Protonierung wird das entstandene Hydroperoxy-Intermediat (6) erneut protoniert. Der Bruch der O-O-Bindung unter Was-

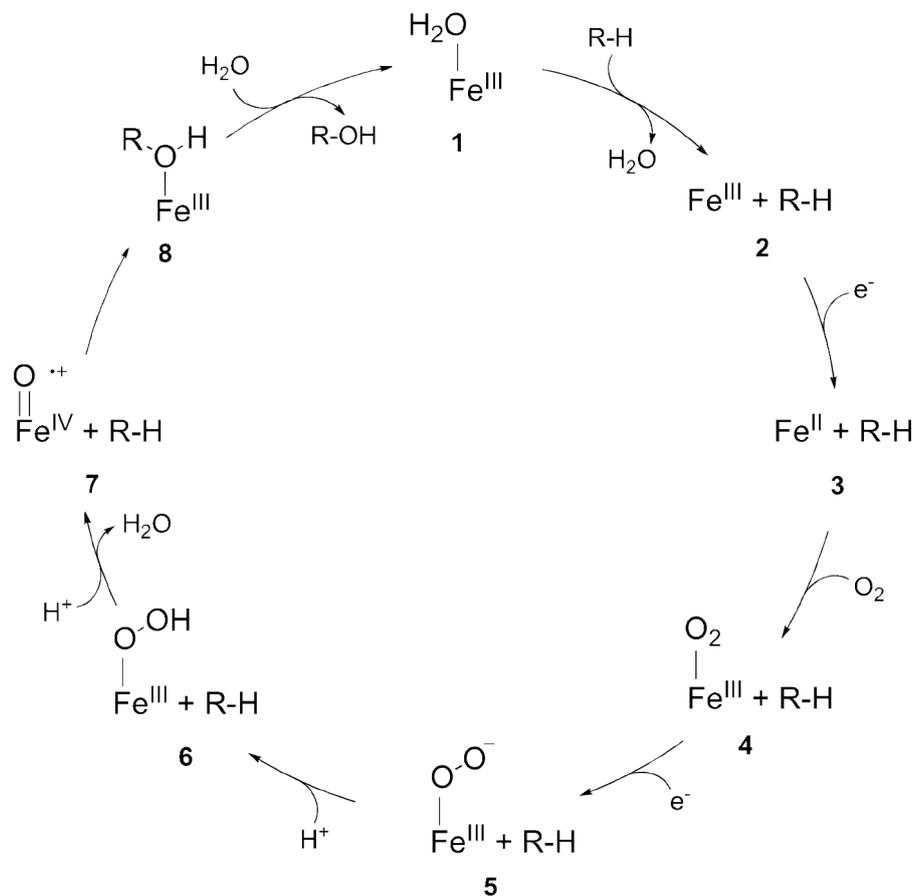


Abbildung 7. Katalytischer Zyklus von Cytochrom P450-Monooxygenasen. Die Abbildung wurde nach Denisov *et al.* modifiziert.^[59]

serabspaltung führt dann zum sogenannten *Compound I* (7). Nach Ausbildung des Produkt-Komplexes (8) folgt die Abspaltung des Produktes und Wasser bindet wieder an das Eisen(III)-Zentrum (1).^[44]

Die Elektronen, die zur Sauerstoff-Aktivierung benötigt werden, stammen aus den Cofaktoren NADH oder NADPH und werden meist nacheinander durch ein oder mehrere Redox-Partner-Proteine an die CYP450 übertragen.^[61,62] Die Gesamtreaktion von CYP450-Monooxygenasen ist in Gleichung (1) dargestellt.



Ist der Rest R ein Alkylrest, so stellt diese Reaktion den Prototypen einer P450-Reaktion dar, die Insertion eines Sauerstoffatoms in eine nichtaktivierte C-H-Bindung. Der Mechanismus dieser aliphatischen Hydroxylierung ist in Abbildung 8 dargestellt. Dieser verläuft über eine radikalische Zwischenstufe des Substrates, die mit dem Eisen-gebundenen Hydroxylradikal rekombiniert (10) und das hydroxylierte Produkt bildet (11).

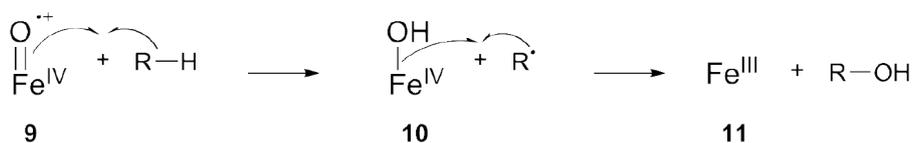


Abbildung 8. Postulierter Mechanismus der Cytochrom P450-katalysierten Hydroxylierung. Die Abbildung wurde nach Cryle *et al.* modifiziert.^[63]

Die meisten Cytochrom P450-Monooxygenasen akzeptieren im Reaktionsmedium frei verfügbare Substrate. In den letzten Jahren wurden jedoch immer mehr CYP450-Enzyme gefunden, die stattdessen selektiv kleine Moleküle oxidieren, die an ein Trägerprotein gebunden sind.^[64] Diese Enzyme finden sich meist in Biosynthesewegen von Antibiotika und anderen Naturstoffen, die nichtribosomal oder durch die Polyketidsynthese hergestellt werden. Das Trägerprotein kann daher ein *acyl carrier protein* (ACP) oder ein *peptidyl carrier protein* (PCP) sein. In der Novobiocin-Synthese von *Streptomyces spheroides* ist P450_{NovI} für die β -Hydroxylierung von L-Tyrosin verantwortlich. Das β -Hydroxytyrosin ist ein Vorläufer für den Coumarin B-Ring von Novobiocin. Das Substrat von P450_{NovI} ist das PCP-gebundene L-Tyrosin.^[65] Auch in der Biosynthese von Vancomycin wird die β -Hydroxylierung durch OxyD an PCP-gebundenem Tyrosin durchgeführt.^[41] In der Biosynthese von Nikkomycin wird ein PCP-gebundenes Histidin durch NikQ β -hydroxyliert.^[42] In diesen Fällen wird die zu hydroxylierende Aminosäure an ein externes AT-

Modul (bestehend aus einer A- und einer PCP-Domäne) gebunden, dort hydroxyliert und anschließend von einer Thioesterase abgespalten, um der Haupt-NRPS als Substrat zur Verfügung zu stehen. Bei den oxidativen Ringschlüssen während der Vancomycin-Biosynthese konnte jedoch gezeigt werden, dass die Verknüpfungen durch die Cytochrom P450-Oxygenasen OxyA, OxyB und OxyC an den Peptiden katalysiert werden, die an den PCP-Domänen der Haupt-NRPS gebunden sind.^[34,38,39]

1.3 Naturstoffe aus Streptomyceten

Streptomyceten sind grampositive, Myzel-bildende Bodenbakterien und bilden die größte Gattung der Actinobacteria. Die für die Medizin interessanteste Eigenschaft von Streptomyceten ist deren Fähigkeit, eine Vielzahl an bioaktiven Sekundärmetaboliten zu produzieren. Die Wirkungen dieser Stoffe reichen von antibakteriell oder antiviral über fungizid und antitumor, bis hin zu immunsuppressiv.^[2] Das erste aus Streptomyceten isolierte Antibiotikum war das nach seiner Gattung benannte Streptomycin, welches Waksman *et al.* im Jahr 1943 aus *Streptomyces griseus* isolierte.^[66] Streptomycin war das erste Antibiotikum, welches für die Behandlung von Tuberkulose eingesetzt werden konnte und erlangte damit eine große Bedeutung.^[67] Seitdem wurden zahlreiche Antibiotika aus Streptomyceten isoliert und zur klinischen Verwendung weiterentwickelt. Abbildung 9 veranschaulicht den großen Anteil, den die Gattung *Streptomyces* bei der Entdeckung



Abbildung 9. Wichtige Antibiotika-Entdeckungen und deren Produzentenstämme. Antibiotika, die aus Streptomyceten isoliert wurden, sind blau gekennzeichnet. Die Abbildung wurde nach Procópio *et al.* modifiziert.^[68]

neuer Antibiotika in den letzten Jahrzehnten hatte und aller Wahrscheinlichkeit nach weiter haben wird.^[68]

1.3.1 Skyllamycin A und B aus *Streptomyces* sp. Acta 2897

Die Arbeitsgruppe um Professor Hans-Peter Fiedler an der Eberhard Karls-Universität Tübingen untersuchte bei einem Screening nach neuen Produzenten von bioaktiven Substanzen verschiedene Actinobakterien unterschiedlicher Herkunft. Aus einer Bodenprobe von der Küste Englands, in der Nähe der Stadt Warkworth, wurde ein Streptomycet isoliert, der zwei Naturstoffe produzierte, deren Metabolitspektrum bis dahin unbekannt waren. Nach der Strukturaufklärung durch Dipl.-Chem. Ellen Graf und Dipl.-Chem. Vivien Schubert wurden die beiden Stoffe Acta A und Acta B, und der Produzentenstamm *Streptomyces* sp. Acta 2897 genannt.^[69–71] Eine Literaturrecherche nach diesen Strukturen zeigte, dass die Arbeitsgruppe um *Toki et al.* den Naturstoff RP-1776 bereits bei einem Screening nach Inhibitoren für den Wachstumsfaktor PDGF aus *Streptomyces* sp. KY11784 isoliert hatten. Die Struktur von RP-1776 ist mit der von Acta B identisch.^[72] Nach der Strukturaufklärung und der Sequenzierung des Genclusters, der für die Biosynthese verantwortlich ist, wurden die beiden Verbindungen in Skyllamycin A (früher Acta B, bzw. RP-1776) und Skyllamycin B (früher Acta A) umbenannt.^[9]

Die physiologische Wirkung, die Skyllamycin A interessanterweise aufweist, beruht auf der Bindung an den Wachstumsfaktor PDGF-BB, der damit an der Bindung an den Rezeptor gehindert

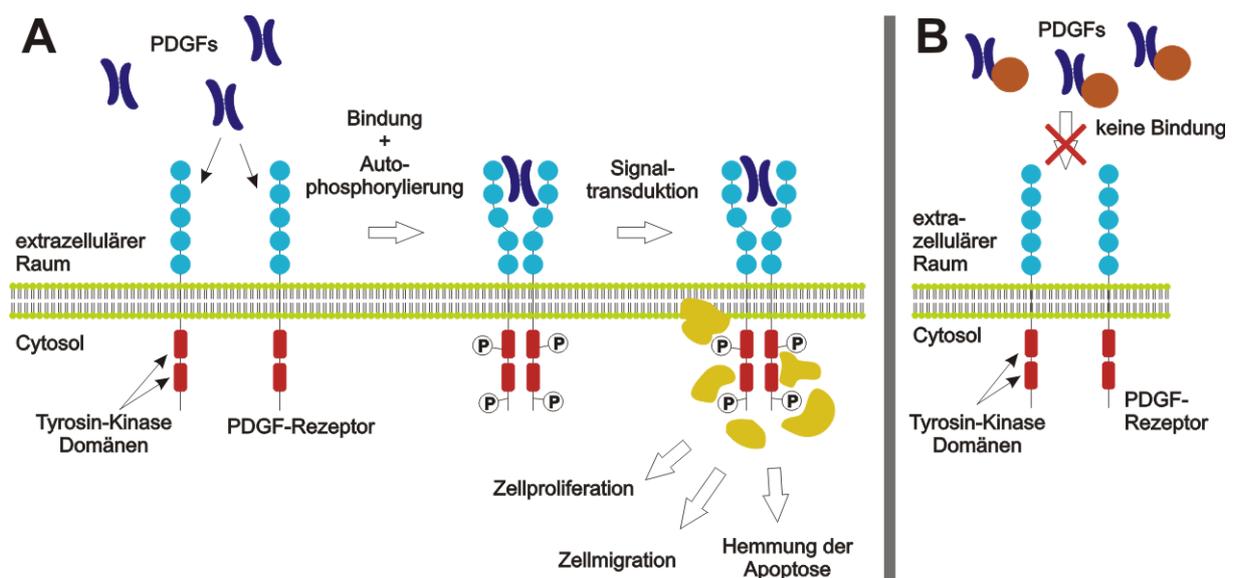


Abbildung 10. (A) Mechanismus der Aktivierung der Signaltransduktion durch die Wachstumsfaktoren PDGF. (B) Mechanismus der Inhibition der PDGF-Bindung durch Skyllamycin A (orange Kreise) (Abbildung von Dr. Stefan Pohle).

wird. Die Abkürzung PDGF steht für *platelet derived growth factor*, da diese Wachstumsfaktoren zuerst aus Blutplättchen (engl. *platelets*) isoliert wurden.^[73] Die Wirkungsweise von Skyllamycin A ist schematisch in Abbildung 10 dargestellt. PDGFs sind dimere Polypeptide, die die Signaltransduktion durch Bindung an die extrazelluläre Domäne der PDGF-Rezeptoren aktivieren. Diese dimerisieren und phosphorylieren sich gegenseitig an verschiedenen Tyrosin-Seitenketten der intrazellulären Domäne. Dadurch wird die Kinase-Funktion des Rezeptors aktiviert und Bindungsstellen für weitere Signalmoleküle gebildet. So nehmen die PDGFs beispielsweise Einfluss auf die Genexpression, Zellproliferation, Zellmigration und die Hemmung der Apoptose.^[73] Bei Vorhandensein von Skyllamycin A bindet dieses an den Wachstumsfaktor und inhibiert die Bindung von PDGF-BB an den PDGF- β -Rezeptor. Der IC_{50} -Wert liegt hierfür bei $11 \pm 6 \mu\text{M}$. Ebenfalls inhibiert Skyllamycin A die Phosphorylierung des PDGF- β -Rezeptors mit einem IC_{50} -Wert von $30 \pm 9 \mu\text{M}$. Darüber hinaus besitzt der Naturstoff eine schwache antibiotische Aktivität gegen die grampositiven Bakterien *Bacillus subtilis* No. 10707 und *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P.^[72]

Skyllamycin ist ein Cyclodepsipeptid mit einigen ungewöhnlichen Strukturmerkmalen (Abbildung 11). Der Unterschied zwischen Skyllamycin A und B besteht in der β -Methylierung Asparaginsäure in Position 3 bei Skyllamycin A. Auffallend ist, dass 7 (6 bei Skyllamycin B) der 11 Aminosäuren nichtproteinogen sind, hierbei ist etwa jede zweite Aminosäure noch zusätzlich strukturell

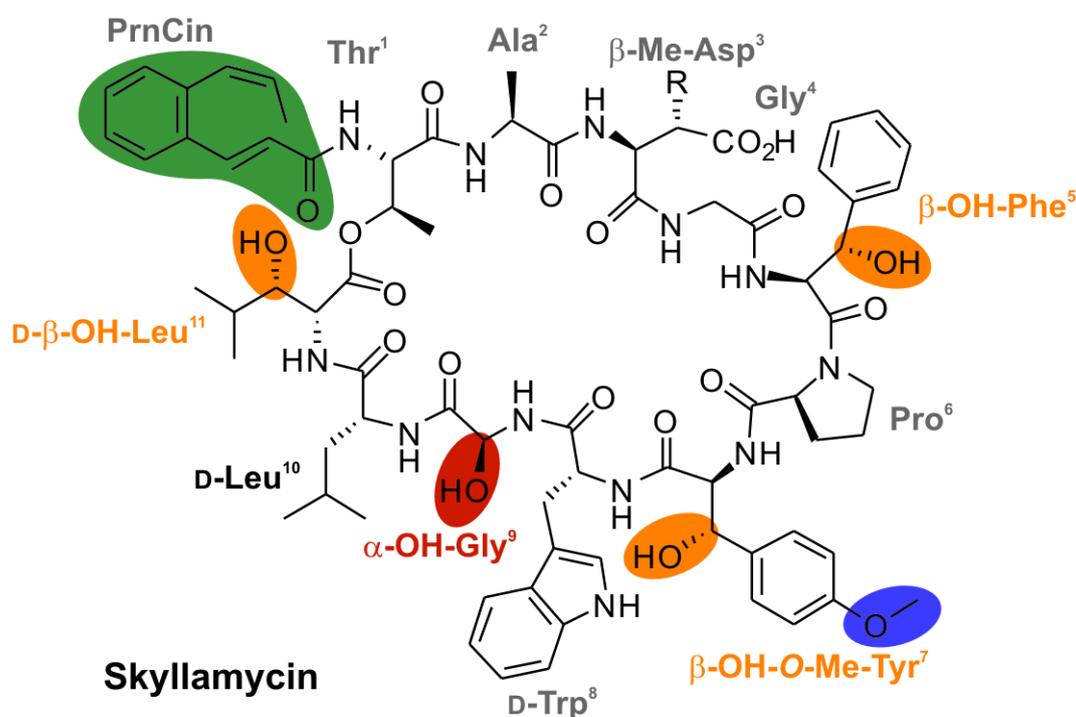


Abbildung 11. Struktur von Skyllamycin A ($R = \text{Me}$) und Skyllamycin B ($R = \text{H}$). Besondere Strukturmerkmale sind farblich gekennzeichnet: α -Hydroxylierung in rot, β -Hydroxylierungen in orange, O -Methylierung in blau und der 2-[1'-Z-Propenyl]-Zimtsäurerest in grün.

modifiziert. Wichtige Strukturmerkmale, die dies reflektieren, sind die α -Hydroxylierung von Glycin an Position 9 (Gly⁹), die drei β -Hydroxylierungen an L-Phe⁵, L-OMe-Tyr⁷ und D-Leu¹¹, die O-Methylierung von L-Tyr⁷ und der ungewöhnliche 2-[1'-Z-Propenyl]-Zimtsäurerest am N-Terminus der Aminosäure Threonin. Die Stereochemie, die von Toki *et al.* nicht beschrieben wurde, konnte von Ellen Graf, Dr. Pierre-Loïc Saaidi und Vivien Schubert aufgeklärt werden.^[69,70] Hierzu wurden chirale GC-MS- und HPLC-MS-Analysen am hydrolysierten Naturstoff und unter Hinzuziehung von Referenzamino-säuren durchgeführt. Die Konfiguration der α -Hydroxylierung von Glycin⁹ wurde erst kürzlich mithilfe von NOESY-NMR-Studien in Kombination mit Moleküldynamik-Simulationen bestimmt.^[71] Der Ringschluss erfolgt durch die Esterbindung der Carboxygruppe von β -OH-D-Leu₁₁ mit der Hydroxygruppe der Seitenkette von L-Thr¹.

Das für die Biosynthese von Skyllamycin verantwortliche Gencluster wurde von Dr. Stefan Pohle identifiziert.^[8,9] Dazu wurden von konservierten Bereichen bekannter NRPS und der modifizierenden Enzyme DNA-Sonden erstellt, mit denen eine Cosmidbank von *Streptomyces* sp. Acta 2897 hybridisiert wurde. Besonders zielführend waren dabei Sonden, die ausgehend von konservierten Sequenzen von Glutamatmutasen entwickelt wurden. Glutamatmutasen sind bei der Biosynthese von anderen Naturstoffen aus Streptomyceten für die Synthese von β -Methylasparaginsäure zuständig;^[74] daher war es wahrscheinlich, dass ein ähnliches Enzym diese Aufgabe auch bei der Biosynthese von Skyllamycin übernimmt. Nach der Sequenzierung des ersten Cosmids, der einen Teil des Genclusters enthielt, wurden die Cosmide mit den angrenzenden Bereichen des Clusters mittels wiederholter Hybridisierung und PCR-Experimenten identifiziert und anschließend sequenziert. Insgesamt konnte damit ein knapp 90 kbp großer Be-

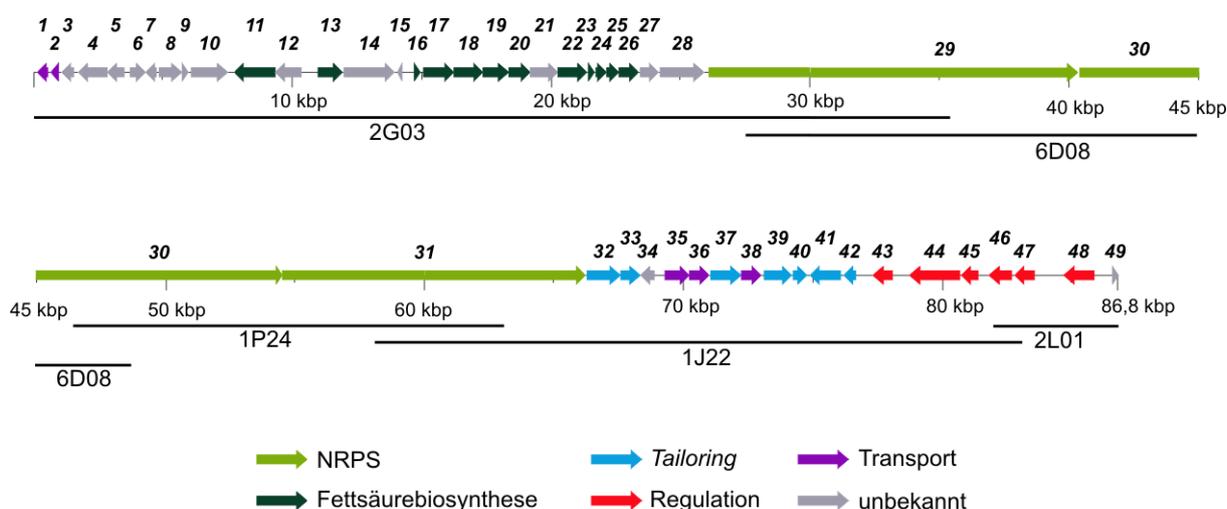


Abbildung 12. Biosynthesecluster von Skyllamycin. Die schwarzen Linien stellen die identifizierten und sequenzierten Cosmide dar, deren Bezeichnungen befinden sich darunter. Die Gene wurden entsprechend deren putativen Funktionen farblich markiert. Die Bezeichnungen der Gene wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit auf deren Zahlen beschränkt (z.B. 32 statt *sky32*). Die Abbildung wurde nach Pohle, 2010 modifiziert.^[8]

reich sequenziert werden, der den Biosynthesegencluster von Skyllamycin enthält (s. Abbildung 12).^[8,9]

Durch Genunterbrechungsmutagenese der identifizierten NRPS-Gene konnte belegt werden, dass die drei Gene *sky29*, *sky30* und *sky31* für die Peptidsynthetasen kodieren, die für die Herstellung von Skyllamycin verantwortlich sind. Anhand von Sequenzvergleichen konnte die Domänenorganisation der Synthetasen und die Aminosäurespezifitäten der A-Domänen ermittelt werden. Die nichtribosomale Peptidsynthese von Skyllamycin ist in Abbildung 13 schematisch dargestellt.^[8,9]

Durch *in frame*-Geninaktivierungen von Genen, die für putative *Tailoring*-Enzyme kodierten, konnten Mutanten hergestellt werden, deren Kulturextrakte mittels HPLC-MS und -MS/MS-Experimenten auf entsprechende Skyllamycin-Mutanten untersucht wurden. Dadurch konnten einige modifizierende Enzyme identifiziert werden. So produzierte die Δ *mono*-Mutante, bei der das Gen für eine putative flavinabhängige Monooxygenase (*sky39*) deletiert war, ein Skyllamycin-Derivat ohne α -Hydroxylierung an Glycin₉. Zudem befindet sich stromabwärts im Gencluster ein Gen für eine putative flavinabhängige Reduktase (*sky40*). Dies deutete darauf hin, dass diese beiden Enzyme für die α -Hydroxylierung von Glycin₉ verantwortlich sind.^[8,9]

Die Deletion von *sky32*, ein Gen für eine putative Cytochrom P450-Monooxygenase, führte zu der Δ *sky32*-Mutante, die ein Skyllamycin-Derivat produzierte, dem alle β -Hydroxylierungen fehlten.^[8,9] Dies war zunächst überraschend, da die β -hydroxylierten Aminosäuren in Skyllamycin mit L-Phenylalanin, L-OMe-Tyrosin und D-Leucin recht unterschiedliche Substrate für ein einzelnes Enzym darstellen. Spätere Sequenzvergleiche deuteten jedoch darauf hin, dass es sich bei diesem Enzym um eine Cytochrom P450-Monooxygenase handeln könnte, die statt der freien Aminosäuren die PCP-gebundenen Aminosäuren hydroxyliert und damit eher die entsprechenden PCP-Domänen als Substrat dienen.

Des Weiteren wurden die Gendelektionsmutanten Δ *sky37* und Δ *sky41/42* generiert. *Sky37* ist eine putative O-Methyltransferase, es wurde daher vermutet, dass diese für die O-Methylierung von L-Tyrosin₇ verantwortlich ist. Die Mutante Δ *sky37* produzierte ein Skyllamycin-Derivat, welches statt dem zunächst erwarteten Tyrosin jedoch Phenylalanin an Position 7 aufwies. Fütterungsexperimente zeigten, dass nur unpolare Seitenketten in das Peptid eingebaut werden, was darauf schließen lässt, dass die O-Methylierung von Tyrosin bereits vor Aktivierung und Adenylierung

durch A-Domäne erfolgen muss. Bei der Mutante $\Delta sky41/42$ sind die Gene für putative Glutamatmutase-Untereinheiten deletiert. Die Untersuchung der Kulturextrakte ergab, dass diese Mutante nur noch Skyllamycin B produzierte. Dies belegt, dass Sky41/42 für die Synthese von β -Methylasparaginsäure verantwortlich sind, welche für die Produktion von Skyllamycin A notwendig ist.^[8,9]

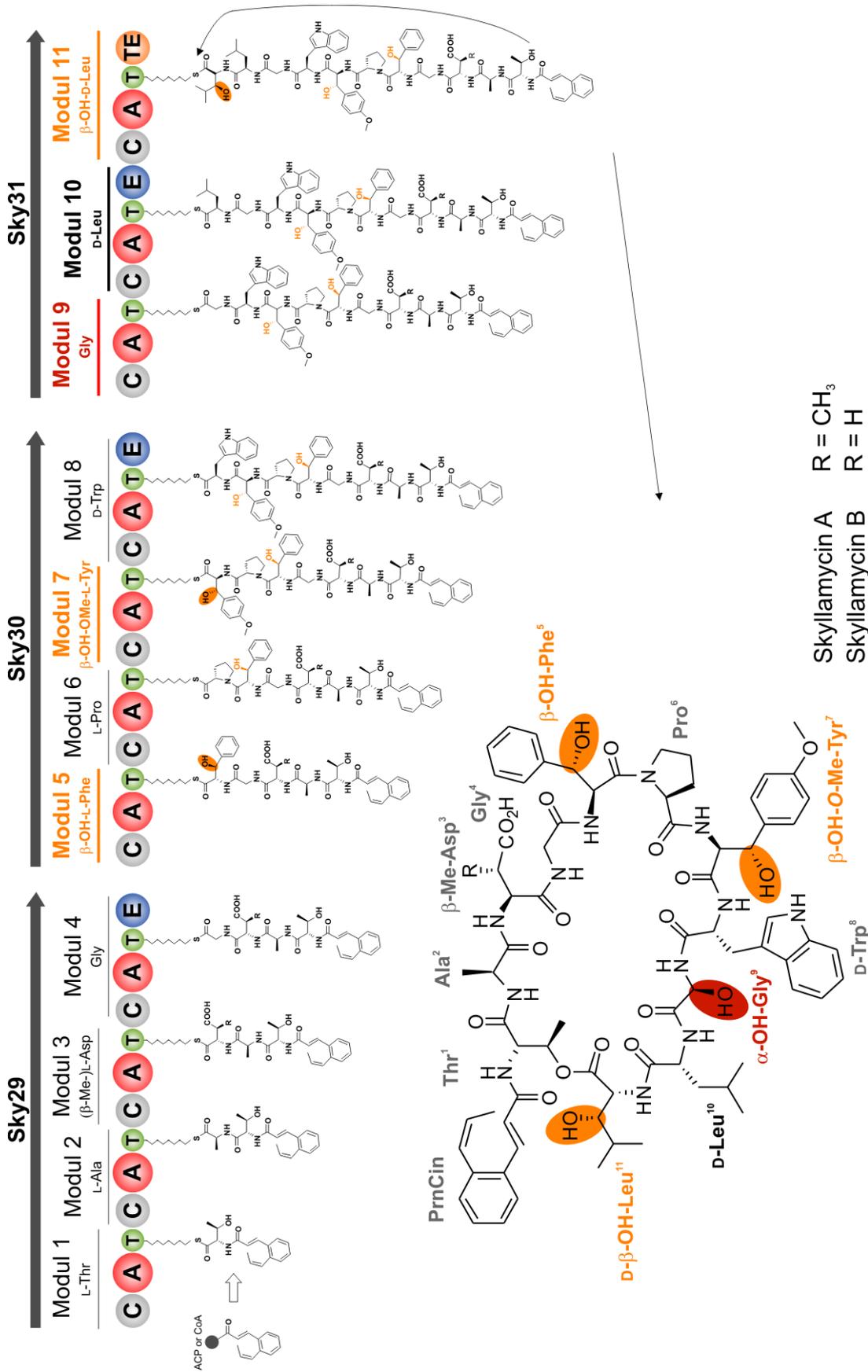


Abbildung 13. Modell der nichtribosomalen Peptidsynthese von Skyllamycin. Die Synthese der Peptidkette beginnt nach Aktivierung und Bindung von Threonin an Modul 1 und der Verknüpfung mit dem Zimtsäure-ähnlichen Rest durch die erste C-Domäne. Die Zimtsäure-Einheit wird vorher als ACP oder CoA aktiviert. Die Methylierungen von Asp³ und Tyr⁷ werden wahrscheinlich vor Aktivierung durch deren A-Domänen eingeführt.^[8] Der Zeitpunkt der Hydroxylierungen ist Gegenstand dieser Arbeit. Module, durch die Aminosäuren eingebaut werden, die in Skyllamycin β-hydroxyliert sind, sind orange gekennzeichnet, das Modul 9, welches das im fertigen Peptid α-hydroxylierte Glycin inkorporiert ist rot markiert. Die Abbildung wurde nach Pohle, 2010 modifiziert.^[8]

2 Zielsetzung

Bei zahlreichen bioaktiven Naturstoffen werden während der Biosynthese Hydroxylierungen eingefügt, die oftmals einen großen Einfluss auf deren Bioaktivität haben. Um die Biosynthese dieser Naturstoffe zu verstehen und für biotechnologische Zwecke nutzbar, ist es essentiell, die genaue Funktionsweise der beteiligten Enzyme zu kennen. Die für die α - und β -Hydroxylierungen in Skyllamycin verantwortlichen Enzyme von *Streptomyces* sp. Acta 2897 wurden bereits durch Dr. Stefan Pohle identifiziert,^[8,9] deren Wirkweise und Mechanismus blieb jedoch ungeklärt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Einführung der α - und β -Hydroxylierungen in Skyllamycin aufzuklären. Die α -Hydroxylierung von Glycin ist bemerkenswert, da sie so nur selten in anderen bekannten Naturstoffen vorkommt und dort meist instabil ist.^[75-78] Aus diesem Grund sollten die beiden für die α -Hydroxylierung verantwortlichen Enzyme, die flavinabhängige Monooxygenase SkyMono und die dazugehörige Reduktase SkyRed, heterolog exprimiert, aufgereinigt und sowohl biochemisch als auch strukturell charakterisiert werden.

Die β -Hydroxylierungen von Phenylalanin, *O*-Methyltyrosin und D-Leucin werden alle von der Cytochrom P450-Monooxygenase P450_{sky} eingeführt. Um zu zeigen, wie es für P450_{sky} möglich ist, diese recht unterschiedlichen Aminosäuren zu hydroxylieren, sollte P450_{sky} ebenso wie ihre putativen Substrate, die PCP-Domänen der Module 5, 7 und 11, kloniert, heterolog exprimiert, aufgereinigt und biochemisch charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte gezeigt werden, wie die selektive β -Hydroxylierung von β -OH-D-Leucin an Position 11 gegenüber D-Leucin an Position 10 zustande kommt.

3 Material

3.1 Geräte und Software

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Software sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1. Verwendete Geräte und Software.

Gerät	Bezeichnung (<i>Hersteller</i>)
Autoklav	Varioklav 500 EP-Z (<i>H+P Labortechnik</i>)
Brutschränke	BD53 (<i>Binder</i>); 760154 (<i>Memmert</i>)
Clean-Bench	Microbiological safety cabinet Class II (<i>Thermo Electron Corporation</i>)
Agarosegel-Dokumentation	Gel Jet Imager (<i>Intas</i>)
Elektroporations-Pulser	Gene Pulser (<i>Bio-Rad</i>)
FPLC-System	ÄKTApurifier (<i>GE Healthcare</i>)
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 2-4 LD plus (<i>Christ</i>)
Homogenisator (Zellaufschluss)	EmulsiFlex B15 (<i>Avestin</i>)
HPLC-MS	Exactive Orbitrap LC-MS (<i>Thermo Fisher Scientific</i>) Shimadzu HPLC, Command module CBM-20A, LCMS-2020 (<i>Shimadzu</i>)
HPLC (präparativ)	1100-Serie (<i>Agilent Technologies</i>)
Photometer	NanoPhotometer P330 (<i>Implen</i>)
Schüttelinkubator	Multitron 2 (<i>Infors</i>)
SDS-PAGE-Apparatur	Mini-PROTEAN 3-System (<i>Bio-Rad</i>)
Software	Clone Manager Professional 8 (<i>Scientific & Educational Software</i>) ChemBioDraw Ultra 13.0 (<i>CambridgeSoft</i>) Xcalibur 2.1 (<i>Thermo Scientific</i>) GraFit 7 (<i>Erithacus Software</i>) LabSolutions, Version 5.42 SP2 (<i>Shimadzu</i>)
SpeedVac	EZ-2 (<i>Genevac</i>)
Thermocycler	T-Gradient Thermoblock (<i>Biometra</i>)

Ultraschallgerät (Zellaufschluss)	Sonopuls HD 3200, KE76-Sonotrode (<i>Bandelin</i>)
Zentrifugen	Centrifuge 5417R (<i>Eppendorf</i>); Eppendorf 5810R (<i>Eppendorf</i>); Avanti J-26 XP Centrifuge (<i>Beckman Coulter</i>)
Zweistrahl-Spektrophotometer	Lambda 35 LS54 (<i>PerkinElmer</i>)

3.2 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2 aufgelistet. Wenn nicht anders angegeben wurden alle Enzyme und Kits von *Fermentas* bzw. *Thermo Fisher Scientific* erworben. Alle weiteren, hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in einer Reinheit $\geq 98\%$ oder p.a.-Qualität von den Firmen *Fisher*, *Fluka*, *Merck*, *Roth* oder *Sigma* bezogen.

Tabelle 2. Verwendete Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.

Produkte	Hersteller
Amicon Ultra Zentrifugen-Filtereinheiten	<i>Millipore</i>
Elektroporationsküvetten	<i>PEQLab</i>
Herculase II Fusion DNA Polymerase	<i>Agilent</i>
PageRuler Prestained Protein Ladder	<i>Fermentas/Thermo Fisher Scientific</i>
PageRuler Unstained Protein Ladder	<i>Fermentas/Thermo Fisher Scientific</i>
TriDye 2-log DNA Ladder	<i>New England Biolabs</i>

3.3 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen *biomers.net* und *Invitrogen* synthetisiert. Diese wurden nach Zentrifugation für 2 min bei 13.000 rpm in TE-Puffer (10 mM Tris-Base, 1 mM EDTA, in *ddH*₂O, pH 8) zu einer Endkonzentration von 100 μ M gelöst (700 rpm, 10 min, 50 °). Zur Verwendung für die PCR wurden diese Lösungen 1:5 mit *ddH*₂O verdünnt.

Tabelle 3. Verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz	Schnittstelle Cosmid ^[9]	
SkyRed			
SU45_Redfor	GGGTTGCATATGGGGCCGCAACCGGTC	NdeI	1J22
SU47_Red24rev	GCGCACAAAGCTTCAGCCCGTCGGTGCCAG	HindIII	
SkyMono			
SU43_Monofor	CACCATATGGATTTCGGCC	NdeI	1J22
SU48_Mono28rev	CGATAAGCTTCACCGGCCCTGCTCG	HindIII	

P450_{skv}			
SU49_cypfor	GGCGGACATATGACCGCG-CACACCCTG	NdeI	1J22
SU51_cyp28rev	CGGCCGGAATTCACGACCGCACCCCG	EcoRI	
PCP₅			
SU29_T5for	CTTATTAACCATGGCCTCCGGCCGCGCCCCGCGC	NcoI	6D08
SU30_T5rev	GTATTAGCGGCCGCGGTGGTGTGAGCTGCTGGG	NotI	
PCP₇			
SU31_T7for	CCAATACCATGGGCCCCGACGGCCGCGAGCCGCGC	NcoI	1P24
SU32_T7rev	CATTAAGCGGCCGCCCCGCGATCAGTACGGCGAG	NotI	
PCP₁₀			
SU33_T10for	GTTCACCATGGCGAAGGACAGCCGCGCCGCGG	NcoI	1P24
SU34_T10rev	GTGGACGGATCCCCGCGACGCGGGCGGCCGCC	BamHI	
PCP₁₁			
SU35_T11for	CGGACTCCATGGCCACGGCCTGGACGGGACCG	NcoI	1J22
SU36_T11rev	CTATTGCGGCCGCGTTCGCGAGCTGACCGACC	NotI	
mutPCP₅			
SU52_mufT5for	CGCGCCCCGCGCACCGAGACGGAGGAGATCCTGCGGGGCTGTTCGCCG		
SU53_mufT5rev	CGGCGAACAGCCCGCGCAGGATCTCCTCCGTCTCGGTGCGCGGGGCGCG		
mutPCP₁₁			
SU54_mufT11for	GGACGGGACCGCGTACAGAGACGGAGGAGATCCTCCGCGCGCTGTTCGCCG		
SU55_mufT11rev	CGGCGAACAGCGCGCGGAGGATCTCCTCCGTCTCTGTACGCGGTCCCGTCC		

3.4 Vektoren

Alle verwendeten Vektoren (s. Tabelle 4) wurden sowohl zum Klonieren als auch zur Proteinexpression genutzt.

Tabelle 4. Verwendete Vektoren.

Vektor	Eigenschaften	Referenz
pET24a(+)	T7-Expressionsvektor mit C-terminalem His ₆ -Tag für <i>E. coli</i>	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt
pET28a(+)	T7-Expressionsvektor mit N-terminalem His ₆ -Tag für <i>E. coli</i>	Novagen, Merck KGaA, Darmstadt
pET28_TEV	s. pET28a(+), mit eingefügter TEV-Schnittstelle zwischen N-terminalem His ₆ -Tag und Insert	Martin Bommer, HU Berlin
pETtrx_1b	T7-Expressionsvektor mit löslichkeitsförderndem N-terminalem Thioredoxin- und His ₆ -Tag und optionalem C-terminalem His ₆ -Tag	Bogomolovas <i>et al.</i> ^[79]
pETtrx_1c	T7-Expressionsvektor mit löslichkeitsförderndem N-terminalem Thioredoxin-Tag und C-terminalem His ₆ -Tag	Cryle <i>et al.</i> ^[41]

3.5 Mikroorganismen

Der Stamm *E. coli* DH5 α wurde zum Klonieren, der Stamm *E. coli* BL21 (DE3) dagegen zur Proteinexpression genutzt. *E. coli* BL21gold (DE3) wurde sowohl zum Klonieren als auch zur Proteinexpression verwendet.

Tabelle 5. Verwendete Mikroorganismen.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	F- Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen (heute: <i>Life Technologies</i>)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-, mB-) <i>gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen (heute: <i>Life Technologies</i>)
<i>E. coli</i> BL21gold (DE3)	F- <i>ompT hsdS</i> (rB- mB-) <i>dcm+</i> Tetr <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA Hte</i>	Stratagene (heute: <i>Agilent</i>)

3.6 Kulturmedien

Für Übernachtkulturen wurde LB-Medium verwendet, Proteinexpressionen wurden in TB-Medium durchgeführt. Alle Medien wurden vor der Verwendung bei 121 °C und 2 bar für 20 min autoklaviert.

LB-Flüssigmedium^[80]

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
mit dH₂O auf 1 L aufgefüllt.

LB-Festmedium^[80]

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
1,5% Agar
mit dH₂O auf 1 L aufgefüllt.

TB-Flüssigmedium^[80]

12 g Trypton
24 g Hefeextrakt
5,7 g Glycerin, 86%
mit dH₂O auf 900 mL aufgefüllt, vor Verwendung 100 mL 10x-TB-Phosphatpuffer hinzugefügt.

10x-TB-Phosphat-Puffer^[80]

23,1 g KH₂PO₄ (Endkonzentration: 0,17 M)
164,3 g K₂HPO₄ x 3 H₂O (Endkonzentration: 0,72 M)
mit dH₂O auf 1 L aufgefüllt.

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen Methoden sind zum großen Teil etabliert und in Standardwerken beschrieben.^[80] Wenn nicht anders angegeben, wurden Enzyme und Kits nach Herstellerangaben verwendet. Zur Amplifizierung von DNA wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Für präparative Zwecke (Klonierungen) wurde die Herculase II fusion DNA-Polymerase (*Agilent*) verwendet, für analytische Zwecke (Kolonie-PCR) die Taq-Polymerase, die im Arbeitskreis selber aufgereinigt wurde.^[8] Zum Restriktionsverdau wurden Enzyme der Firma *Fermentas/Thermo Fisher Scientific* verwendet. Agarosegele bestanden aus 0,5 - 2% Agarose in TAE-Puffer, zum Anfärben der DNA wurde den Gelen vor dem Lauf der Farbstoff Stain G (*Serva*) oder Midori Green (Nippon Genetics) nach Herstellerangaben zugefügt. Als Marker diente TriDye 2-Log DNA Ladder (*New England Biolabs*). DNA-Fragmente wurden entweder aus Lösung (GeneJET PCR Purification Kit, *Fermentas/Thermo Fisher Scientific*) oder über Gel-Extraktion (GeneJET Gel Extraction Kit, *Fermentas/Thermo Fisher Scientific*) aufgereinigt. Die Ligation der Fragmente erfolgte mit der T4 DNA Ligase (*Fermentas/Thermo Fisher Scientific*).

4.1.1 Konstruktion der Plasmide

4.1.1.1 Konstrukte zur Untersuchung der α -Hydroxylierung von Skyllamycin

Konstruktion von pET28a(+)-Red und pET24a(+)-Mono

Diese Konstrukte wurden von *Dr. Stefan Poble* hergestellt und lagen bereits vor.^[8]

Konstruktion von pET28 TEV-Red

Mit den synthetischen Oligonukleotiden SU45_Redfor und SU_47Red28rev (s. Tabelle 3) wurde das Gen für die Flavin-Reduktase (*sky40*) mittels PCR ausgehend von Cosmid 1J22^[8] amplifiziert.

Nach Aufreinigung und Restriktionsverdau mit NdeI und HindIII wurde das Insert mit dem entsprechend geschnittenen und dephosphorylierten (Antarktische Phosphatase, *New England Biolabs*) Vektor pET28_TEV^[81] ligiert und damit *E. coli* BL21 gold (DE3) transformiert.

Konstruktion von pET28 TEV-Mono

Mit den synthetischen Oligonukleotiden SU43_Monofor und SU_48Mono28rev (s. Tabelle 3) wurde das Gen für die Flavin-Monooxygenase (*skj39*) mittels PCR ausgehend von Cosmid 1J22^[8] amplifiziert. Nach Aufreinigung und Restriktionsverdau mit NdeI und HindIII wurde das Insert mit dem entsprechend geschnittenen und dephosphorylierten (Antarktische Phosphatase, *New England Biolabs*) Vektor pET28_TEV^[81] ligiert und damit *E. coli* BL21 gold (DE3) transformiert.

4.1.1.2 Konstrukte zur Untersuchung der β -Hydroxylierungen von Skyllamycin

Konstruktion von pET28a(+)-cyp

Mit den synthetischen Oligonukleotiden SU49_cypfor und SU_51cyp28rev (s. Tabelle 3) wurde das Gen für die Cytochrom P450-Monooxygenase (*skj32*) per PCR ausgehend von Cosmid 1J22^[8] amplifiziert. Nach Aufreinigung und Restriktionsverdau mit NdeI und EcoRI wurde das Insert mit dem entsprechend geschnittenen Vektor pET28a(+) ligiert und damit *E. coli* BL21 gold (DE3) transformiert.

Konstruktion von pET28a(+)-PCP(5, 7, 10 bzw. 11)

Die Bereiche der PCP-Domänen wurden mit Hilfe von Sequenzvergleichen^[82], Sekundärstrukturvorhersagen^[83] und veröffentlichten Erfahrungswerten^[84] bestimmt und somit die Primer konzipiert. Mit diesen synthetischen Oligonukleotiden (SU29-SU36, s. Tabelle 3) wurden die Gene der PCP-Domänen 5, 7, 10 und 11 mittels PCR ausgehend von den Cosmiden 6D08, 1P24 und 1J22^[8] amplifiziert. Nach Aufreinigung und Restriktionsverdau mit NcoI und NotI (BamHI für PCP₁₀) wurden diese Gene mit dem entsprechend geschnittenen Vektor pET28a(+) ligiert und damit *E. coli* BL21 gold (DE3) transformiert.

Klonierung der PCP-Domänen 5, 7, 10 bzw. 11 in eine Vektorserie mit verschiedenen löslichkeitsfördernden Tags^[41,79]

Die verwendeten Vektoren waren pETGB_1a, pETGST_1a, pETtrx_1b, pET'Z2_1a, pET'ZZ_1a^[79] und pETtrx_1c^[41]. Mit den synthetischen Oligonukleotiden SU29_T5for bis SU36_T11rev (s. Tabelle 3) wurden die Gene für die PCP-Domänen 5, 7, 10 und 11 mittels PCR ausgehend von den Cosmiden 6D08, 1P24 und 1J22^[8] amplifiziert. Nach Aufreinigung und

Restriktionsverdau mit NcoI und NotI (BamHI für PCP₁₀) wurden die Gene mit den entsprechend geschnittenen Vektoren ligiert und damit *E. coli* BL21 gold (DE3) transformiert.

Konstruktion von pETtrx_1c-mutPCP₅ und pETtrx_1c-mutPCP₁₁ durch ortsspezifische Mutagenese

Mit den Konstrukten pETtrx_1c-PCP₅ und pETtrx_1c-PCP₁₁ und den synthetischen Oligonucleotiden SU52_mutT5for/SU53_mutT5rev bzw. SU54_mutT11for/SU55_mutT11rev wurde eine PCR mit den unten genannten Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurde die Q5™ High-Fidelity DNA Polymerase (*New England Biolabs*) verwendet. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt (GeneJET PCR Purification Kit, *Fermentas/Thermo Fisher Scientific*), in 30 µL ddH₂O eluiert und mit DpnI verdaut, um die methylierte Matrizen-DNA zu hydrolysieren. Nach Inaktivierung des von DpnI (80 °C, 20 min) wurde *E. coli* BL21 gold (DE3) mit dieser DNA transformiert. Die Mutagenese wurde durch Sequenzierung überprüft (s. Abschnitt 4.1.5).

Zusammensetzung der Reaktionslösung (50 µL)	PCR-Programm
33 µL ddH ₂ O	(1) 98 °C, 3:00 min
10 µL 5x Reaction Buffer	(2) 98 °C, 0:10 min
1 µL dNTPs, je 10 mM	(3) 55 °C, 0:20 min
1 µL Matrizen-DNA (~30 ng)	(4) 72 °C, 5:00 min → (2), 19x
2,5 µL Primer A (20 µM)	(5) 72 °C, 10 min
2,5 µL Primer B (20 µM)	(6) 4 °C, END
0,5 µL Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	

4.1.2 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*

Für Übernachtskulturen wurden die entsprechenden *E. coli*-Stämme bzw. –Klone in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 37 °C und 200 rpm angezogen. Expressionen wurden in TB-Medium durchgeführt (s. Abschnitt 3.6 und 4.2.1). Zur Konservierung wurden 950 µL einer LB-Übernachtskultur in einem Kryo-Schraubdeckelgefäß (*Sarstedt*) mit 950 µL 7%-iger sterilfiltrierter DMSO-Lösung vermischt und sofort bei -80 °C eingefroren und gelagert.

4.1.3 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter der Clean Bench und auf Eis. Es wurden 200 mL einer *E. coli*-Kultur in LB-Medium bei einer OD₆₀₀ von ~0,5 auf Eis schnell abgekühlt und für 30 min inkubiert. Das Pellet wurde abzentrifugiert (3.000 g, 10 min, 4 °C) und drei bis vier Mal mit 50 mL eiskalter, steriler Glycerinlösung (10%) gewaschen. Das Pellet wurde in 1-2 mL 10% Glycerin

resuspendiert, zu 50 μL aliquotiert und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ oder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte in Kryo-Schraubdeckelröhrchen (*Sarstedt*) bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

Für die Transformation wurde ein Aliquot elektrokompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1-5 μL DNA vermischt und in vorgekühlte 2 mm-Elektroporationsküvetten (*PEQLab*) gegeben. Die Elektroporation wurde bei 200 Ω , 2,5 kV und 25 μF durchgeführt. Anschließend wurde sofort 500 μL LB-Medium hinzugegeben und 30-60 min bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Zellen wurden auf LB-Festmedium mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert.

4.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde diese mit einem Kit (GeneJET Plasmid Miniprep Kit, *Fermentas/Thermo Fisher Scientific*) isoliert. Zu Klonierungszwecken wurde die sogenannte Kochende Lyse (*boiling lysis*) verwendet.^[80] Dazu wurden 1,5 mL einer Übernachtskultur in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß für 1 min bei 20.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 350 μL STET-Puffer resuspendiert und 25 μL Lysozym-Lösung hinzugegeben. Nach gründlichem Mischen auf dem Vortexer wurde für 1 min ein Hitzeschock bei $99\text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt und anschließend erneut bei 10 min bei 20.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und die Lösung mit 35 μL 3 M NaOAc (pH 5) und 450 μL Isopropanol versetzt. Nach Zentrifugation (10 min, 20.000 g) wurde der Überstand entfernt und der Rückstand mit 500 μL 70% Ethanol gewaschen (5 min, 20.000 g). Der Überstand wurde verworfen und der die DNA enthaltende Rückstand 15-20 min bei RT zum Trocknen stehen gelassen. Anschließend wurde die DNA in 100 μL TE-Puffer mit 20 mg/mL RNase A gelöst (20 min, $55\text{ }^\circ\text{C}$, 500 rpm). Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Lysozym-Lösung

10 mg/mL Lysozym
10 mM Tris-HCl, pH 8
in *ddH*₂O

STET-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 8
50 mM EDTA
8% (w/v) Saccharose
5% (w/v) Triton X-100
in *ddH*₂O

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,9
1 mM EDTA
in *ddH*₂O

4.1.5 Konzentrationsbestimmung und Sequenzierung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte über die Absorption bei 260 nm mit Hilfe eines Kleinstvolumen-Spektrophotometers (NanoPhotometer P330, *Implen*).

Die Plasmide, die für die Expression der in dieser Arbeit untersuchten Enzyme verwendet wurden, wurden auf korrekte Basenabfolge überprüft. Die DNA-Sequenzierung wurde bei den Firmen *LGC Genomics* oder *Eurofins MWG Operon* in Auftrag gegeben. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit den Programmen Chromas 1.55 (*Technelysium Pty Ltd*) und Clone Manager Professional 8 (*Scientific & Educational*).

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 Genexpression

Als Expressionsstamm wurde *E. coli* BL21gold (DE3) genutzt. Die Genexpression erfolgte durch Autoinduktion^[85] in 1-2 L Gesamtvolumen in 2-4 x 500 mL TB-Medium in 2 L-Kolben. Steriles TB-Medium wurde mit 0,5% Glycerin, 0,05% Glucose, 0,2% Lactose, TB-Phosphatpuffer und 50 µg/mL Kanamycin versetzt und 2-3 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde bei 18-20 °C und 180-200 rpm für 16-20 h exprimiert. Bei der Expression von P450_{sky} wurden dem Expressionsmedium 0,5 mM δ-Aminolävulinsäure als Häm-Vorläufer hinzugefügt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (9000 g, 15 min, 4 °C) und bei -20 °C eingefroren.

4.2.2 Zellaufschluss

Die nach der Genexpression eingefrorenen Zellen wurden aufgetaut, in Aufschlusspuffer resuspendiert und homogenisiert (EmulsiFlex B15, *Avestin*) oder sonifiziert (Sonopuls HD 3200, *Bandelin*). Für die Homogenisierung wurden 3,5 bar Air Pressure und 6 bar Valve Pressure angelegt; es wurden 1-3 Durchgänge gemacht. Die Sonifizierung erfolgte mit einer KE76-Sonotrode für 6 min bei 68% Amplitude (1,5 s Puls, 3 s Pause).

Nach dem Aufschluss wurde mit Aufschlusspuffer auf etwa 10 mL pro Gramm Zellpellet aufgefüllt und die Zelltrümmer abzentrifugiert (50 000 g, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde für die chromatographische Aufreinigung verwendet.

Aufschlusspuffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.4

300 mM NaCl

5% (v/v) Glycerin

10 mM Imidazol

5 mM Glutathion (reduzierte Form)

4.2.3 Chromatographische Methoden zur Proteinaufreinigung

Sämtliche chromatographische Aufreinigungen wurden mit einem ÄKTA Purifier FPLC-System (*GE Healthcare*) bei 4 °C durchgeführt. Die verwendeten Puffer wurden vorgekühlt. Die für die einzelnen Proteine verwendeten Chromatographiearten sind in Tabelle 6 dargestellt und werden weiter unten detailliert ausgeführt.

Tabelle 6. Die für die einzelnen Proteine verwendeten Chromatographiearten.

Protein	Affinitäts- chromatographie	Entsalzung	Größenausschluss- chromatographie	Anionenaustausch- chromatographie
SkyRed (Sky40)	X		X	
SkyMono (Sky39)	X		X	
TEV-Protease ^[86]	X	X		
P450_{sky} (Sky32)	X			X
PCP-Domänen	X	X	X	
Sfp ^[87]	X			

Die Reduktase SkyRed (Sky40) wurde in verschiedenen Formen aufgereinigt. Ohne Zugabe von Flavin-Cofaktor war der Anteil an Holoenzym sehr gering (Flavingehalt ca. 25-30%). Zur Aufreinigung von Holoenzym wurden dem Aufschlusspuffer daher bis zu 500 µM FAD bzw. FMN zugegeben. Vor der Größenausschlusschromatographie wurde das Protein ebenfalls mit dem entsprechenden Flavin rekonstituiert. Zur Aufreinigung von *apo*-SkyRed wurde vor der Elution mit Waschpuffer einschließlich 4 M Harnstoff gewaschen.

4.2.3.1 Nickelchelate-Affinitätschromatographie

Als erster Aufreinigungsschritt wurde stets eine Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie mit einer 5 mL-HisTrap FF crude-Säule (*GE Healthcare*) durchgeführt. Dazu wurden maximal 500 mL des Zellysates mittels der eingebauten Probenpumpe auf die Säule aufgetragen. Diese wurde mit 2 Säulenvolumen (SV) Waschpuffer (Puffer A) und 6 SV Waschpuffer mit 4-6% Puffer B (entspricht 20-30 mM Imidazol) gewaschen, um unspezifisch gebundene Verbindungen von der Säulenmatrix zu entfernen. Anschließend wurde mit 5 SV bei 50% Puffer B (entspricht 250 mM Imidazol) eluiert und die Säule anschließend mit 3 SV 100% Puffer B und 5 SV 100% Puffer A gewaschen und regeneriert. Fraktionen mit Protein (Kontrolle mit UV-Detektion) wurden vereinigt und für den nächsten Aufreinigungsschritt verwendet.

Puffer A: Waschpuffer
50 mM Tris-HCl, pH 7.8
300 mM NaCl

Puffer B: Elutionspuffer
50 mM Tris-HCl, pH 7.8
300 mM NaCl
500 mM Imidazol

4.2.3.2 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie wurde zur Entsalzung und zur weiteren Aufreinigung von Proteinen anschließend an die Affinitätschromatographie verwendet. Die Entsalzung wurde mit einer auf Waschpuffer äquilibrierten HiPrep 26/10 Desalting-Säule (*GE Healthcare*) gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

Für die Gelfiltration zur Trennung von Proteinen wurde eine HiLoad 16/600 Superdex 75 prep grade-Säule (*GE Healthcare*) verwendet. Nach Affinitätschromatographie oder Entsalzung wurden Protein enthaltende Fraktionen vereinigt, auf 2-2,5 mL aufkonzentriert (Amicon Ultra Zentrifugen-Filtereinheiten, 15 mL, MWCO 10 kDa, *Millipore*) und mit einer 5 mL-Injektionsschleife auf die mit Gelfiltrationspuffer äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE-Analyse überprüft, entsprechend vereinigt und aufkonzentriert. Die Lagerung erfolgte in Aliquots zwischen 50-100 μ L bei -80 °C nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff.

Gelfiltrationspuffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.8
300 mM NaCl
5% (v/v) Glycerin
2 mM DTT (bei SkyRed und SkyMono-Aufreinigung)

4.2.3.3 Anionenaustauschchromatographie

Für die weitere Aufreinigung von P450_{sky} wurden die vereinigten Fraktionen nach der Affinitätschromatographie aufkonzentriert und auf Startpuffer umgepuffert. Nach Beladung auf eine ResourceQ-Säule (*GE Healthcare*) wurde mit einem Salzgradienten von 50 bis 1000 mM NaCl in 20 SV eluiert. P450_{sky} eluierte bei etwa 300 mM NaCl. Protein enthaltende Fraktionen wurden vereinigt und aufkonzentriert. Glycerin wurde zu einer Endkonzentration von 10% hinzugefügt, die Proben in Aliquots zwischen 50-100 μ L in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Startpuffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.8
50 mM NaCl

Endpuffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.8
1 M NaCl

4.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde in Vertikalgelkammern (*BioRad*) durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden die Proben mit dH_2O und Probenpuffer gemischt, 5 min bei 99 °C aufgeköcht und abzentrifugiert (5 min, 20.000 g, RT). Die genauen Mengen sind in

Tabelle 7 gezeigt. Je nach Größe des Proteins wurde ein 12 oder 15%iges Trenngel verwendet (s. Tabelle 8).

SDS-Probenpuffer	SDS-Laufpuffer
250 mM Tris-HCl, pH 6,8	25 mM Tris-Base
8% (w/v) SDS	190 mM Glycin
35% (v/v) Glycerin	0,1% (w/v) SDS
0,04% (w/v) Bromphenolblau	
10% (v/v) einer 1 M DTT-	
Vorratslösung frisch hinzufügen	

Tabelle 7. Probenvorbereitung für SDS-PAGE. V_{PP} – Volumen des Probenpuffers, V_{Gel} – auf SDS-Gel geladenes Probenvolumen, ÜS – Zellysat-Überstand nach Aufschluss und Zentrifugation, DF – Durchfluss nach Chromatographie, SS – Spatelspitze.

Probe	Probenmenge	V_{H_2O} / μL	V_{PP} / μL	V_{Gel} / μL
Expressionskultur	500 μL *	75	25	3-5
Pellet n. Aufschluss	1 SS	150	50	3-5
ÜS und DF	20 μL	40	15	10
Fraktionen	20 μL	-	5	10

*verwendet wurden die abzentrifugierten Zellen aus 500 μL Expressionskultur.

Tabelle 8. Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele.

	Sammelgel, 4%	Trenngel, 12%	Trenngel, 15%
dH_2O	1,4 mL	1,7 mL	1,2 mL
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	-	1,25 mL	1,25 mL
0,25 M Tris-HCl, pH 6,8	625 μL	-	-
Acrylamid ¹	330 μL	2 mL	2,5 mL
Bromphenolblau-Lsg. ²	50 μL	-	-
SDS-Lösung, 10%	25 μL	50 μL	50 μL
APS-Lösung, 100 mg/mL	12,5 μL	25 μL	25 μL
TEMED	6,25 μL	12,5 μL	12,5 μL

¹ Rotiphorese Gel 30 (37,5:1), 30%ige Lösung aus Acrylamid und N,N' -Methylenbisacrylamid

² Bromphenolblau-Lösung: 0,1% in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0

Als Marker dienten 10 μL PageRuler Unstained oder 5 μL PageRuler Prestained (*Fermentas/Thermo Fisher Scientific*). Die Gele wurden 15 min bei 20 mA (pro Sammelgel) und anschließend 40 mA (pro Trenngel) gefahren. Zum Färben der Proteinbanden wurden die Gele mit Färbelösung bedeckt, etwa 1 min in der Mikrowelle aufgeköcht und 5-15 min bei RT geschwenkt.

Überschüssiger Farbstoff wurde mit Hilfe von Wasser und der Entfärbelösung (1 min aufkochen, 30 min schwenken) entfernt.

Färbelösung

50% (v/v) Ethanol
 10% (v/v) Essigsäure
 250 mg/L Coomassie Brilliant Blue R-250
 250 mg/L Coomassie Brilliant Blue G-250

Entfärbelösung

10% (v/v) Ethanol
 10% (v/v) Essigsäure

4.2.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration der aufgereinigten Proteine wurde mit der Methode nach Bradford^[88] oder, in den meisten Fällen, über die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm mit Hilfe eines Kleinstvolumen-Spektrophotometers (NanoPhotometer P330, *Implen*). Die Konzentration wurde dann über den anhand der Sequenz berechneten Extinktionskoeffizienten^[89,90] ermittelt.

Für die Konzentrationsbestimmung von SkyRed wurde die Methode nach Bradford verwendet oder die Absorptionen bei 280 und 457 nm bestimmt. Da der Flavin-Cofaktor auch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm absorbiert, würde eine reine Bestimmung nur über diese Absorptionswellenlänge zu ungenau sein. Daher wurden die Extinktionskoeffizienten des gebundenen Flavins berechnet. Dafür wurde ein Absorptionsspektrum von SkyRed aufgenommen und die Enzymlösung anschließend mit 0,2% SDS versetzt. Nach 5-10 min ist das Protein denaturiert und es konnte das Absorptionsspektrum des nun ungebundenen Flavins gemessen werden (s. Abbildung 14). Das nun leicht verschobene Absorptionsmaximum liefert zusätzlich einen Hin-

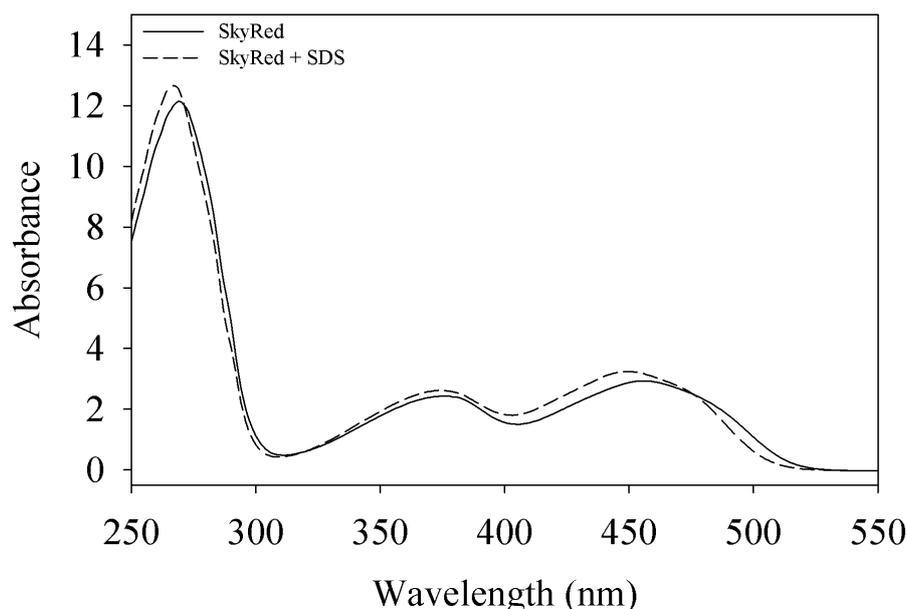


Abbildung 14. Absorptionsspektrum von SkyRed und des freien Cofaktors nach Zugabe von SDS. Die Zugabe von SDS führt zur Denaturierung des Enzyms und somit zur Freisetzung des Cofaktors. Das Absorptionsmaximum von 450 nm stimmt mit dem von FAD überein ($\lambda_{\max}(\text{FMN}) = 445$ nm) (Abbildung von Dr. Tobias Werther, AK Dobbek, HU Berlin).

weis auf die Natur des Flavins ($\lambda_{\max, \text{FAD}} = 450 \text{ nm}$, $\lambda_{\max, \text{FMN}} = 446 \text{ nm}$). Anhand der aus der Literatur bekannten Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{\text{FAD}, 450} = 11\,300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{\text{FMN}, 446} = 12\,200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) konnte nun die Konzentration an freiem Flavin und damit die Konzentration an Holo-Protein berechnet werden. Daraus und anhand der Absorptionen bei $\lambda = 457$ bzw. 280 nm des ersten Spektrums wurden die Extinktionskoeffizienten des gebundenen Flavins bei $\lambda = 457$ bzw. 280 nm berechnet.^[91]

4.3 Biochemische und analytische Methoden

4.3.1 Spektroskopische Untersuchungen von SkyRed und SkyMono

Die spektroskopischen und initialen kinetischen Untersuchungen von SkyRed (Sky40) und SkyMono (Sky39) wurden in Kooperation mit Dr. Tobias Werther von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Holger Dobbek (Humboldt-Universität zu Berlin, Abteilung Strukturbiologie/Biochemie) durchgeführt.

Die spektroskopischen Messungen wurden an einem Infinite 200 Pro (*Tecan*) oder einem 8453 UV-Vis-Spektrophotometer (*Agilent*) mit einer verschließbaren Küvette (117.104-QS, *Hellma Analytics*) durchgeführt. Die Anaerobisierung der Proben erfolgte durch Begasung mit Stickstoff für 5-10 min. Die Reaktionen wurden durch Zugabe des Enzyms (in aerobem Puffer) gestartet.

4.3.2 Bestimmung des Flavin-Cofaktors

Eine Probe der aufgereinigten Reduktase wurde für 10 min bei $100 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt. Das denaturierte Enzym wurde abzentrifugiert und der ÜS mit LC-MS (Exactive Orbitrap, *Thermo Fisher Scientific*) untersucht. Für die Bestimmung der Bindungsaffinitäten von FMN bzw. FAD zu SkyRed wurde die Isotherme Kalorimetrie (ITC) verwendet (s. Abschnitt 4.3.3).

4.3.3 Isotherme Kalorimetrie (ITC)

Die isotherme Kalorimetrie wurde von Dr. Tobias Werther aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Holger Dobbek (Humboldt-Universität zu Berlin, Abteilung Strukturbiologie/Biochemie) durchgeführt.

Mit Hilfe isothermaler Titrationskalorimetrie wurde die Bindung von FMN bzw. FAD an das Reduktase-Apoenzym (*apo-SkyRed*), sowie die Bindung von reduziertem FAD an die Monooxygenase SkyMono untersucht. Die Experimente wurden mit einem VP-ITC Mikrokalorimeter (*GE Healthcare*) durchgeführt, welches sich innerhalb einer Glovebox (*MBraun*, Garching) unter Stickstoffatmosphäre (Sauerstoffkonzentration <0,5 ppm) befand. Die Messungen wurden bei 25 °C in 50 mM MOPS/NaOH, pH 7,2, 150 mM NaCl durchgeführt. Im Falle der Bindung des reduzierten Cofaktors FADH₂ wurde dem Puffer zusätzlich 5 mM Dithionit zugegeben. Die Analyse der Daten erfolgte mit der vom Gerätehersteller zur Verfügung gestellten Software.

4.3.4 Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse

Die Kristallisation der Proteine SkyRed (Sky40) und SkyMono (Sky39) wurde in Kooperation mit Dr. Tobias Werther von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Holger Dobbek (Humboldt-Universität zu Berlin, Abteilung Strukturbiologie/Biochemie) durchgeführt.

Initiale Kristallisationsexperimente wurden nach der Methode der Gasphasendiffusion im sitzenden Tropfen (400 nL + 400 nL) im 96-Well-Format (MRC Kristallisationsplatten, *Molecular Dimensions Limited*, Newmarket, GB) unter Verwendung eines Pipettierroboters (Honeybee 961, *Digilab*, Marlborough, USA) durchgeführt. Für die Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen wurden kommerziell erhältliche Kristallisations-Screens verwendet (80 µl pro Well, JCSG-Plus, STRUCTURE I/II, MIDAS, MORPHEUS - Molecular dimensions; PEG-PGA, SILVER BULLETS - *Hampton Research*, Aliso Viejo, USA). Die Kristallisationsexperimente wurden bei verschiedenen Proteinkonzentrationen (10 mg/mL bzw. 50 mg/mL) bei einer konstanten Temperatur von 18 °C durchgeführt. Die Verfeinerung von Kristallisationsbedingungen erfolgte nach der Methode der Gasphasendiffusion im hängenden Tropfen im 24-Well-Format (24 Loch-Zellkulturplatten, *Greiner Bio-One*, Frickenhausen). Dazu wurde gereinigtes Enzym mittels Vivaspin Zentrifugalkonzentratoren in 10 mM Tris-HCl pH 8,0 umgepuffert. Die Reservoirs enthielten 500 µL Reservoirlösung und wurden nach dem Pipettieren der Tropfen (2 µL Reservoir + 2 µL Proteinlösung) auf silanisierter Deckgläser unter Verwendung von Silikonfett (*Rotisol*, *Carl Roth GmbH*, Karlsruhe) luftdicht verschlossen. Die für die Datensammlung verwendeten Einkristalle wuchsen nach 1 bis 2 Wochen bei 18 °C unter den folgenden Bedingungen: 2,5% PEG3350, 15% Isopropanol, 2 M Natriumformiat, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5 (SkyRed) bzw. 31% Pentaerythritoläthoxylat (15/4 EO/OH), 100 mM Tris-HCl pH 8, 0,1 M Magnesiumformiat (SkyMono). Um Strahlenschäden zu vermeiden, erfolgte die Datensammlung im gefrorenen Zu-

stand bei 100 K. Aufgrund der vorliegenden Kristallisationsbedingungen war kein zusätzliches Kryoprotektant nötig. Die Kristalle wurden somit aus der Reservoirlösung entnommen und unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Datensammlung erfolgte an der Beamline BL 14.2 betrieben durch das Joint Berlin MX-Laboratory am BESSY II-Elektronenspeicherring (Berlin-Adlershof) bei einer Wellenlänge von 0,91841 Å.^[92] Die Prozessierung und Skalierung der Daten erfolgte mit dem Programm XDS.^[93] Die Bestimmung eines initialen Phasensatzes für Sky-Red erfolgte durch molekularen Ersatz (*molecular replacement*) mit dem Programm PHASER.^[94] Als Suchmodell diente die „*flavin reductase like domain*“ einer hypothetischen Oxidoreduktase aus *Rhizobium meliloti* (PDB-ID: 3RH7). Mehrere Verfeinerungszyklen mit dem Programm PHENIX.REFINE^[95] und die manuelle Modellierung mit dem Programm COOT^[96] wurden durchgeführt, bis der freie R-Faktor und der kristallographische R-Faktor konvergierten.

4.3.5 Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

Die Röntgenkleinwinkelstreuexperimente wurde von Dr. Tobias Werther von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Holger Dobbek (Humboldt-Universität zu Berlin, Abteilung Strukturbiologie/Biochemie) durchgeführt.

Mit Hilfe von Röntgenkleinwinkelstreuexperimenten (SAXS) kann die Molekülmasse gelöster Partikel und dessen Streumassenradius (Gyrationsradius, R_G), d.h. der mittlere Abstand der Streuzentren in einem Partikel, bestimmt werden. Außerdem ist es möglich *ab initio* die Proteinform mit niedriger Auflösung zu modellieren. Für weitere Informationen über die Methode sei auf entsprechende Übersichtsartikel verwiesen.^[97-99] Die Experimente wurden an der *Beamline* P12 des *European Molecular Biology Laboratory* am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Hamburg durchgeführt. Der P12-Messplatz war mit einem Pilatus 2M Detektor (*Dectris*, Baden) ausgestattet. Die Kameralänge betrug 3,1 m und Messungen wurde bei 25 °C in 50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl. Die experimentellen Daten für die Streukurven und Abstandsverteilungen von SkyRed und SkyMono wurden mit dem Programm GNOM angepasst.^[100] Die Berechnung der Molekülmassen erfolgte mit dem Programm SAXSMOW.^[101] Die Überlagerung der Kristallstruktur einer Monooxygenase aus *Agrobacterium tumefaciens* (PDB-ID: 2I7G) mit einen *low-resolution model* von SkyMono wurde mit dem Programm GASBOR aus der entsprechenden Streukurve berechnet.^[102]

4.3.6 Beladungsreaktion mit Sfp

Zur Beladung der PCP-Domänen wurden 100 μM der aufgereinigten Apo-PCP-Domäne mit 150 μM Aminoacyl-CoA, 0,5 μM Sfp oder R4-4-Sfp^[87] und 10 mM MgCl_2 in 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 für 1 h bei RT (Sfp) bzw. 10 min bei 37 °C (R4-4Sfp) inkubiert. Diese Lösung wurde entweder direkt für enzymatische Umsetzungen mit P450_{sky} benutzt (s. Abschnitt 4.3.8) oder aufkonzentriert und für Bindungsstudien verwendet (s. Abschnitt 4.3.7).

Um die Beladungseffizienz der verschiedenen PCP-Domänen zu ermitteln, wurden diese jeweils mit Phe-CoA beladen und die Reaktionslösung mit einer illustra NAP-5-Säule (*GE Healthcare*) aufgereinigt, um nicht reagiertes Phe-CoA abzutrennen. Der durch reduktive Spaltung mit NaBH_4 erhaltene Aminoalkohol (Phenylalaninol) wurde mittels LC-MS-Analytik durch Vergleich mit der Positivkontrolle (100 μM Phe-CoA) und internem Standard (4-Fluorophenylalanin) quantifiziert (s. Abschnitt 4.3.8).

4.3.7 Bindungsstudien mit P450_{sky}

Die Probe der Beladungsreaktion wurde in Bindepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 50 mM NaCl) umgepuffert und bis zu einer Konzentration von 1-2 mM PCP aufkonzentriert (Amicon Ultra Zentrifugen-Filtereinheiten, 0,5 mL, MWCO 3 kDa, *Millipore*). Die Bindungsstudien wurden an einem PerkinElmer Lambda 35 LS 54-Zweistrahl-Spektrophotometer durchgeführt. Die beladenen Holo-PCP-Domänen wurden in kleinen Aliquots (1-5 μL) zu P450_{sky} (auf 3 μM mit Bindepuffer verdünnt) titriert. Der Wechsel des Spin-Zustandes des Häm-Eisens wurde anhand der Änderung des Absorptionsmaximums von $\lambda = 419$ zu 392 nm verfolgt. Die Daten wurden mit Hilfe des Programms GraFit 7 (*Eritacus Software*) „gefittet“. Für eine Single site-Bindung gilt:

$$[\text{gebundener Ligand}] = \frac{\text{Kapazität} \cdot [\text{freier Ligand}]}{K_d + [\text{freier Ligand}]} \quad (1)$$

Für eine kooperative Bindung gilt:

$$y = \frac{[\text{Ligand}]^n \cdot \text{Kapazität}}{K_d + [\text{Ligand}]^n} \quad (2)$$

Hierbei ist y der Anteil an Ligand mit besetzten Bindungszentren, n der Hill-Koeffizient und K_d die Ligandenkonzentration, die benötigt wird, um die Hälfte der Bindungszentren zu besetzen.

Für die Berechnung der prozentualen Änderung des Spin-Zustandes wurde anhand der Absorption bei $\lambda = 417$ nm und der Absorptionskoeffizienten von $P450_{cam}^{[103,104]}$ und $P450_{terp}^{[105]}$ die Konzentration von $P450_{sky}$ ohne Substrat berechnet. Analog dazu wurde die Konzentration von $P450_{sky}$ mit gebundenem Substrat nach der Titration anhand der Absorption bei $\lambda = 392$ nm berechnet. Die Änderung der Konzentrationen in Prozent entspricht der prozentualen Änderung des Spin-Zustands des Häm-Eisens.

4.3.8 Hydroxylierungsassay mit $P450_{sky}$

Als Redoxpartner-System wurde Putidaredoxin/Putidaredoxin-Reduktase (Pdx/PdR) von $P450_{cam}$ (CYP101A1) verwendet.^[106] Die Proteine wurden von Dr. Max Cryle (MPI für medizinische Forschung, Heidelberg) nach einem veröffentlichten Protokoll aufgereinigt.^[106] Alle Assays wurden in Triplikaten ausgeführt, Kontrollreaktionen wurden in Abwesenheit von $P450_{sky}$ bzw. von NADH durchgeführt. Zur Reaktionslösung der PCP-Beladung (s. Abschnitt 4.3.6) wurden $1 \mu\text{M}$ PdR, $5 \mu\text{M}$ Pdx, 1 mM NADH, $2 \mu\text{M}$ $P450_{sky}$ und $20 \mu\text{M}$ L-4-Fluorophenylalanin als interner Standard hinzugefügt. Nach Inkubation bei 30°C für 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe einer Spatelspitze NaBH_4 gestoppt und 15 min bei 37°C inkubiert.^[107] Entstehender Schaum wurde abzentrifugiert. Ameisensäure wurde mit einer Endkonzentration von 10% hinzugefügt und nach Zentrifugation ($13\,000 \text{ g}$, 2 min) wurden die Proben einer LC-MS-Analyse unterzogen. Die relevanten Molekülmassen wurden mittels *Single Ion Monitoring* im Positivionenmodus detektiert. Für die LC-MS-Analytik wurden folgende Bedingungen verwendet: HPLC-Massenspektrometer: Shimadzu HPLC, Command module CBM-20A, LCMS-2020. Säule: X-Bridge BEH300- C_{18} -Säule (Waters Corporation, $250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ Durchmesser, $5 \mu\text{m}$ Partikelgröße. Flussrate: $0,5 \text{ mL/min}$. HPLC-Programm (Gradient 1, alle außer Leu/Tyr): 5% (v/v) MeCN in H_2O (0,1% Ameisensäure) für 4 min isokratisch, Anstieg auf 55% (v/v) MeCN in H_2O (0,1% Ameisensäure) in 21 min mit anschließendem Halten auf 100% MeCN (0,1% Ameisensäure). HPLC-Programm (Gradient 2, Leu/Tyr): 2% (v/v) MeCN in H_2O (0,1% Ameisensäure) isokratisch für 6 min, Anstieg auf 55% (v/v) MeCN (0,1% Ameisensäure) in 21 min mit anschließendem Halten auf 100% MeCN (0,1% Ameisensäure).

Tabelle 9. Molekülmassen und Retentionszeiten der Produkte der Hydroxylierungsassays. RT – Retentionszeit, n.d. – nicht detektiert.

Nr.	Stoff	[M+H]⁺ (<i>m/z</i>)	RT (min)	Gradient
1	4-Fluorophenylalanin (interner Standard)	184	14,91	1
1	4-Fluorophenylalanin (interner Standard)	184	18,06	2
2a	Phenylalanin	166	13,58	1
2b	β-OH-Phenylalanin	182	8,65	1
2c	Phenylalaninol	152	15,30	1
2d	β-OH-Phenylalaninol	168	11,44	1
3a	(OMe)Tyrosin	196	15,48	1
3b	β-OH-(OMe)Tyrosin	212	7,97	1
3c	(OMe)Tyrosinol	182	16,46	1
3d	β-OH-(OMe)Tyrosinol	198	13,23	1
4a	Leucin	132	12,94	2
4b	β-OH-Leucin	148	n.d.	2
4c	Leucinol	118	16,00	2
4d	β-OH-Leucinol	134	10,17	2
5a	Tyrosin	182	11,78	2
5b	β-OH-Tyrosin	198	n.d.	2
5c	Tyrosinol	168	13,43	2
5d	β-OH-Tyrosinol	184	9,93	2
6a	Tryptophan	205	16,6/17,9	1
6b	β-OH-Tryptophan	207	15,0/13,4	1
6c	Tryptophanol	191	17,37	1
6d	β-OH-Tryptophanol	221	n.d.	1

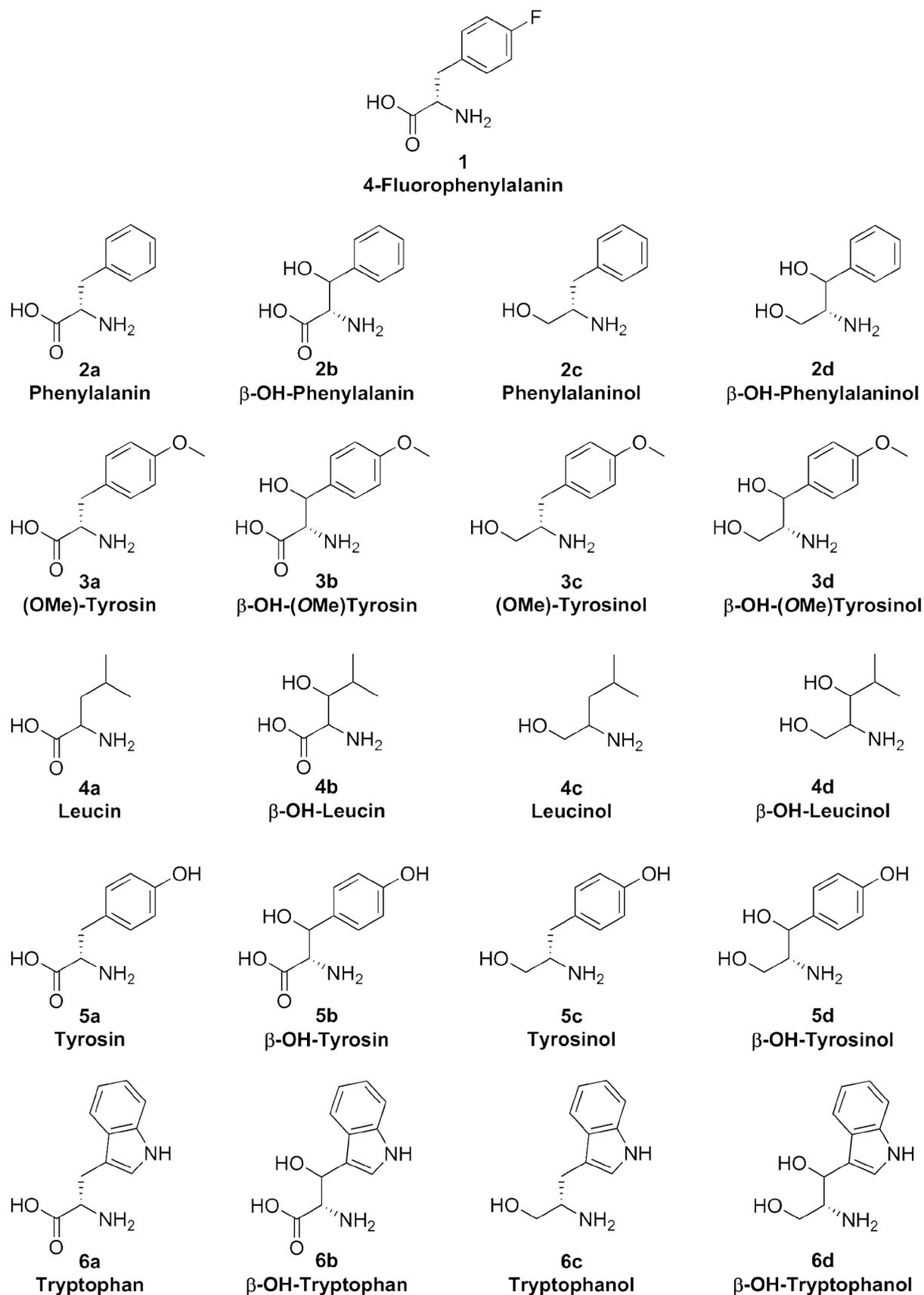


Abbildung 15. Interner Standard für die HPLC-MS-Analytik (1), hydrolysierte bzw. reductiv gesplante Edukte und Produkte der Hydroxylierungsreaktion. Die Verbindungen sind in Gruppen eingeteilt und mit entsprechenden Buchstaben benannt: hydrolysierte Edukte (a), hydrolysierte Produkte (b), reductiv gesplante Edukte (c) und reductiv gesplante Produkte (d).

Zur Bestimmung der Stereochemie wurden Standards (s. unten und Tabelle 10) und das Produkt der Phe-PCP₇-Hydroxylierungsassays (mit NaOH hydrolysiert, um die freie, hydroxylierte Aminosäure zu erhalten) mit einer chiralen Säule (Chiralpak ZWIX(+), Diacel, Durchmesser 150 mm x 3 mm, Partikelgröße 3 µM) getrennt. Die Elution wurde mit einem isokratischen Gradienten (MeOH/MeCN/H₂O (49:49:2 v/v/v) inkl. 50 mM Ameisensäure und 25 mM Diethylamin) bei einer Flussrate von 0,5 mL/min durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels UV-Absorption bei λ = 230 nm. Die Standards waren enantiomerenreines (2*S*,3*R*)-Hydroxyphenylalanin (*Bachem*) und diastereomerenreines (2*S*,3*R*)-/(2*R*,3*S*)-Hydroxyphenylalanin (*Manchester Organics*). Zur Racemisierung wurden je 10 mg der Standards in Ameisensäure gelöst und für 1 h auf 60 °C erhitzt.^[108] Die Retentionszeiten sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10. Retentionszeiten der verschiedenen Hydroxyphenylalanin-Isomere.

Isomer	RT (min)
(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-Hydroxyphenylalanin	3,20
(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-Hydroxyphenylalanin	3,53
(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-Hydroxyphenylalanin	5,50
(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-Hydroxyphenylalanin	6,61
Hydroxylierungsprodukt der enzymatischen Reaktion	3,24

4.4 Synthetische Methoden

4.4.1 Synthese der Aminoacyl-Coenzym A-Derivate

Die Synthese der Aminoacyl-Coenzym A-Derivate wurde nach einem modifiziertem Protokoll von Strieker *et al.*^[109] durchgeführt.

Tabelle 11. Edukte und Reagenzien der Aminoacyl-CoA-Derivat-Synthesen.

Stoff	eq.	M (g/mol)	n (µmol)	m (mg)	V (µL)
Coenzym A (Li-Salz)	1	767,5	8	6,2	
Boc-geschützte Aminosäure:	1,5	-	12	-	
Boc-L-Leu-OH	1,5	231,3	12	2,8	
Boc-D-Leu-OH*H ₂ O	1,5	249,3	12	3,0	
Boc-L-Phe-OH	1,5	265,3	12	3,5	
Boc-L-(OMe)Tyr-OH	1,5	295,3	12	3,2	
HBTU	1,4	379,3	11,2	4,2	
HOBt	1,4	135,13	11,2	1,4	
DIPEA	4	129,3	32		5,4

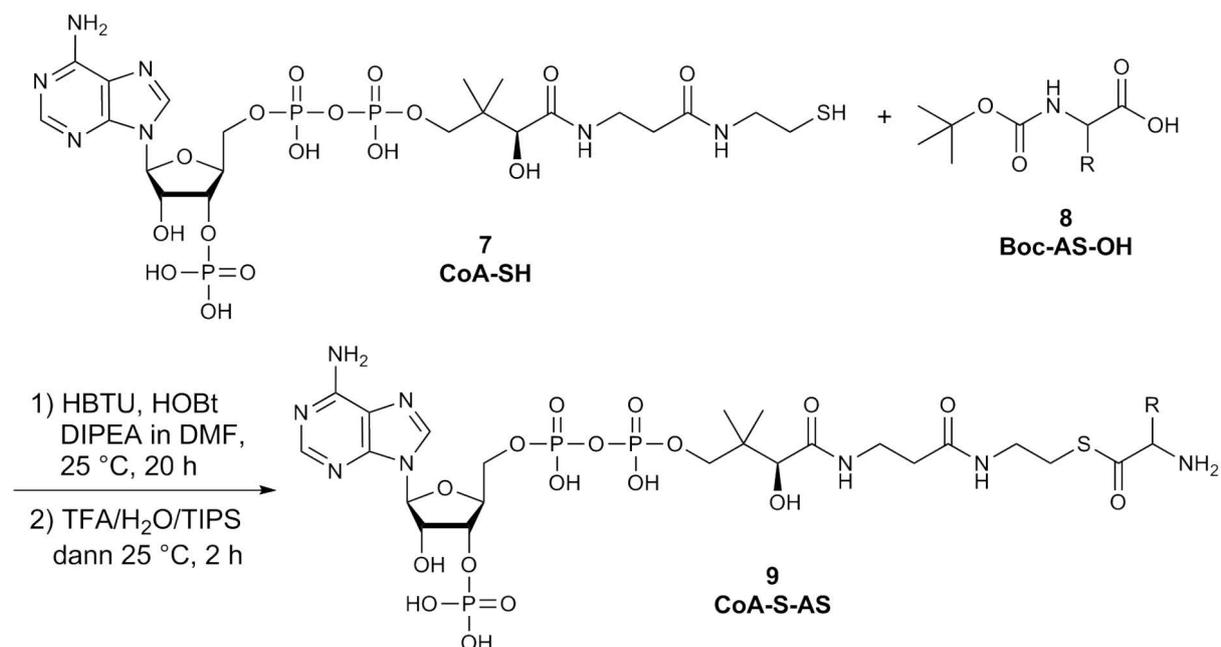


Abbildung 16. Synthese der Aminoacyl-CoA-Derivate.

Die Boc-geschützte Aminosäure, HBTU und HOBT wurden in 600 μ L DMF gelöst. Nach DIPEA-Zugabe wurde zur Aktivesterbildung 5-10 min bei 25 °C und 900 rpm inkubiert. Coenzym A wurde hinzugegeben und 20 h bei 25 °C und 900 rpm zur Kupplung inkubiert. Zur Entschützung wurden 1,3 mL TFA/H₂O/TIPS (95/2,5/2,5%) hinzugegeben und 2 h bei 25 °C und 900 rpm geschüttelt. Diese Mischung wurde in 30 mL eiskalten Diethylether gegeben und für mindestens 12 h bei -20 °C gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (16 000 g, 5 min, 0 °C) und in 400 μ L H₂O inkl. 5% MeOH gelöst. Dieses Rohprodukt wurde mit einer präparativen HPLC (1100-Serie, *Agilent Technologies*) aufgereinigt (Gradient: 5-40% wässriges MeOH (0,1% Ameisensäure) in 20 min, auf 100% bei 25 min. Säule: GROM-Sil ODS-5 ST (C-18), 10 μ m, 250x20 mm). Produkt-enhaltende Fraktionen wurden mittels LC-MS (*Exactive Orbitrap, Thermo Fisher Scientific*) identifiziert und vereinigt. Das Methanol wurde im Vakuum und das verbleibende Wasser durch Gefriertrocknung entfernt. Die Aminoacyl-CoA-Derivate wurden zu 10 mM in *d*H₂O gelöst, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 α -Hydroxylierung von Glycin

5.1.1 Flavin-Reduktase SkyRed

5.1.1.1 Biochemische Charakterisierung

Aufreinigung

Um die Reduktase (SkyRed bzw. Sky40) biochemisch zu charakterisieren, wurde diese zunächst als N-terminales His₆-Tag-Fusionsprotein heterolog exprimiert und aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie und, sofern erforderlich, anschließender Gelfiltrationschromatographie. Ohne Zugabe von FMN oder FAD handelte es sich bei dem gereinigten Protein nur im geringen Maße um Holoenzym (Flavingehalt ca. 25-30%). Um die Ausbeute an Holo-Enzym zu erhöhen, wurde deshalb bei den weiteren Aufreinigungen dem Aufschlusspuffer FMN bzw. FAD zugegeben. Des Weiteren wurde vor der finalen Größenausschlusschromatographie das Protein mit dem entsprechenden Flavin rekonstituiert. Die Ausbeute an Protein lag bei ~40 mg pro Liter Expressionsmedium. Die Aufreinigung von *apo*-SkyRed erfolgte analog, jedoch wurde kein zusätzliches FMN oder FAD zugegeben und vor der Elution mit 4 M Harnstoff im Waschpuffer gewaschen. Unter diesen Bedingungen entfaltet das Protein partiell und lässt gebundenen Cofaktor frei. Die Ausbeuten waren mit 290 μ g pro Liter Expressionsmedium deutlich geringer als bei einer Aufreinigung ohne partielle Entfaltung. Es zeigte sich auch, dass bei dieser Behandlung erhebliche Mengen an Protein auf der Säule aggregieren und erst mit 8 M Harnstoff und 1 mM EDTA eluiert werden konnten.

Flavinbindung

Sequenzvergleiche sowie die gelbe Farbe der isolierten Reduktase deuteten auf ein Flavin (FMN oder FAD, s. Abbildung 17A) als Cofaktor hin.^[110] Das UV-Vis-Spektrum des Enzyms bestätigte

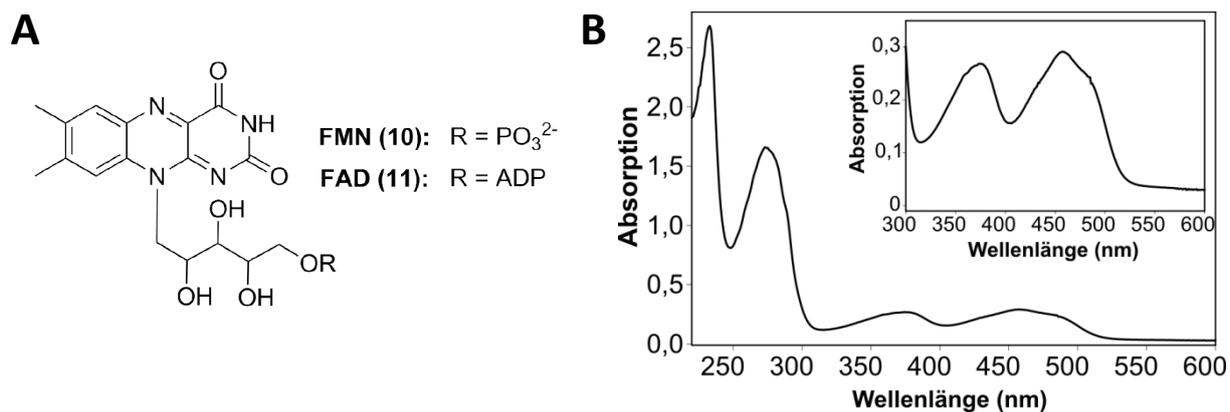


Abbildung 17. (A) Strukturen der Flavin-Cofaktoren FMN und FAD. (B) UV-Vis-Spektrum der ohne zusätzliche Cofaktoren aufgereinigten Reduktase. In 30 mM Hepes, pH 8; Agilent 8453 UV-Visible Spektrophotometer, 1 cm, 25 °C (Abbildung von Dr. Tobias Werther, AK Dobbek, HU Berlin).

diese Vermutung. Wie in **Abbildung 17B** dargestellt, zeigt die Reduktase ein charakteristisches Spektrum für Flavin-Enzyme mit einem Absorptionsmaximum bei $\lambda = 370$ und 458 nm.

Um zu bestimmen, welchen Cofaktor (FMN oder FAD) SkyRed bevorzugt bindet, wurden mehrere Versuche durchgeführt. Zunächst wurde eine Probe des ohne zusätzliche Cofaktoren aufgereinigten Enzyms erhitzt und das denaturierte Protein abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit LC-MS vermessen (**Abbildung 18**). Es wurden die Molekülmassen für beide Cofaktoren gefunden. ITC-Messungen von *apo*-SkyRed mit FAD bzw. FMN ergaben vergleichbare Bindungsaffinitäten für beide Cofaktoren (K_D (FAD) = $5,49 \pm 0,23 \mu\text{M}$, K_D (FMN) = $5,05 \pm 0,18 \mu\text{M}$, s. **Abbildung 19**). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Bindung maßgeblich über den Isoalloxazinring vermittelt werden muss. Der Adenosylrest von FAD trägt somit nicht in ausschlaggebendem Maße zur Bindung an SkyRed bei, weshalb das Enzym keine deutliche Präferenz für einen der beiden Cofaktoren besitzt. FMN beziehungsweise FAD ist daher eher als Cosubstrat denn als Cofaktor zu betrachten. Auch die Ergebnisse aus der Kristallstruktur deuten darauf hin (s. Abschnitt 5.1.1.2).

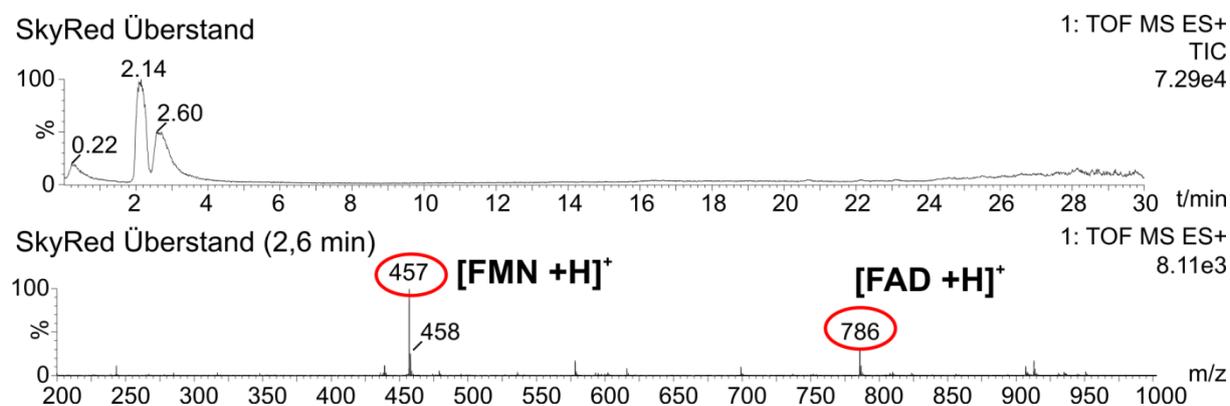


Abbildung 18. TIC (oben) und Massenspektrum bei 2,6 min (unten) des Überstandes nach Denaturierung von SkyRed.

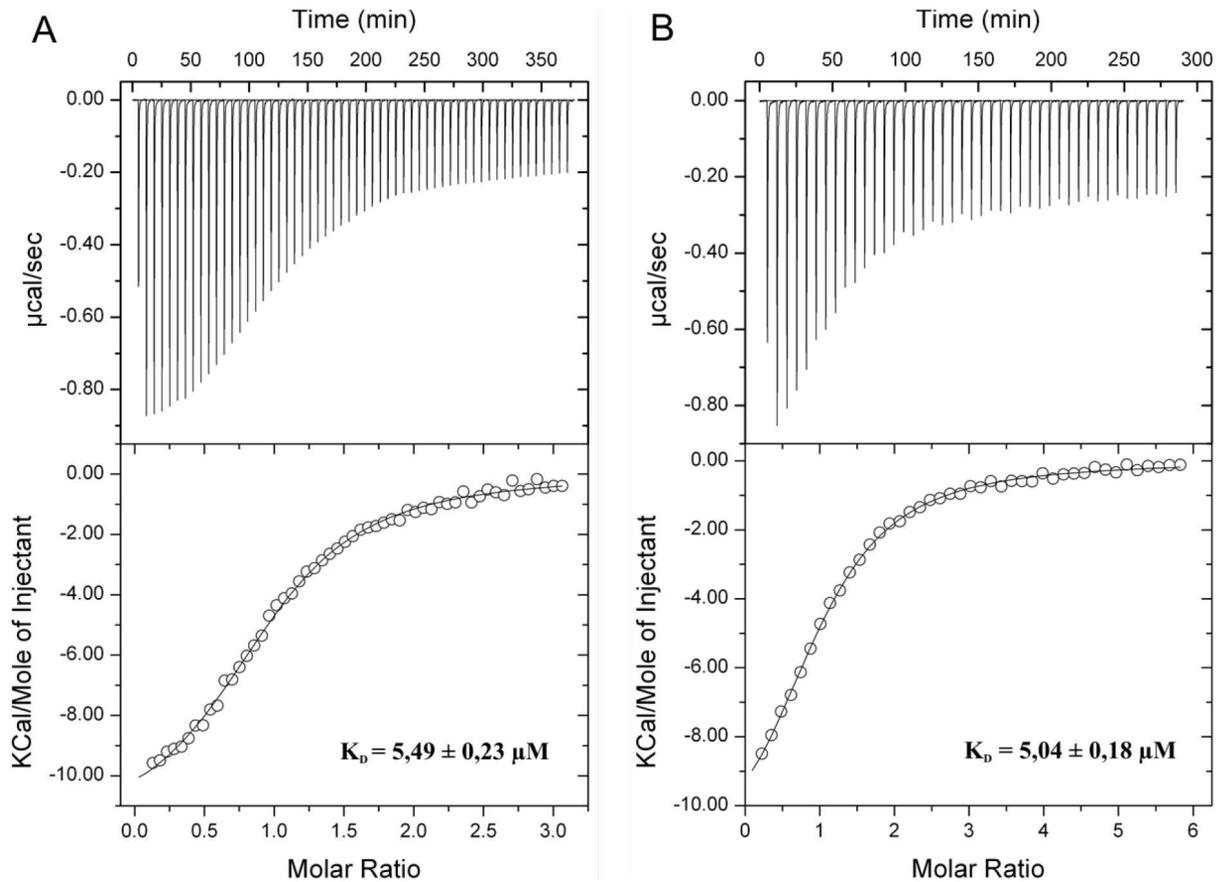


Abbildung 19. ITC-Messungen von SkyRed mit FAD (A) bzw. FMN (B). Die Bindungsaffinitäten sind vergleichbar. (A) Zelle: 29 μM apo-SkyRed, Spritze: 423 μM FAD, 50 mM MOPS pH 7,2, 150 mM NaCl, 25 °C. $K_D = 5,49 \pm 0,23 \mu\text{M}$, $\Delta H = -12 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$, $-T \cdot \Delta S = 4,9 \pm 0,2 \text{ kcal/mol}$. (B) Zelle: 12,6 μM apo-SkyRed, Spritze: 588 μM FMN, Puffer wie bei (A). $K_D = 5,04 \pm 0,18 \mu\text{M}$, $\Delta H = -12,7 \pm 0,3 \text{ kcal/mol}$, $-T \cdot \Delta S = 5,5 \pm 0,3 \text{ kcal/mol}$ (Abbildung von Dr. Tobias Werther, AK Dobbek, HU Berlin).

Spektrale Charakterisierung

Die Flavinreduktion von SkyRed lässt sich spektroskopisch anhand der Absorption von NADH ($\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ nm}$) und Flavin_{ox} ($\lambda_{\text{max}} = 445\text{-}450 \text{ nm}$) verfolgen. Jedoch muss dies unter Luftausschluss geschehen, da das reduzierte Flavin sonst durch molekularen Sauerstoff und unter Wasserstoff-

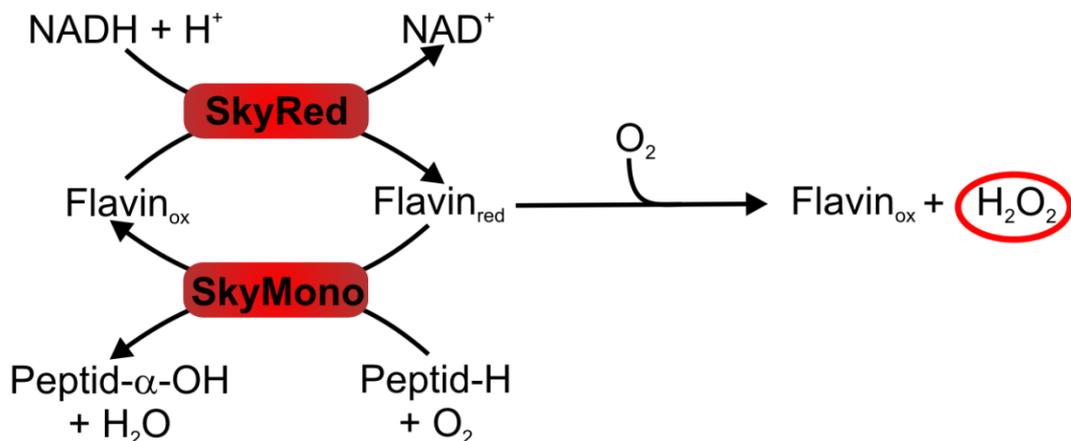


Abbildung 20. Postulierter Mechanismus der α -Hydroxylierung von Glycin und mögliche Nebenreaktion von reduziertem Flavin mit molekularem Sauerstoff.

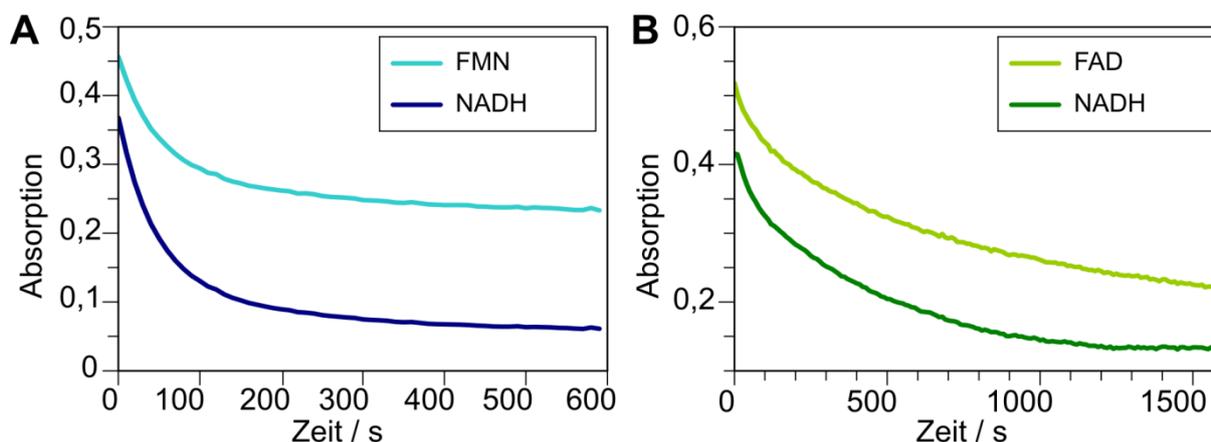


Abbildung 21. Spektroskopische Beobachtung der Flavinreduktion von SkyRed bei Zugabe von FMN (A, blau) bzw. FAD (B, grün). Die Abnahme der Absorption von NADH bei 340 nm ist in hellblau (A) bzw. hellgrün (B) dargestellt, die von Abnahme der Absorption der Flavine bei $\lambda = 450$ nm in dunkelblau (A, FMN) bzw. dunkelgrün (B, FAD). Die Messung wurde unter anaeroben Bedingungen durchgeführt: 68 nM SkyRed, 40 μ M Flavin, 80 μ M NADH in 50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 300 mM NaCl.

peroxid-Bildung schnell wieder zu Flavin_{ox} oxidiert wird (s. Abbildung 20).^[111] Mit Hilfe einer gasdichten Küvette konnte die Reaktion unter anaeroben Bedingungen verfolgt und die Reduktion beider Flavine FMN und FAD anhand der Abnahme der Absorption bei $\lambda = 450$ nm nachgewiesen werden (Abbildung 21). Hierbei zeigte sich auch, dass die Reaktion mit NADH etwa 30-mal schneller war als mit NADPH (Daten nicht gezeigt).

Absorptionsspektren von SkyRed in oxidiertem und reduziertem Zustand und in Gegenwart von NADH und NAD⁺ lieferte Hinweise auf des Intermediat der Flavin-Reduktion. Während das Absorptionsmaximum von oxidiertem SkyRed bei $\lambda = 458$ nm liegt und dieses Merkmal während der Reduktion verschwindet, kommt es bei Zugabe eines Überschusses von NAD⁺ zur Ausbildung einer breiten Bande bei $\lambda = 700$ nm zu beobachten (Abbildung 22A), die auf eine Stabilisierung des Komplexes zwischen reduziertem Flavin und NAD⁺ durch *charge-transfer*-Interaktionen

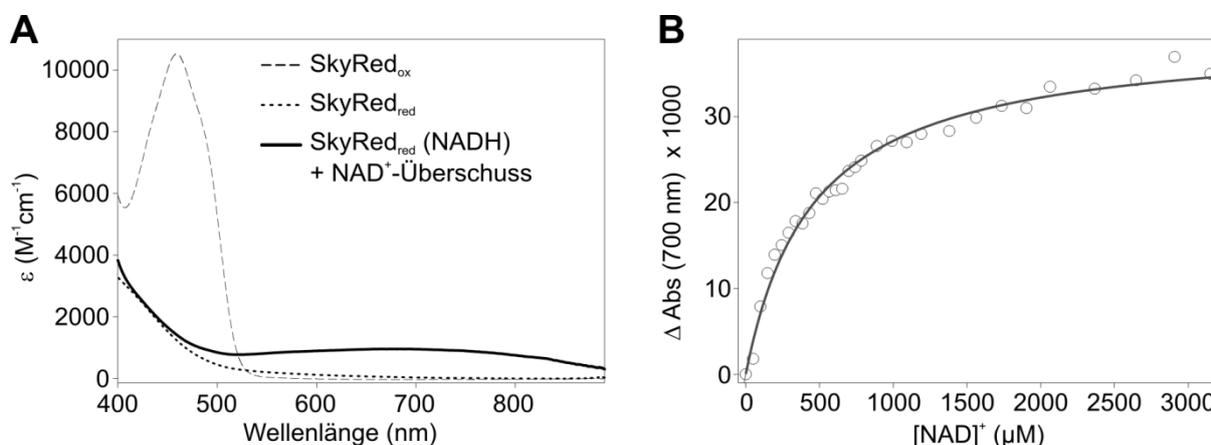


Abbildung 22. Vis-Spektren von SkyRed im oxidierten und reduzierten Zustand und bei NAD⁺-Überschuss (A). Absorptionsänderung bei 700 nm während der Titration von NAD⁺ zu Dithionit-reduziertem SkyRed unter Bildung eines Charge-Transfer-Komplexes (SkyRed_{red}:::NAD⁺)^{CT} (B) (Abbildung von Dr. Tobias Werther, AK Dobbek, HU Berlin).

hindeutet. Eine Titration von NAD^+ zu Dithionit-reduziertem SkyRed ergab einen K_D -Wert von $455 \pm 26 \mu\text{M}$ (Abbildung 22B). Ein solcher *charge-transfer*-Komplex ist beispielsweise auch bei der Reduktase ActVB aus *Streptomyces coelicolor*^[112-114] und der Reduktase PheA2 der Phenol-Hydroxylase aus *Bacillus thermoglucosidasius*^[57] zu beobachten. Es ist wahrscheinlich, dass die Bildung dieses Komplexes wichtig für die Regulierung der Reaktion ist. Die Kristallstruktur von PheA2 zeigt, dass NAD^+ direkt über FAD_{red} in einer für *charge-transfer*-Interaktionen günstigen Position bindet.^[115] Bei ActVA/B konnte nachgewiesen werden, dass die Geschwindigkeit des FMN_{red} -Transfers von der Reduktase zur Monooxygenase stark von der NAD^+ -Konzentration abhängig ist.^[112,113] Auch ist im Falle von HPAH aus *Acinetobacter baumannii* die Monooxygenase-Aktivität durch den Transfer von FMN_{red} von der Reduktase zur Monooxygenase limitiert.^[116] Somit hat der Reduktase-Flavin_{red}::: NAD^+ -Komplex einen großen Einfluss auf die Hydroxylierungsreaktion der Monooxygenase und stellt damit einen wichtigen regulatorischen Teil des Systems dar.

5.1.1.2 Kristallstruktur

Die Reduktase SkyRed besteht aus 208 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 21 551 Da.^[89] Ein Sequenzvergleich von SkyRed mit Hilfe der *Protein Data Base*^[117] ergab neben Ähnlichkeiten von bis zu 49% zu verschiedenen putativen und hypothetischen Flavin-Re-

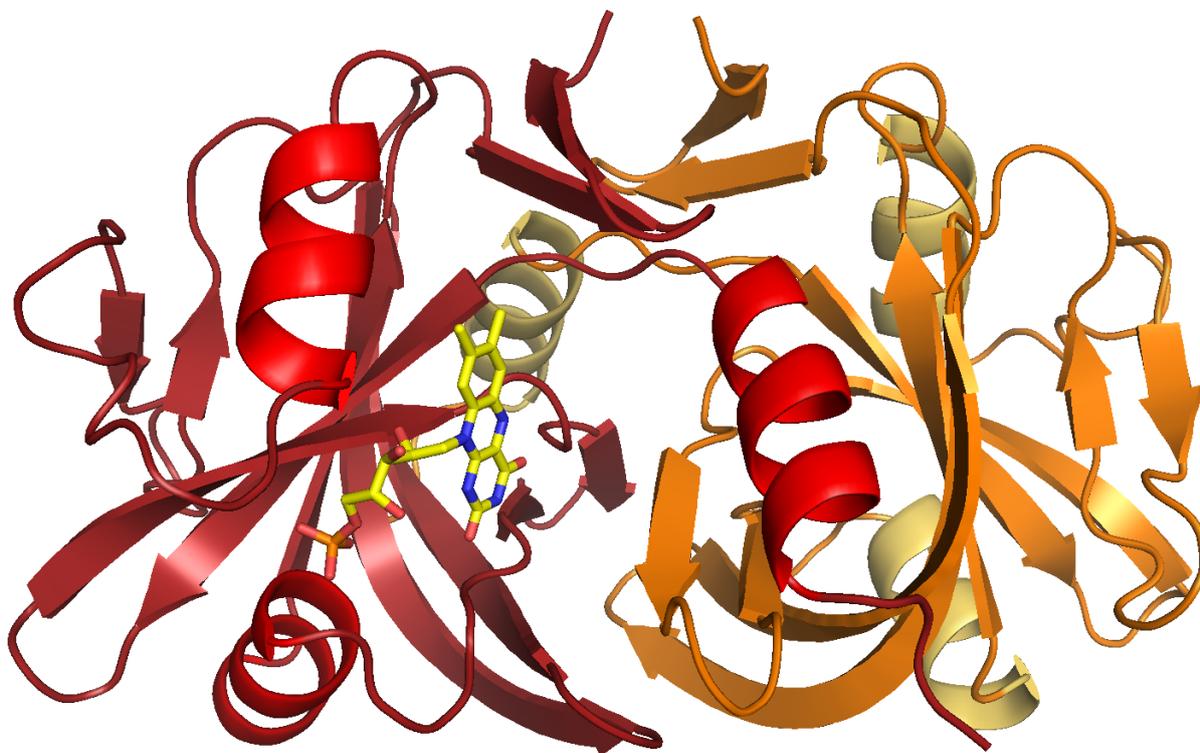


Abbildung 23. Kristallstruktur des SkyRed-Homodimers (rot und orange). Der Flavin-Cofaktor ist in gelb dargestellt.

duktasen eine Sequenzidentität von 35% und 52% Ähnlichkeit mit der Reduktase der Nitrilotriacetat-Monooxygenase (*MthNTA-MoB*) aus *Mycobacterium thermoresistibile*.^[118] SkyRed gehört zu der PF01613-Familie der Flavin-Reduktasen.^[119] Diese kurzkettigen Flavin-Reduktasen beinhalten als wichtiges Strukturmotiv ein Flavin-bindendes β -Barrel, welches von einer α -Helix überdacht ist. Sie liegen meist als Homodimere vor.

Tabelle 12. Kristallographische Daten für SkyRed und SkyMono. Werte in Klammern beziehen sich auf die Bereiche höchster Auflösung. Im Falle von SkyMono wurde einen Datensatz aufgenommen, dessen Phasierung bis jetzt nicht möglich war.

	SkyRed	SkyMono
<u>Datensammlung</u>		
Auflösung (Å)	33.6 - 2.35 (2.433 - 2.349)	33.38 - 3.33 (3.448 - 3.329)
Raumgruppe	P 61 2 2	I 41 2 2
Einheitszellparameter (Å), (°)	101.76 101.76 103.86 90 90 120	167.9 167.9 110.1 90 90 90
Reflexe insgesamt	196921 (19719)	84057 (8534)
Reflexe einzigartig	13750 (1349)	11491 (1148)
Redundanz	14.3 (14.6)	7.3 (7.4)
Vollständigkeit (%)	99.99 (100.00)	97.32 (98.12)
I/Sigma(I)	25.42 (5.53)	31.80 (3.28)
Wilson B-Faktor	33.57	129.56
R-merge	0.09761 (0.6167)	0.0395 (0.6059)
<u>Verfeinerung</u>		
R _{work}	0.1759 (0.2154)	-
R _{free}	0.2068 (0.2959)	-
Atome im Modell	1282	-
Protein	1186	-
Ligand	31	-
Wasser	65	-
Proteinreste	159	-
RMS (Bindungslängen) (Å)	0.007	-
RMS (Winkel) (°)	1.04	-
Ramachandran favored (%)	97	-
Ramachandran outliers (%)	0	-
Mittlerer B-Faktor	36.10	-
Protein	35.50	-
Ligand	43.90	-
Wasser	42.00	-

Die Kristallstruktur von SkyRed mit gebundenem FAD_{ox} wurde bis zu einer Auflösung von $2,35 \text{ \AA}$ gelöst (s. Abbildung 23 und Tabelle 12). Die Sekundärstruktur besteht aus 11 β -Strängen und 3 α -Helices. Davon bilden die β -Stränge 1-5 und 8-9 ein antiparalleles β -Barrel aus, welches von der β -Helix 2 überdacht wird. Der Adenosylrest des FAD konnte nicht aufgelöst werden, was darauf schließen lässt, dass dieser Teil des Cofaktors nicht fest an das Enzym bindet und flexibel in das Medium ragt (s. Abbildung 24). Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen aus der isothermen Mikrokolorimetrie (s. Abschnitt 5.1.1.1). Der Isoalloxazinring des FAD bindet von außen an das β -Barrel, der Adenosylrest zeigt in Richtung des Loops 7 zwischen α -Helix 3 und β -Strang 6. Im Vergleich bietet dieser Loop dem Adenosylrest bei SkyRed weniger Platz als bei der Flavin-Reduktase PheA2, die FAD fest bindet (s. Abbildung 25).^[115] Im Gegensatz dazu ist der Loop 7 von SkyRed weiter vom β -Barrel entfernt als bei der FMN-bindenden Eisen-Reduktase FeR aus *Archaeoglobus fulgidus*.^[120] Ausgehend von diesen strukturellen Informationen ist es also denkbar, dass SkyRed sowohl FMN als auch FAD bindet.

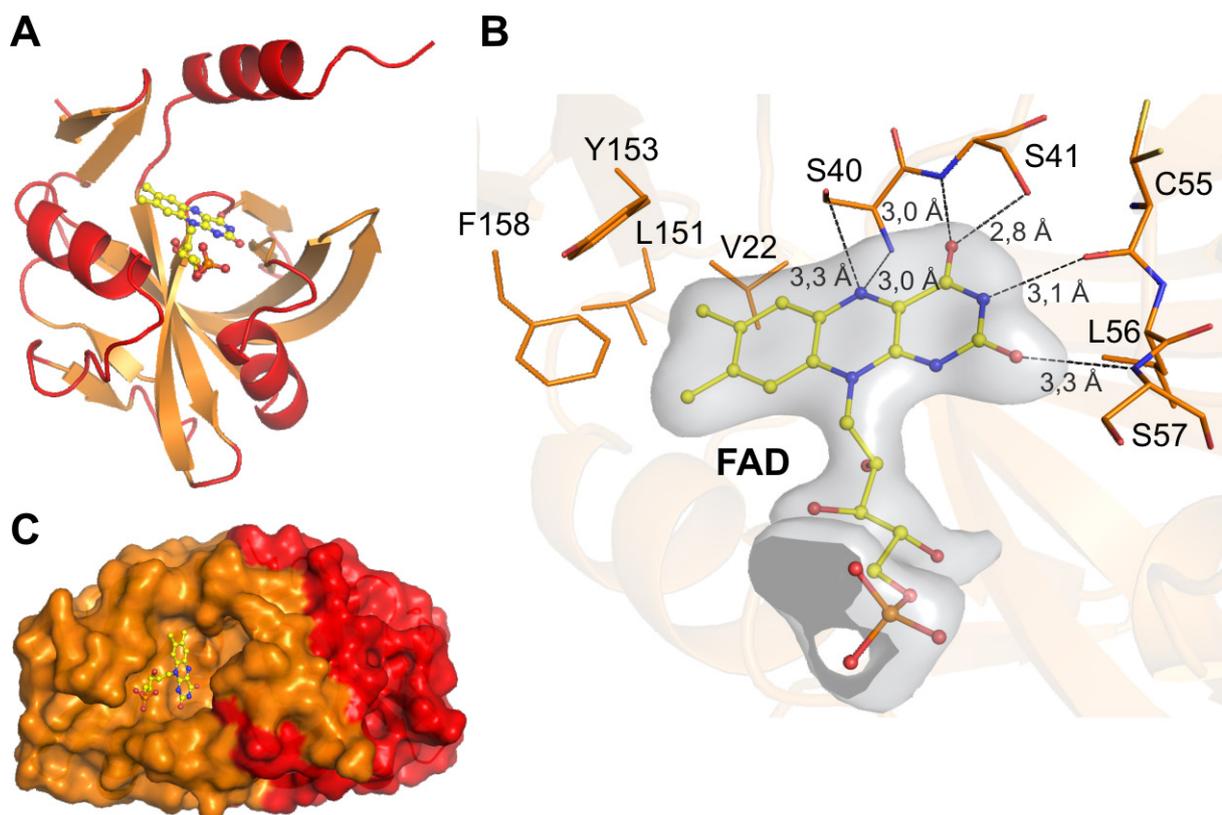


Abbildung 24. Kristallstruktur von SkyRed. (A) Monomer, (B) Dimer in Oberflächendarstellung, (C) Blick in das aktive Zentrum. Gestrichelte Linien zeigen Interaktionen zwischen Protein und FAD an (es wurde nur der FMN-Teil des FAD modelliert). Nur der Isoalloxazinring geht Bindungen mit SkyRed ein. (Abbildung von Dr. Tobias Werther, AK Dobbek, HU Berlin).

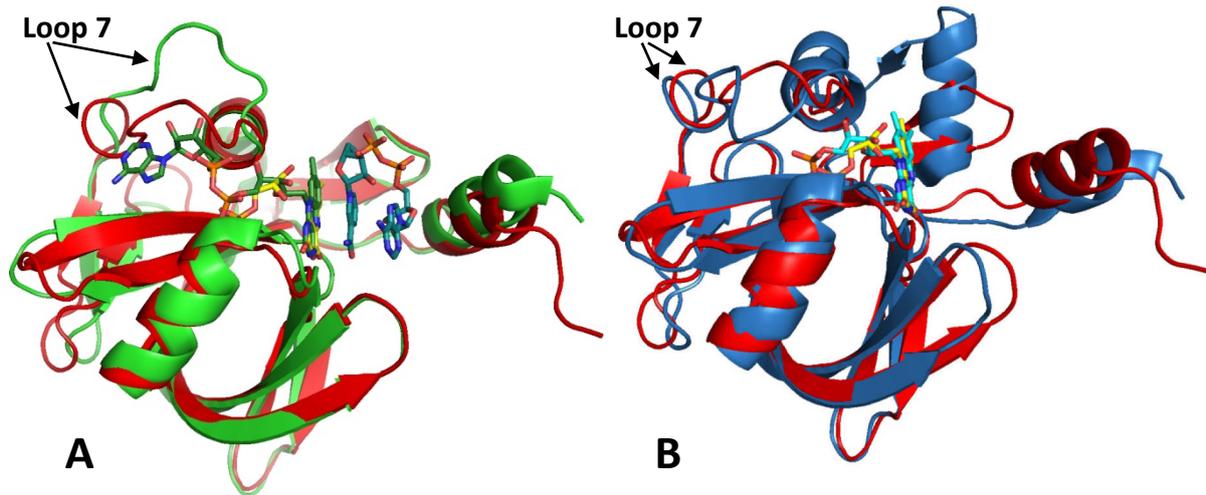


Abbildung 25. A: Vergleich der Struktur von FAD-bindender PheA2 (grün) und SkyRed (rot). **B:** Vergleich der Struktur der FMN-bindenden FeR (blau) und SkyRed (rot). Cofaktoren: PheA2-FAD in dunkelgrün, PheA2-NADH in blau, FeR-FMN in hellblau, Cofaktor von SkyRed in gelb.

Die asymmetrische Einheit von SkyRed ist das Monomer, aus der Symmetrie ergibt sich ein Homodimer. Dies war bereits erwartet, da die Reduktase während der Größenausschlusschromatographie zu einem Zeitpunkt eluierte, der auf ein Molekulargewicht von etwa 40 kDa hinweist. Die Ergebnisse aus Röntgenkleinwinkelstreuexperimenten (SAXS) bestätigten diese Vermutung, sie ergaben ein Molekulargewicht von 44,3 kDa (s. Abbildung 26).^[121]

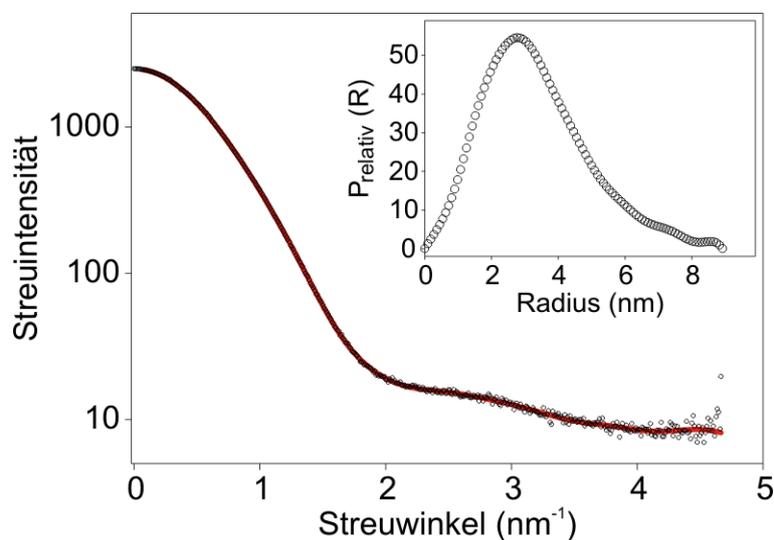


Abbildung 26. Untersuchung von SkyRed mittels Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS). Streukurve und Abstandverteilung (Insert) von SkyRed. Als Gyrationradius ergibt sich $2,6 \pm 0,002$ nm. Die Berechnung der Molekülmasse deutet auf einen dimeren Oligomerisierungsgrad hin (Abbildungen von Dr. Tobias Werther, AK Dobbek, HU Berlin).

5.1.2 Flavin-Monooxygenase SkyMono

5.1.2.1 Biochemische Charakterisierung

Aufreinigung

Die Expression und Aufreinigung der Monooxygenase (SkyMono bzw. Sky39) verlief in guten Ausbeuten von ~44 mg pro Liter Expressionsmedium (TB). Zum Nachweis der Hydroxylierung wurden verschiedene gekoppelte Assays mit SkyRed und SkyMono durchgeführt. Da der genaue Hydroxylierungszeitpunkt *in vivo* nicht bekannt war, wurden mehrere, in Abbildung 27 darge-

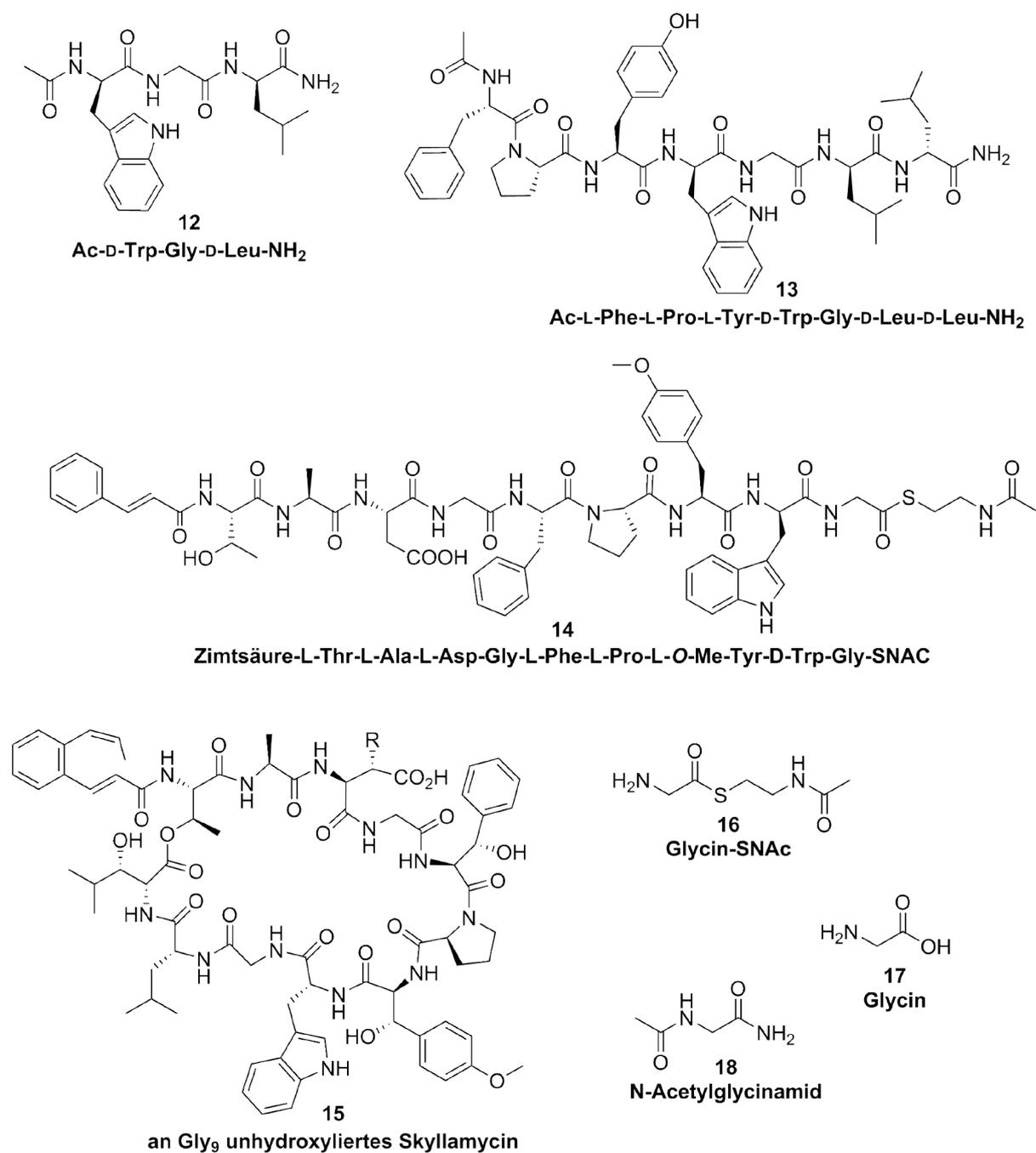


Abbildung 27. Mit SkyMono getestete Substrate.

stellte Substrate verwendet. Die Konzentrationen der Cofaktoren wurden variiert (10-250 μM FMN/FAD, 50-500 μM NAD(P)H) und verschiedene zweiwertige Ionen (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+}) hinzugefügt. Die Puffer waren meist 50 mM HEPES oder Tris-HCl (pH 8) mit verschiedenen Zusätzen: 250 mM NaCl oder KCl, 1 mM EDTA, 4% Glycerin oder 50 μM DTT. Die Reaktionen wurden aerob oder mit verminderter Sauerstoffkonzentration durchgeführt, um eine überschüssige Bildung von Wasserstoffperoxid durch die Reoxidation von reduziertem Flavin zu verhindern. Um das gebildete Wasserstoffperoxid zu entfernen, wurde außerdem die Zugabe von Katalase untersucht, welche H_2O_2 zu Sauerstoff und Wasser umsetzt.^[111] Jedoch hatte dies keinen messbaren Einfluss auf die Reaktion. Die Assays wurden jeweils spektroskopisch verfolgt und anschließend mit MS untersucht. Jedoch konnte unter keiner verwendeten Bedingung eine Hydroxylierung des Substrates nachgewiesen werden.

Flavinbindung

Um zu untersuchen, warum die Monooxygenase die getesteten Substrate nicht hydroxyliert, wurden verschiedene Experimente durchgeführt, um Intermediate der Reaktion nachzuweisen. Für

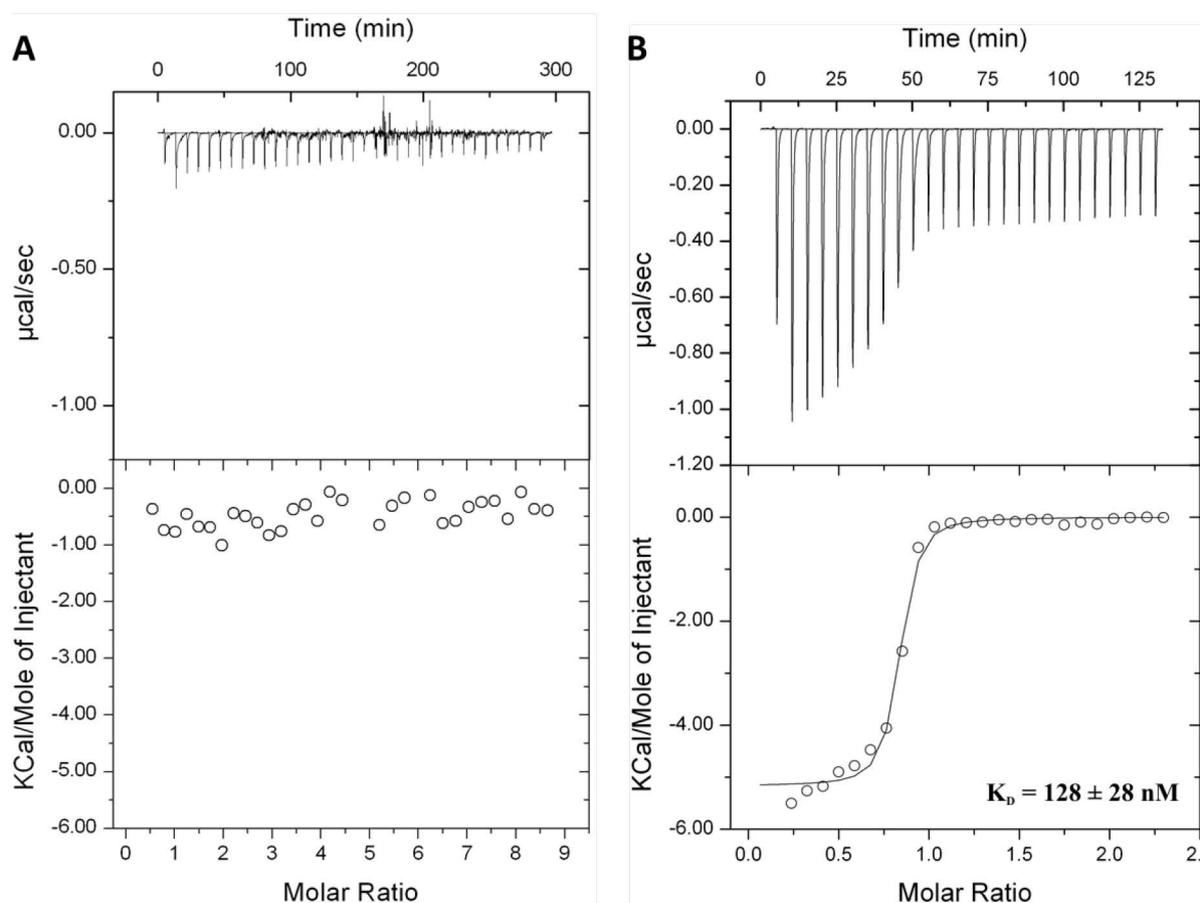


Abbildung 28. ITC-Messungen von SkyMono mit oxidiertem (A) und reduziertem FAD (B). (A) Zelle: 30 μM SkyMono, Spritze: 1,25 mM FAD_{ox} , 50 mM MOPS pH 7,2, 150 mM NaCl. (B) Zelle: 40 μM SkyMono, Spritze: 1,25 mM FAD_{red} , Puffer wie bei (A) mit zusätzlich 5 mM Dithionit. $K_D = 128 \pm 28$ nM, $\Delta H = -5,2 \pm 0,1$ kcal/mol, $\Delta S = 14,2$ cal/mol/deg (Abbildung von Dr. Tobias Werther, AK Dobbek, HU Berlin).

eine Hydroxylierung des Substrates ist es zunächst wichtig, dass die Monooxygenase in der Lage ist, reduziertes Flavin zu binden und das oxidierte Flavin wieder abzugeben. Dafür wurden ITC-Messungen mit FAD und FADH₂ und SkyMono durchgeführt (s. Abbildung 28). Für reduziertes Flavin wurde unter anaeroben Bedingungen eine Bindung mit einem K_D-Wert von 128 ± 28 nM nachgewiesen, während für FAD_{ox} keine Bindung an SkyMono gezeigt werden konnte. Wenn gleich die Anpassung der Bindungsisotherme mit einem einfachen Bindungsmodell systematische Abweichungen bei niedrigen FADH₂-Konzentrationen aufweist, zeigt sich deutlich, dass das Enzym eine Diskriminierung des Redoxzustandes des Flavins vornimmt. Dies ist im Einklang mit dem biosynthetischen Modell, dass die Monooxygenase reduziertes Flavin bindet und anschließend mit Hilfe von molekularem Sauerstoff und Substrat die Hydroxylierung durchführt. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Flavin-Monooxygenase TftD aus *Burkholderia cepacia* erreicht, welche FADH₂ mit einem K_D-Wert von 1,2 ± 0,2 μM bindet, im Gegensatz dazu jedoch keine Bindung zu FMN, FMNH₂ und FAD aufweist.^[56]

Spektrale Charakterisierung

Ein weiteres nachweisbares Intermediat während der Hydroxylierung ist das Flavin-Hydroperoxid. Nach dem postulierten Mechanismus (Abbildung 29) bildet sich das Hydroperoxid aus SkyMono, Flavin_{red} und molekularem Sauerstoff. Ist Substrat vorhanden, wird dieses durch das elektrophile Hydroperoxid-Intermediat oxidiert. Wird jedoch kein Substrat zur Reaktionsmischung hinzugegeben, sollte sich das Hydroperoxid akkumulieren und spektroskopisch nachweisen lassen. Dass die Substratbindung nach Bildung des Hydroperoxids erfolgt, konnte zum Beispiel bei der *p*-Hydroxyphenylacetat-Hydroxylase (HPAH),^[122] der Cyclohexanon-Monooxygenase,^[123] und einer mikrosomalen Monooxygenase nachgewiesen werden.^[124] Im Falle des

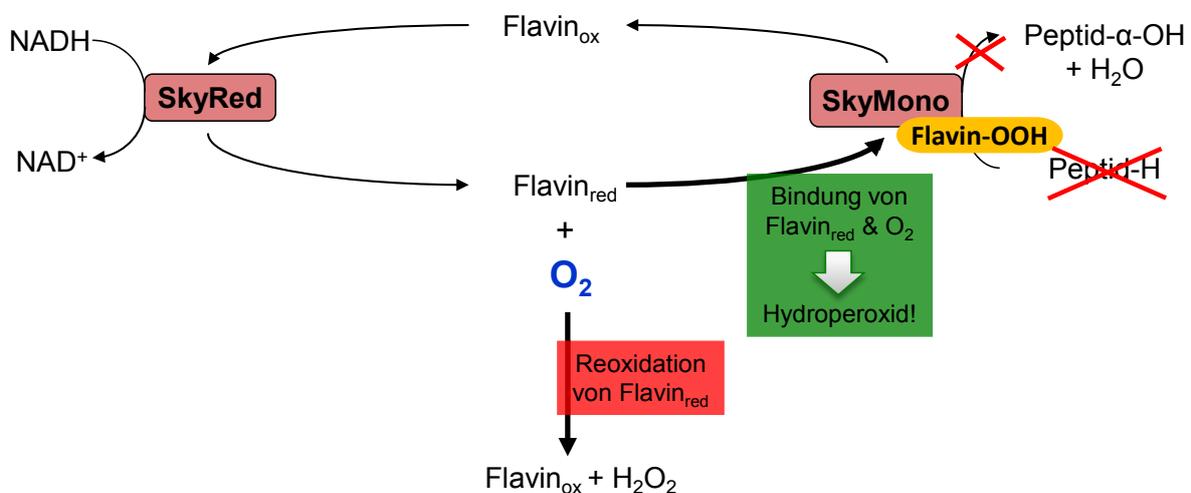


Abbildung 29. Postulierter Mechanismus der α-Hydroxylierung, Konkurrenzreaktion (H₂O₂-Bildung) von Flavin_{red} ohne SkyMono und Bildung des Hydroperoxid-Intermediates.

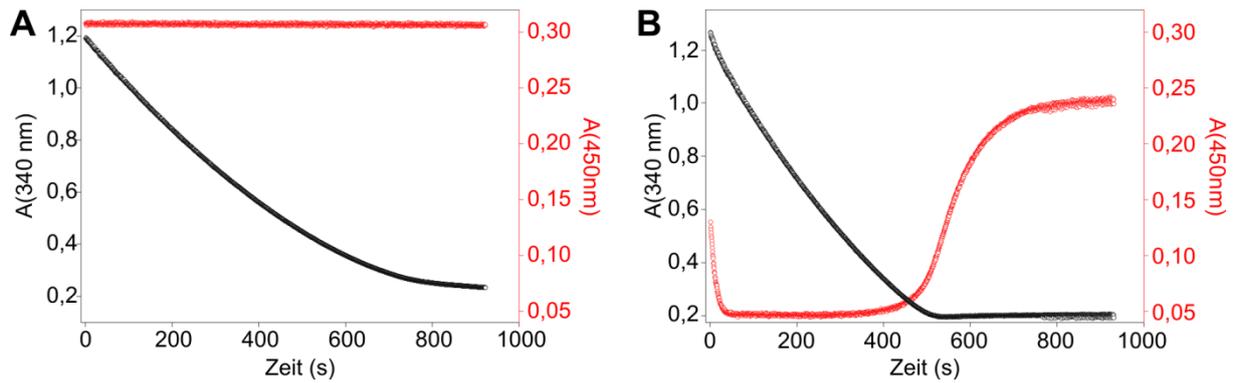


Abbildung 30. Nachweis der FAD-Bindung an SkyMono. (A) Negativkontrolle ohne SkyMono, (B) Die Bindung von FAD an SkyMono führt zu einem verzögerten Anstieg der Absorption bei $\lambda = 450$ nm. Bedingungen: 39 μ M SkyMono, 19,6 μ M FAD, 200 μ M NADH, 150 nM SkyRed, 50 mM MOPS/NaOH, pH 7,2, 150 mM NaCl (Abbildung von Dr. Tobias Werther, AK Dobbek, HU Berlin).

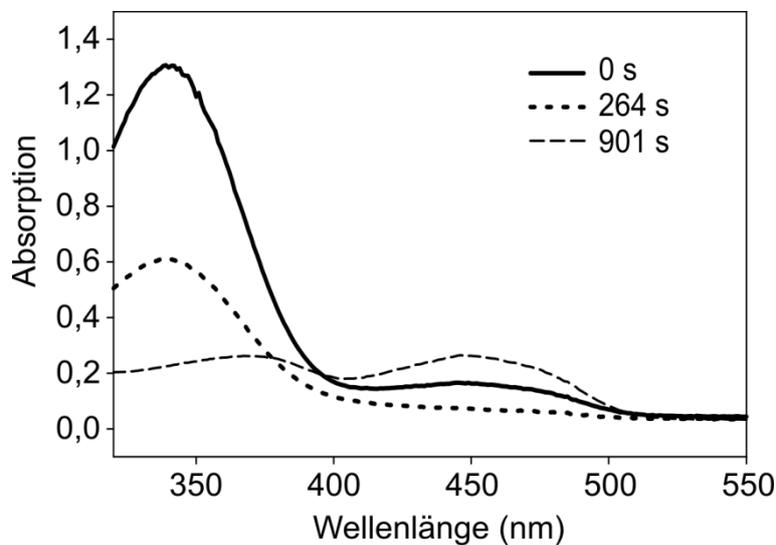


Abbildung 31. Absorptionsspektren während der Flavin-Hydroperoxid-Bildung von SkyMono und FAD. Dargestellt sind die zur Abbildung 14 gehörenden Spektren zu den entsprechenden Zeiten nach Beginn der Reaktion: Beginn der Reaktion: schwarze Linie, nach 264 s: graue Linie, nach 901 s: gestrichelte Linie (Abbildung von Dr. Tobias Werther, AK Dobbek, HU Berlin).

ActVA/ActVB-System wurde nachgewiesen, dass die Bildung des ActVA-Hydroperoxids (C(4a)-FMN-OOH) unabhängig von der Anwesenheit des Substrates DHK_{red} ist.^[112] Zum Nachweis des entsprechenden Intermediates bei SkyMono wurde zunächst eine Negativkontrolle ohne Monooxygenase durchgeführt (Abbildung 30A). Da dieser Versuch unter aeroben Bedingungen durchgeführt wurde, war hier keine Reduktion von FAD zu beobachten, da das von SkyRed unter NADH-Verbrauch (Abnahme der Absorption bei $\lambda = 340$ nm) gebildete FADH_2 schnell wieder zu FAD reoxidiert wurde. In Gegenwart von SkyMono ist jedoch zunächst eine deutliche Abnahme der Absorption bei $\lambda = 450$ nm zu erkennen, welche nach etwa 400 s wieder ansteigt (Abbildung 30B). Dies lässt sich mit der Bildung von FADH_2 durch SkyRed erklären, welches unmittelbar von SkyMono gebunden und dadurch die Reoxidation zu FAD unterdrückt wird. Der erneute, langsame Anstieg der Absorption zeigt die Rückoxidation zu FAD. Die einzelnen

Absorptionsspektren im Verlauf der Reaktion sind in Abbildung 31 dargestellt. Die schwarze Linie beschreibt den Anfang der Reaktion, bei dem noch viel NADH ($\lambda_{\text{max}} = 340 \text{ nm}$) und FAD ($\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$) vorhanden sind. Nach 264 s (graue Linie) ist das FAD weitestgehend reduziert (keine Bande bei $\lambda = 450 \text{ nm}$) und nach 901 s (gestrichelte Linie) zeigen sich zwei neue Maxima bei $\lambda = 375$ und 450 nm . Im Gegensatz zu den Untersuchungen zu ActVA^[112,114,125] konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 380 \text{ nm}$ festgestellt werden, welches auf ein Hydroperoxid-Intermediat hinweisen würde. Dies könnte daran liegen, dass die Bildungsgeschwindigkeit des Peroxides zu gering ist, um die Absorption bei $\lambda = 380 \text{ nm}$ zu beobachten. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass es nicht zur Peroxid-Bildung gekommen ist, die verlangsamte Rückoxidation ließe sich in diesem Fall allein durch die FADH₂-Bindung von SkyMono zurückführen. Diese Interpretation würde auch die fehlende Hydroxylierungsfähigkeit von SkyMono erklären. Der Grund für die fehlende Aktivität könnte in einer falschen Faltung während der Aufreinigung oder im Fehlen von wichtigen Pufferbestandteilen, wie zum Beispiel weiteren Cofaktoren liegen. So ist beispielsweise die Aktivität der Nitrilotriacetat-Monooxygenase aus dem *Chelatobacter*-Stamm ATCC 29600 abhängig von der Anwesenheit von Mg²⁺- oder Co²⁺-Ionen.^[111]

Zur Untersuchung der Stöchiometrie der FAD-Bindung an SkyMono wurde SkyRed, FAD und NADH bei verschiedenen SkyMono-Konzentrationen unter aeroben Bedingungen spektroskopisch verfolgt (Abbildung 32). Wie bei der Flavin-Monooxygenase ActVA wurde hierbei festgestellt, dass pro Mol SkyMono 0,5 mol FADH₂ gebunden werden.^[125] Der Grund hierfür könnte eine dimere Struktur von SkyMono sein, an der nur jeweils eine Bindestelle für FADH₂ verfügbar ist. Auf eine entsprechende homodimere Struktur deuten SAXS-Experimente hin, nach denen

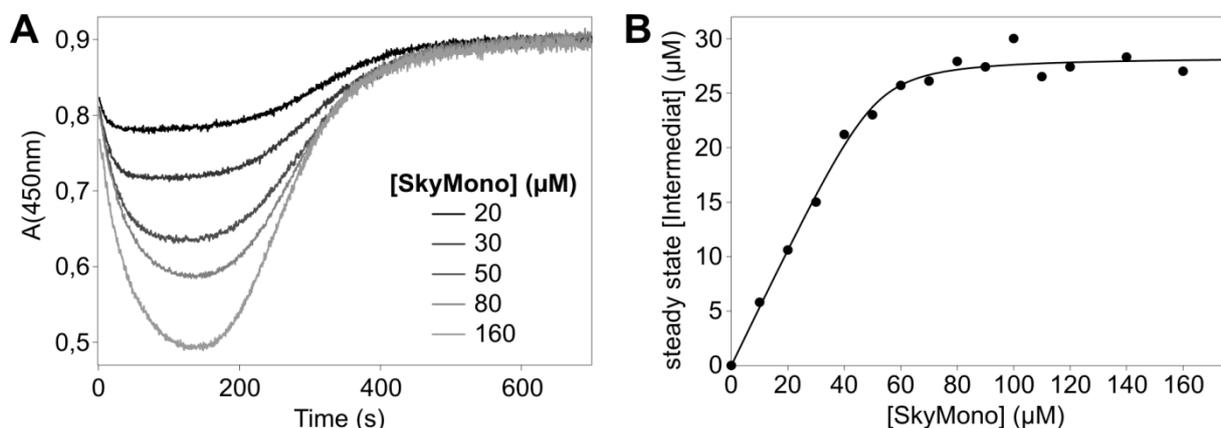


Abbildung 32. Bindung von FAD_{red} an SkyMono in Abhängigkeit der SkyMono-Konzentration. (A) Absorption bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ bei verschiedenen SkyMono-Konzentrationen. (B) Konzentration des Intermediates in Abhängigkeit der SkyMono-Konzentration. Der initiale Anstieg beträgt 0,5 mol Intermediat pro Mol SkyMono. 80 μM FAD, 200 μM NADH, 150 nM SkyRed und verschiedene Konzentrationen von SkyMono wurden in 50 mM MOPS/NaOH pH 7,2, 150 mM NaCl unter aeroben Bedingungen bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ spektroskopisch verfolgt (Abbildungen von Dr. Tobias Werther, AK Dobbek, HU Berlin).

das ermittelte Molekulargewicht das zweifache des theoretischen Molekulargewichts betrug ($M_{\text{SAXS}} = 85,6 \text{ kDa}$, $M_{\text{theor}} = 39,3 \text{ kDa}$, s. Abbildung 34).^[121] Eine solche Halbseitenreaktivität wurde bereits an vielen anderen Enzymen nachgewiesen.^[126–128] Beispielsweise bildet die Thymidylat-Synthase von *Pneumocystis carinii* (PcTS) einen Homodimer, der nach Substrat- und Cofaktor-Bindung an Monomer A einen Konformationswechsel durchläuft, sodass das zweite Monomer B unfähig zur Bindung eines Cofaktormoleküls wird. Nach erfolgter Katalyse an Monomer A könnte die Bindung des Cofaktors an Monomer B die Dissoziation des Produktes von Monomer A begünstigen. Da die Konzentration des Substrates (dUMP) in der Zelle nur doppelt so hoch ist wie die des Produktes (dTMP) und dTMP nur 3-7fach weniger fest als dUMP an das Enzym bindet, könnte die erleichterte Produktfreisetzung an Monomer A durch Cofaktor-Bindung an Monomer B einen wichtigen Beitrag zur Effizienz der Reaktion beitragen. Auch wäre eine Rolle in der Regulierung der Reaktion unter physiologischen Bedingungen denkbar, indem das Enzym mit anderen Enzymen der Folat-Synthese verknüpft ist und durch seine verschiedenen Konformationen die Synthese steuert.^[126] Auch für homodimere Thiamindiphosphat (ThDP)-abhängige Enzyme wird ein solcher sich abwechselnder Mechanismus vermutet.^[127,129] Ein ähnlicher Reaktionsmechanismus wäre auch für SkyMono denkbar; so könnte es sein, dass SkyMono FADH_2 zwar einem Monomer bindet, die Hydroperoxidbildung jedoch erst nach Bindung des Substrates an das andere Monomer stattfinden kann.

5.1.2.2 Kristallisationsversuche

Um Hinweise auf das mögliche Substrat von SkyMono zu bekommen, wurden verschiedene Kristallisationsversuche unternommen. Es wurden zwar Kristalle unter verschiedenen Bedingungen erhalten, diese streuten jedoch nur bis zu einer Auflösung von maximal $3,3 \text{ \AA}$ (s.

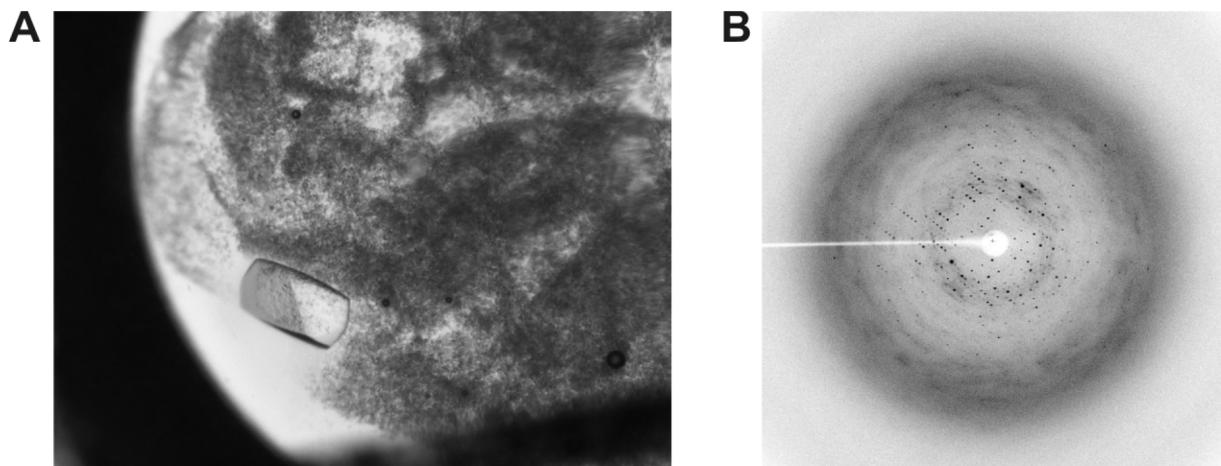


Abbildung 33. Kristalle (A) und Diffraktionsmuster (B) von SkyMono (Abbildungen von Dr. Tobias Werther, AK Dobbek, HU Berlin).

Abbildung 33 und Tabelle 12). Eine Phasierung mit Hilfe des molekularen als auch isomorphen Ersatzes war bisher nicht möglich.

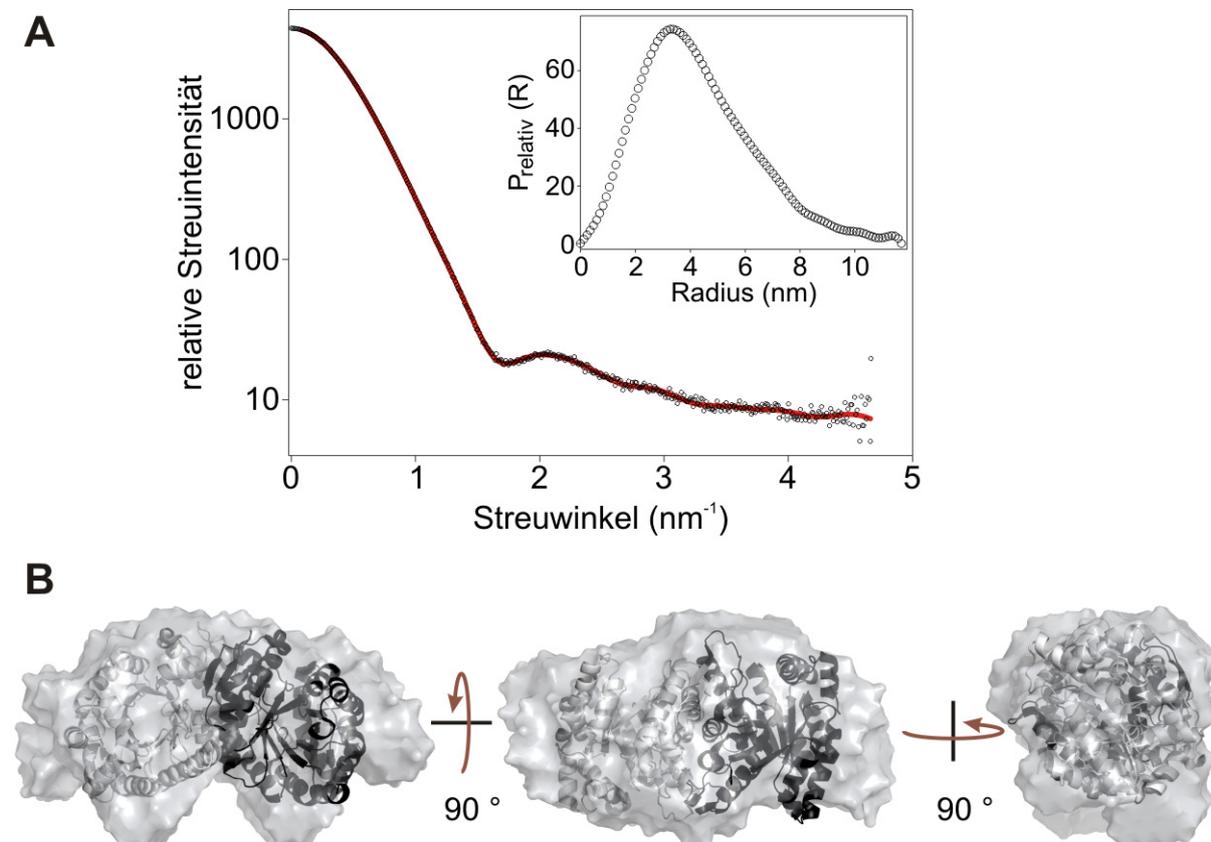


Abbildung 34. Untersuchung von SkyMono mittels Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS). (A) Streukurve und Abstandverteilung (Insert) von SkyMono. Der Gyrationradius beträgt $3,35 \pm 0,004$ nm. Die Berechnung der Molekülmasse deutet auf einen dimeren Oligomerisierungsgrad hin. (B) Überlagerung der Kristallstruktur einer Monooxygenase aus *Agrobacterium tumefaciens* (PDB-ID: 2I7G) mit einem *low-resolution model* von SkyMono (graue Oberfläche) berechnet aus der oben gezeigten Streukurve (Abbildungen von Dr. Tobias Werther, AK Dobbek, HU Berlin).

5.2 β -Hydroxylierungen von L-Phe⁵, L-(OMe)-Tyr⁷ und D-Leu¹¹

5.2.1 Klonierung und Aufreinigung von P450_{sky} und PCP-Domänen

Um die Einführung der β -Hydroxylierungen während der Skyllamycin-Biosynthese näher zu untersuchen, wurden die Gene für die Cytochrom P450-Monooxygenase P450_{sky} (*sky32*) und für die PCP-Domänen 5, 7, 10 und 11 in den Vektor pET28a(+) kloniert. Die Aufreinigung von P450_{sky} erfolgte mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie und anschließender Anionenaustauschchromatographie (s. Anhang, Abbildung A1). Die Ausbeute betrug 4 mg P450_{sky} pro Liter Expressionsmedium. Das Enzym P450_{sky} wurde als CYP163B3 klassifiziert.^[130,131]

Da die PCP-Domänen als His₆-Tag-Fusionsprotein nicht löslich exprimiert werden konnten, wurden diese in eine Vektorserie mit Löslichkeitsfördernden Tags kloniert.^[79] Mit den Konstrukten pETGST_1a-PCP (GST-Tag) und pETtrx_1b-PCP (Trx-Tag) konnte lösliches Protein exprimiert werden, wobei die Ausbeuten des Thioredoxin-Fusionsprotein deutlich höher waren (s. Anhang, Abbildung A2). Weitere Testexpressionen zeigten jedoch starke Verunreinigungen im niederen kDa-Bereich. Diese können auf verkürzte Proteine zurückgeführt werden, die aufgrund des N-terminalen His₆-Tags des Thioredoxin-Fusionsproteins mit aufgereinigt wurden. Dies wurde schon bei der Aufreinigung der PCP-Domäne des für die β -Hydroxylierung von Tyrosin nötigen externen AT-Moduls der Balhimycin-Synthese beobachtet.^[41] Die Verwendung eines Thioredoxin-Fusionsprotein mit C-terminalem His-Tag führte zu einer höheren Reinheit der isolierten Proteine. Analog dazu wurden die Gene für die PCP-Domänen in den Vektor pETtrx_1c^[41] kloniert und die entsprechenden Fusionsproteine trx-PCP-His₆ mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Dies führte zu einer höheren Expression von löslichem Protein und zu deutlich weniger Verunreinigungen (s. Anhang, Abbildung A3). Bei der anschließenden Größenausschlusschromatographie zeigten sich erste Unterschiede zwischen den einzelnen Domänen. Von PCP₇ und PCP₁₀ konnten zwei Proteinformen aufgereinigt werden: die erste, instabilere Form eluierte mit dem Ausschlussvolumen der Säule, während die zweite, deutlich stabilere Spezies zu einem späteren Zeitpunkt eluierte, welcher auf ein Dimer schließen lässt. Erneute Gelfiltration dieser stabileren Form deutete darauf hin, dass diese mit der Zeit

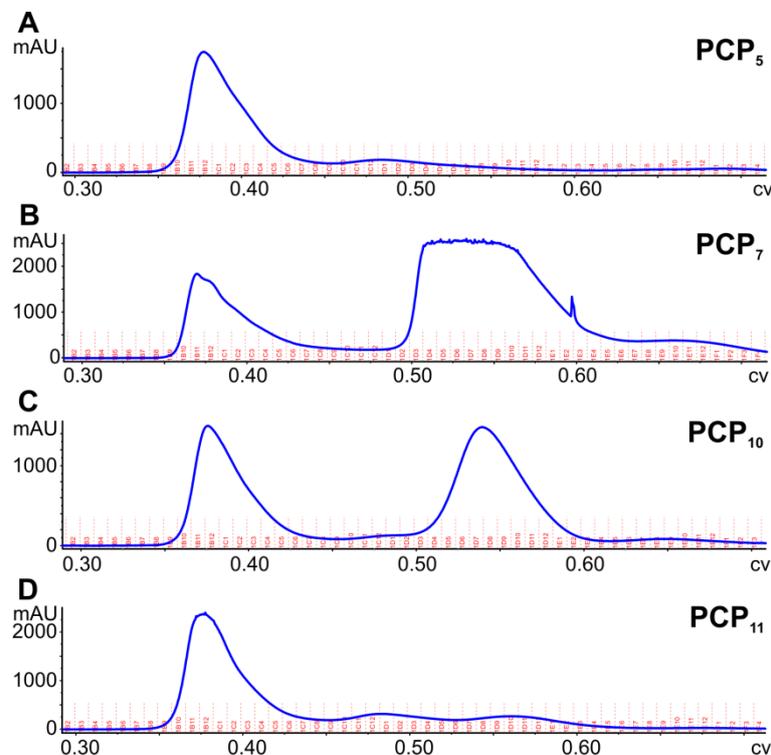


Abbildung 35. UV-Spur der Größenausschlusschromatographie von PCP₅ (A), PCP₇ (B), PCP₁₀ (C) und PCP₁₁ (D.) (CV = column volumes - Säulenvolumen).

langsam aggregiert und sich in die zuerst eluierende Form umwandelt. Von den stabileren, später eluierten Proteinformen von PCP₇ und PCP₁₀ konnten ~30 mg pro Liter Expressionsmedium isoliert werden. Von PCP₅ und PCP₁₁ ließ sich hingegen nur die erste, instabilere Form aufreinigen (s. Abbildung 35), auch die Ausbeuten waren mit 2-9 mg pro Liter Medium deutlich geringer.

Um die dramatischen Unterschiede bei der Aufreinigung der PCP-Domänen besser zu verstehen, wurden die Aminosäuresequenzen der vier PCP-Domänen zusammen mit deren vorhergesagten Sekundärstrukturelementen verglichen^[83] und deren Hydrophobizität berechnet^[89,132] (s. Abbildung 36 und Tabelle 13). Dieser Vergleich zeigte, dass PCP₇ und PCP₁₀ deutlich hydrophiler sind als PCP₅ und PCP₁₁ und dass die meisten Unterschiede in der Sequenz innerhalb der ersten Helix zu finden sind. Durch ortsspezifische Mutagenese wurden daher die Sequenzen von PCP₅ und PCP₁₁ an die von PCP₇ angeglichen (s. Abbildung 36). Zwar konnten bei den modifizierten Proteinen *mut*PCP₅ und *mut*PCP₁₁ keine Änderungen beim Verhalten während der Aufreinigung festgestellt werden, jedoch zeigte *mut*PCP₅ etwas verbesserte Ausbeuten sowohl bei der Beladungsreaktion als auch bei der eigentlichen Hydroxylierung (s. Abschnitt 5.2.3).



Abbildung 36. Alignment der PCP-Domänen 7, 5, 11 und 10. Mithilfe von ortsspezifischer Mutagenese wurden die Reste 9+10 (PQ) und 15 (C) von PCP₅ und PCP₁₁ zu „ET“ bzw. „R“ geändert, um die Sequenz von PCP₇ zu imitieren.

Tabelle 13. Hydrophobizitätswerte und aliphatische Indizes.^[89]

PCP-Domäne	GRAVY ^a	Aliphatische Indizes ^b
PCP ₇	-0.450	86
PCP ₅	0.338	106
PCP ₁₁	0.323	101
PCP ₁₀	0.160	99

^a Der GRAVY-Wert (Grand Average of Hydropathy) von einem Protein wird berechnet aus der Summe der Hydrophobizitätswerte^[132] dividiert durch die Anzahl der Aminosäurereste.^[89]

^b Der Aliphatische Index eines Proteins ist definiert als das relative Volumen, welches von aliphatischen Seitenketten (Ala, Val, Ile, Leu) eingenommen wird.^[89,133]

Die Gründe für die geringe Stabilität und für das unterschiedliche Elutionsverhalten der PCP-Domänen können vielfältig sein. Die Grenzen der PCP-Domänen wurden durch Sequenzverglei-

che und Sekundärstrukturvorhersagen ermittelt,^[82-84] sie können jedoch im Einzelfall abweichen. Darüber hinaus binden einige Bereiche der PCP-Domäne innerhalb der Synthetase *in vivo* an weitere angrenzende Domänen und bilden so wichtige Protein-Protein-Wechselwirkungen aus. Da diese Bereiche in der isolierten PCP-Domäne freiliegen, könnte dies zu einer fehlerhaften oder unzureichenden Faltung oder zur Aggregation führen. Ein ähnlicher Fall ist die BpsD_PCP-Domäne, die mit OxyD interagiert: auch hier war nur eine Expression mit Hilfe von Löslichkeitsfördernden Tags möglich und das aufgereinigte Protein degradierte nach etwa 24 h.^[41]

5.2.2 UV-Vis-Charakterisierung und Substrat-Bindungsstudien

Als Cytochrom P450-Monooxygenase zeigte P450_{sky} ein charakteristisches UV-Vis-Spektrum mit λ_{\max} bei 419 nm und α bzw. β -Banden bei $\lambda = 567$ bzw. 538 nm (s. Abbildung 37). Wie auch bei OxyD führte die Titration von Tyrosin bis zu einer Konzentration von 1,5 mM zu P450_{sky} zu keiner Veränderung des Spektrums, während L-Tyrosin-SNAC kooperatives Bindungsverhalten zeigte ($K_a = 10 \pm 0,2$ mM, $n = 4$, s. Anhang, Abbildung A4).^[41]

Um die Bindung der putativ natürlichen Substrate, der beladenen PCP-Domänen, an P450_{sky} zu untersuchen, wurden die aufgereinigten Apo-Enzyme zunächst mit Hilfe der promiskuitiven Phosphopantetheintransferase Sfp aus *Bacillus subtilis*^[87] und den synthetisierten Aminoacyl-CoA-Derivaten gleichzeitig phosphopantetheinyliert und beladen (s. Abschnitt 4.3.6). Die Untersuchung der Beladungseffizienzen ist in Abschnitt 5.2.3 und Tabelle 15 beschrieben. Die

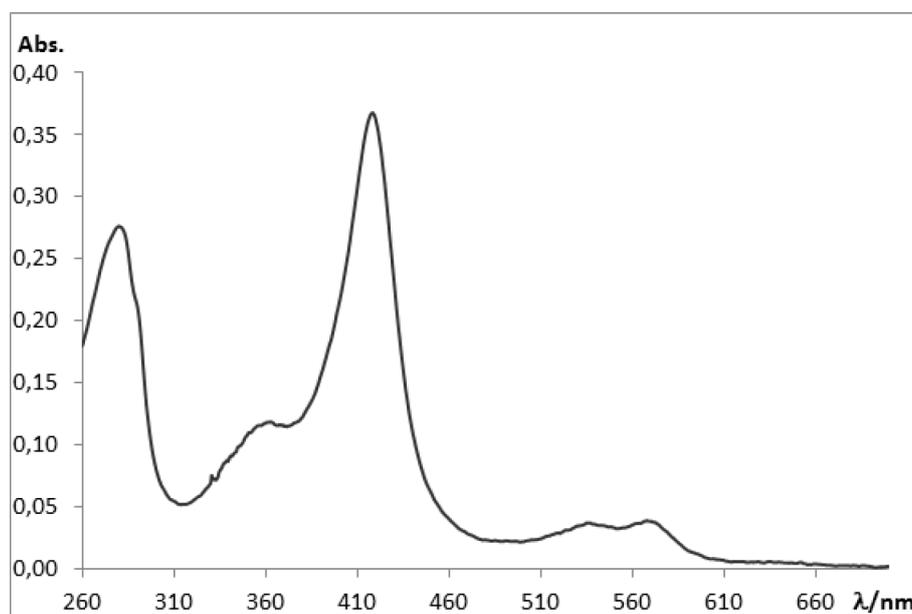


Abbildung 37. UV-Vis-Spektrum von P450_{sky}. Typisch für Cytochrom P450-Monooxygenasen sind die drei Absorptionsbanden $\lambda_{\max} = 419$ nm, $\lambda_a = 567$ nm und $\lambda_b = 538$ nm.

Zugabe des natürlichen Substrates (OMe)Tyr-PCP₇ führte zu einer typischen Typ I-Bindungskurve (s. Abbildung 38) mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 419 zu 392 nm. Dies weist auf einen Wechsel der Konfiguration von *low spin* zu *high spin* hin, der durch die Substratbindung und der damit einhergehenden Verdrängung von einem Wassermolekül als Liganden hervorgerufen wird. Der K_D -Wert betrug $89 \pm 3 \mu\text{M}$. Eine Kontrolltitration des unbeladenen Holo-Enzyms HS-PCP₇ zu P450_{sky} führte zu keiner Änderung des Absorptionsverhaltens. Phe-PCP₇ zeigte ähnlich starke und L-Leu-PCP₇ eine eher schwache Bindung an P450_{sky} ($K_D = 187 \pm 7 \mu\text{M}$ bzw. $3,8 \pm 0,5 \text{ mM}$), während für D-Leu-PCP₇ keine Bindung nachgewiesen werden konnte (s. Abbildung 39 und Tabelle 14). Im Vergleich zu den Dissoziationskonstanten des OxyD-Systems ($K_D \sim 10\text{-}20 \mu\text{M}$)^[41] fallen diese für P450_{sky} schwächer aus. Dies könnte durch die nötige Promiskuitivität von P450_{sky} erklärt werden, da P450_{sky} im Gegensatz zu OxyD an mehrere PCP-Domänen binden muss, um alle für Skyllamycin notwendigen Hydroxylierungen einführen zu können. Darüber hinaus bindet P450_{sky} an die Skyllamycin-Synthetase, eine zu starke Bindung könnte hier die Peptidsynthese behindern. OxyD hingegen bindet an ein einzelständiges AT-Modul außerhalb der Haupt-NRPS, hier könnte eine feste Bindung zu einer effektiveren Vorläufersynthese führen.

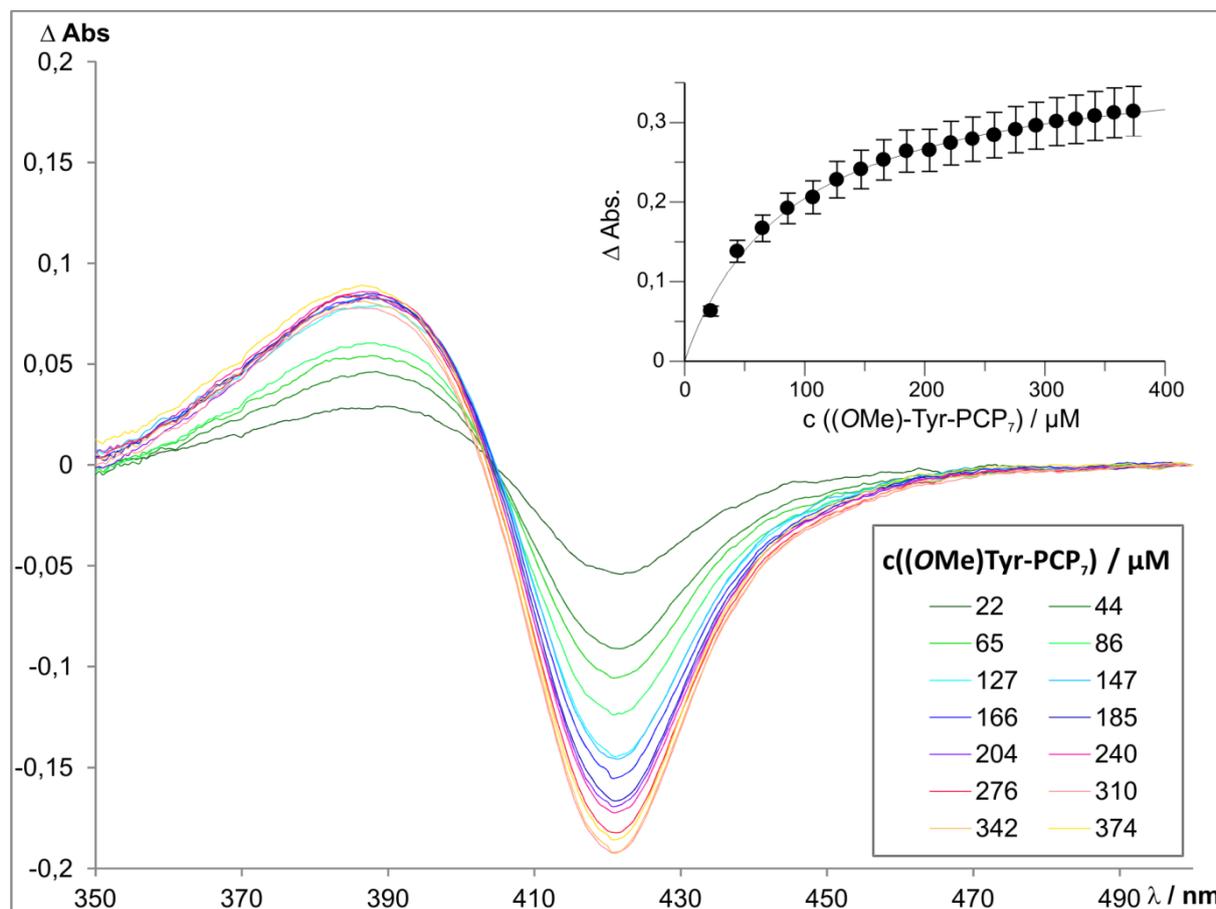


Abbildung 38. UV-Vis-Differenzspektrum der Bindung von (OMe)Tyr-PCP₇ an P450_{sky}.

Tabelle 14. UV-Vis-Charakterisierung der Substratbindung an P450_{sky}.

Substrat	Bindungsart	K_d/K_a	Spin-Änderung
L-(OMe)-Tyr-PCP ₇	Single site (Typ I)	$89 \pm 3 \mu\text{M}$	30%
L-Phe-PCP ₇	Single site (Typ I)	$187 \pm 7 \mu\text{M}$	23%
L-Leu-PCP ₇	Single site (Typ I)	$3.8 \pm 0.5 \text{ mM}$	14%
D-Leu-PCP ₇	keine Bindung	-	-
L-Tyr-SNAC	kooperativ ($n = 4$) ^a	$10 \pm 1 \text{ mM}$	34%
L-Tyr	keine Bindung	-	-
Imidazol	Single site (Typ II)	$2.2 \pm 0.1 \text{ mM}$	7%

^a Der Hill-Koeffizient n ist ein Maß für die Kooperativität des Enzyms.^[134]

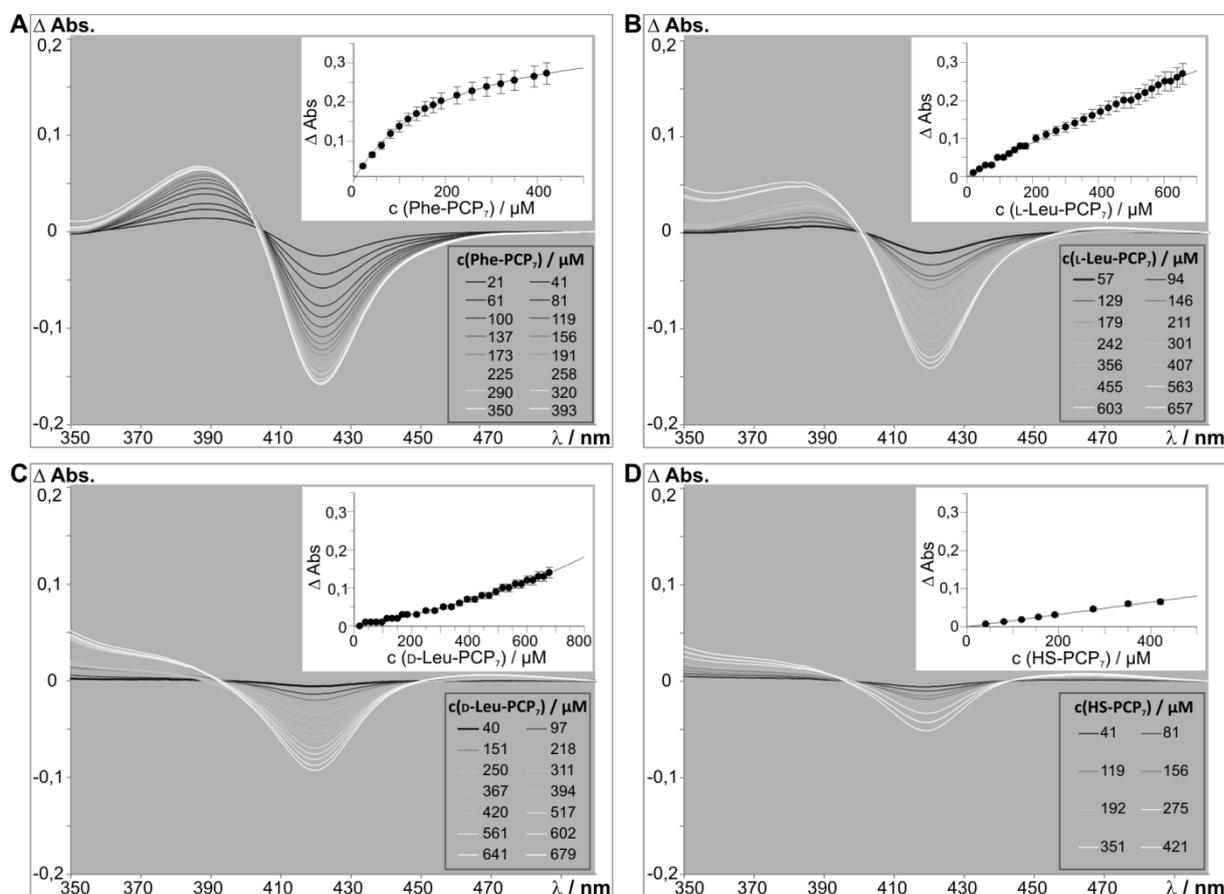


Abbildung 39. UV-Vis-Differenzspektren von Phe-PCP₇ (A), L-Leu-PCP₇ (B), D-Leu-PCP₇ (C) und HS-PCP₇ (D).

PCP₁₀ beladen mit L- oder D-Leucin zeigte keine Bindung an P450_{sky} (s. Anhang, Abbildung A5) – dies deutet darauf hin, dass P450_{sky} zwischen den unterschiedlichen PCP-Domänen unterscheidet und selektiv an jene bindet, die ein Signal für ein zu hydroxylierendes Substrat beinhaltet. Die Titration von Phe-PCP₅, Phe-*mut*PCP₅ sowie L- und D-Leucin gebunden an die native oder modifizierte Form von PCP₁₁ (Leu-PCP₁₁, Leu-*mut*PCP₁₁) zu P450_{sky} führte zu keiner Veränderung des Absorptionsspektrums von P450_{sky} (s. Anhang, Abbildung A5). Dies könnte auf

die instabile und möglicherweise falsch gefaltete Proteinform von PCP₅ und PCP₁₁ zurückgeführt werden (s. Abschnitt 5.2.1). Um die Ergebnisse aus den Bindungsstudien mit PCP₇ und PCP₁₀ zu verifizieren und zu überprüfen, ob trotz negativer Substrat-Bindungsstudien Hydroxylierungen an Phe-PCP₅ und Leu-PCP₁₁ nachgewiesen werden können, sollten die enzymatischen Hydroxylierungsreaktionen auf Umsatz hin untersucht werden (s. Abschnitt 5.2.3).

5.2.3 Hydroxylierungsassays mit P450_{sky}

Um die β -Hydroxylierungen an den PCP-gebundenen Aminosäuren nachzuweisen, wurden die in Abbildung 40 schematisch dargestellten Reaktionen durchgeführt. Eine Voraussetzung für eine P450-vermittelte Oxidation ist die Elektronenzufuhr von einem geeigneten Redoxpartner-System. Wie auch beispielsweise bei der Biosynthese von Balhimycin und Echinomycin,^[41,135] wurden im Skyllamycin-Gencluster keine Gene für entsprechende Redoxpartner gefunden. Daher wurden verschiedene bakterielle Redoxsysteme getestet (s. Anhang, Tabelle A1),^[106,136–140] wobei das Putidaredoxin/Putidaredoxin-Reduktase-System (Pdx/PdR) von der P450_{cam}-Monooxygenase (CYP101A1) die besten Ausbeuten erzielte.^[106] Um die Reaktion zu beenden und zur Vorbereitung auf die LC-MS-Analyse der Hydroxylierungsassays wurden die (hydroxylierten) Aminosäuren von den PCP-Domänen abgespalten. Die Optimierung dieser Aufarbeitung ergab, dass mit der reduktiven Spaltung des Thioesters durch Natriumborhydrid deutlich bessere Ausbeuten erzielt werden konnten als durch Hydrolyse durch Natriumhydroxid oder Bildung der entsprechenden Hydroxamsäure durch Hydroxylamin.^[107] Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass

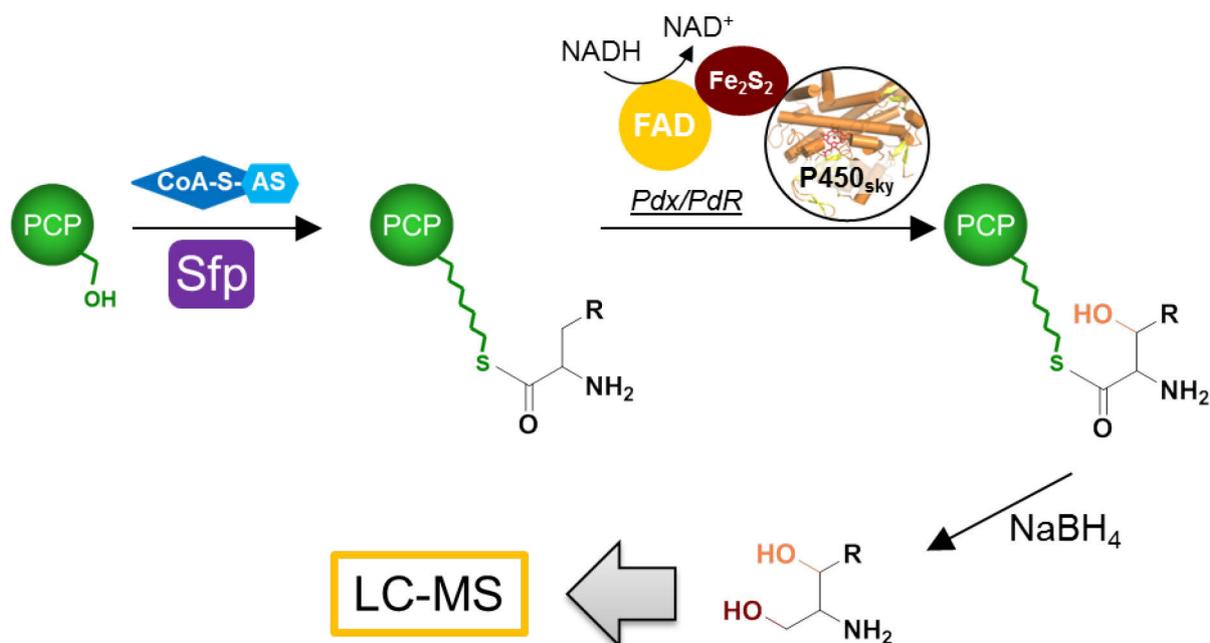


Abbildung 40. Übersicht über die zum Nachweis der β -Hydroxylierungen notwendigen Reaktionen.

die durch die Behandlung mit Natriumborhydrid entstandenen Aminoalkohole leicht von freien Aminosäuren unterschieden werden können, die durch Hydrolyse der Aminoacyl-CoAs oder Aminoacyl-PCPs entstehen können.

Um die Beladungseffizienz der PCP-Domänen durch die Phosphopantetheintransferase Sfp zu untersuchen, wurden die Aminoacyl-PCP-Domänen nach der Beladungsreaktion durch Aufreinigung über eine Gelfiltrationssäule von den überschüssigen Aminoacyl-CoA-Derivaten abgetrennt, mit NaBH₄ reaktiv gespalten und die Menge der Aminoalkohole durch Vergleich mit einer Positivkontrolle und internem Standard bestimmt (s. Tabelle 15 und Anhang, Abbildung A6). Die beobachteten Beladungsausbeuten spiegeln deutlich das Verhalten der entsprechenden Proteine während und nach der Aufreinigung wieder: so werden PCP₇ und PCP₁₀ zu hohen Anteilen mit Phenylalanin beladen (87% bzw. 66%), während PCP₅ und PCP₁₁ nur moderate Ausbeuten zeigen (23-36%).

Tabelle 15. Effizienz der Beladung der verschiedenen PCP-Domänen durch Sfp.

PCP	Beladung	Fehler
PCP ₅	22,9%	± 1,0%
<i>mut</i> PCP ₅	36,3%	± 1,5%
PCP ₇	87,0%	± 3,6%
PCP ₁₀	66,3%	± 2,8%
PCP ₁₁	31,3%	± 1,3%
<i>mut</i> PCP ₁₁	24,6%	± 1,0%

Mit dem nun etablierten System konnte gezeigt werden, dass (OMe)Tyr-PCP₇ unter den getesteten Bedingungen zu 31% zum hydroxylierten Produkt umgesetzt wurde. Auch die Hydroxylierung von Phe-PCP₅ und L-Leu-PCP₁₁ konnte nachgewiesen werden, jedoch waren die Umsätze hier sehr viel geringer (s. Abbildung 41 und Tabelle 16). Dies kann auf die beobachtete Aggregation und die entsprechend niedrigen Beladungseffizienzen von PCP₅ und PCP₁₁ zurückgeführt werden. Zu beachten ist hier, dass die modifizierte Domäne *mut*PCP₅ leicht höhere Beladungs- als auch Hydroxylierungsausbeuten aufwies (s. Tabelle 16 und Abbildung 42). Auch während der Assays blieb *mut*PCP₅ stabil in Lösung, während PCP₅ einen leichten Niederschlag zeigte. Zwischen PCP₁₁ und *mut*PCP₁₁ waren jedoch keine signifikanten Unterschiede bei der Beladung oder den Hydroxylierungsausbeuten zu erkennen. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass P450_{sky} die β-Hydroxylierung von drei verschiedenen Aminosäuren katalysiert, die an drei verschiedenen PCP-Domänen gebunden sind. Hiermit ist P450_{sky} das erste Beispiel einer Cytochrom P450-Monooxygenase, die *in vitro* und, wie bereits durch Gendeletion nachgewiesen,^[8,9] *in vivo* verschiedene

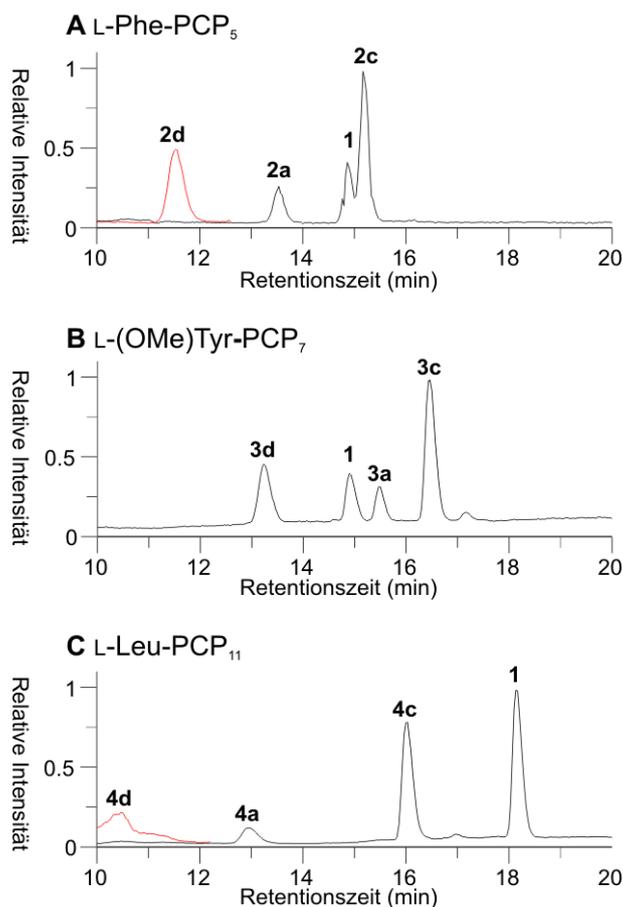


Abbildung 41. LC-MS-Analysen der Hydroxylierungsreaktionen von L-Phe-PCP₅ (A), L-(OMe)Tyr-PCP₇ (B) und L-Leu-PCP₁₁ (C). Signale des *Multiple Ion Current* (MIC, schwarz dargestellt), Signale des *Single Ion Monitoring* (SIM, rot dargestellt) sind multipliziert mit dem Faktor 100. **1** interner Standard, **2-4a** hydrolysierte Aminosäuren (Phe, (OMe)Tyr, Leu), **2-4c** reduzierte Substrate, **2-4d** reduzierte β -hydroxylierte Produkte. Detaillierte Strukturen sind in Abbildung 15, Retentionszeiten und Molekülmassen sind in Tabelle 9 dargestellt.

PCP-gebundene Substrate hydroxyliert. Darüber hinaus bildet P450_{sky} im Gegensatz zu allen anderen bis jetzt beschriebenen β -hydroxylierenden P450-Enzymen keinen separaten Biosyntheseweg für die Bereitstellung von hydroxylierten Vorläufern,^[41–43,65] sondern katalysiert die Hydroxylierung direkt an der Skyllamycin-Synthetase. In dieser Hinsicht ähnelt P450_{sky} den Biaryl- und Biarylether-bildenden Enzymen OxyA-OxyC aus der Glycopeptid-Biosynthese von Vancomycin und dessen Derivaten.^[33–38]

Nachdem die β -Hydroxylierung der natürlichen Substrate gezeigt werden konnte, sollte untersucht werden, welche weiteren Substrate von P450_{sky} akzeptiert werden. Wie in Tabelle 16 gezeigt, wurden außer (OMe)-Tyrosin auch an PCP₇ gebundenes Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan und Leucin hydroxyliert, wobei Tyr-PCP₇ einen niedrigeren Umsatz zeigte. Wegen der niedrigen Signal-Intensität für das natürliche, an PCP₁₁ gebundene Substrat Leucin und deren Derivate wurde die Hydroxylierung von PCP₁₁-gebundenem Phenylalanin untersucht. Die höhere Sensitivität des ESI-Massenspektrometers für Phenylalaninol und β -OH-Phenylalaninol zeigte

deutlich, dass PCP₁₁ als Substrat-PCP für P450_{sky} fungieren kann. Alles in allem zeigen diese Ergebnisse, dass P450_{sky} in der Lage ist, PCP-gebundene Aminosäuren mit großen, unpolaren Seitenketten zu hydroxylieren, während polare Seitenketten die enzymatische Umsetzung behindern. Diese Beobachtung wird von den Ergebnissen von Fütterungsexperimenten gestützt, welche darauf hinweisen, dass die O-Methylierung von Tyrosin vor der Aktivierung durch die A-Domäne und damit vor der β -Hydroxylierung stattfindet.

Tabelle 16. Durch P450_{sky} katalysierte Hydroxylierungsreaktionen und Umsetzungen von PCP-gebundenen Aminosäuren in Prozent.

PCP	Substrat	Rolle	Umsetzung (%)
PCP ₅	L-Phe	natürliches Substrat	0.5 ± 0.1
<i>mut</i> PCP ₅			2.8 ± 0.3
PCP ₇	L-(OMe)Tyr	natürliches Substrat	31.2 ± 1.5
PCP ₇	L-Phe		35.2 ± 1.4
PCP ₇	L-Leu		36.3 ± 7.6
PCP ₇	D-Leu		keine Umsetzung
PCP ₇	L-Tyr		18.3 ± 4.6
PCP ₇	L-Trp		25.1 ± 1.6
PCP ₁₀	L-Leu	natürliches Substrat	keine Umsetzung
PCP ₁₀	D-Leu		keine Umsetzung
PCP ₁₀	L-Phe		1.4 ± 0.1
PCP ₁₁	L-Leu	natürliches Substrat	1.9 ± 1.0
<i>mut</i> PCP ₁₁	L-Leu		2.2 ± 1.1
PCP ₁₁	D-Leu		keine Umsetzung
<i>mut</i> PCP ₁₁	D-Leu		keine Umsetzung
PCP ₁₁	L-Phe		0.4 ± 0.1

Ein interessantes Strukturmerkmal von Skyllamycin ist die D-Leu¹⁰- β -OH-D-Leu¹¹-Sequenz. Die A-Domänen sowohl von Modul 10 als auch von Modul 11 aktivieren laut Aminosäurespezifität-Vorhersagen L-Leucin,^[8,9] die spezifitätsbestimmenden Sequenzen („*specificity-conferring codes*“)^[141] der beiden A-Domänen sind identisch. Jedoch besitzt lediglich Modul 10 eine Epimerisierungsdomäne, die für die Umwandlung in D-Leucin zuständig ist. Daher wurde getestet, ob P450_{sky} zwischen D- und L-konfigurierten Aminosäuren unterscheidet. Hydroxylierungsassays von PCP₁₁-gebundenem D-Leucin ergaben kein Produkt (s. Tabelle 16), was darauf schließen lässt, dass die Epimerisierung von β -OH-L-Leucin zu β -OH-D-Leucin nach Aktivierung und β -Hydroxylierung stattfinden muss. Eine dafür zuständige externe Racemase wurde noch nicht identifiziert. Eine ähnliche Situation ist bei dem ersten Schritt der Biosynthese von Vancomycin zu finden, in dem von der A-Domäne in *in vitro*-Experimenten bevorzugt L-Leucin akzeptiert wird, im fertig prozessierten Peptid jedoch N-methyliertes D-Leucin vorhanden ist. Auch hier gibt es weder eine E-

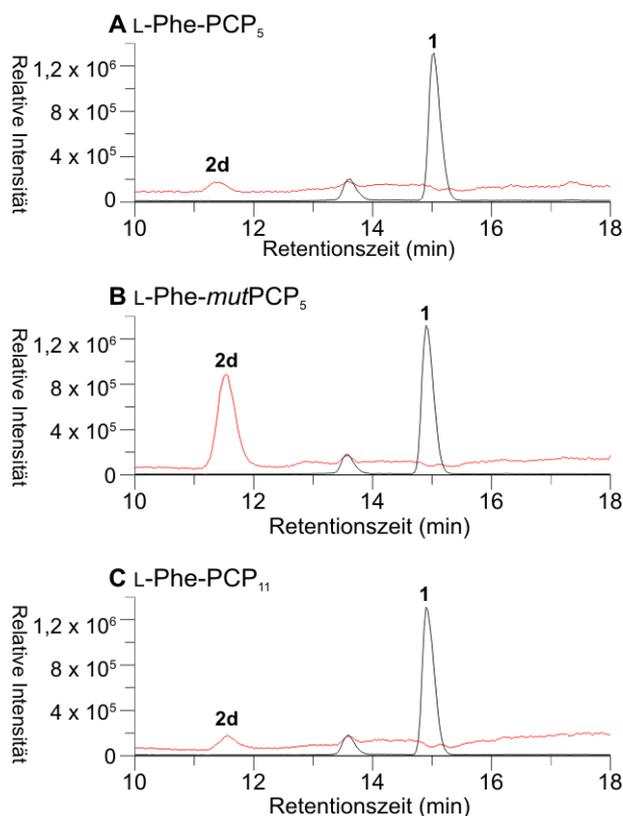


Abbildung 42. LC-MS-Analysen der Hydroxylierungsreaktionen von L-Phe-PCP₅ (A), L-Phe-mutPCP₅ (B) und L-Phe-PCP₁₁ (C). SIM von β -OH-Phenylalaninol (2d, $[M+H]^+ = 168$ m/z) multipliziert mit dem Faktor 10 (rot dargestellt), SIM des internen Standards (4-Fluorophenylalanin, 1, $[M+H]^+ = 184$ m/z, schwarz dargestellt).

Domäne im entsprechenden Modul, noch wurde eine mögliche Racemase im Gencluster gefunden.^[142]

Die Tatsache, dass an Position 10 und 11 von Skyllamycin Leucin eingebaut wird, wirft die Frage auf, wie das Enzym zwischen L-Leu-PCP₁₀ und L-Leu-PCP₁₁ unterscheidet, um eine ungewollte β -Hydroxylierung von L-Leu¹⁰ zu verhindern. Für OxyB wurde gezeigt, dass das lineare Vorläuferpeptid von Vancomycin sowohl an PCP-6 als auch an PCP-7 gebunden zum monozyklischen Produkt umgesetzt werden kann, wobei die Reaktion mit PCP-7-gebundenen Substraten wesentlich schneller verlief.^[39] Daher wurden L-Leu-PCP₁₀ und D-Leu-PCP₁₀ auf Hydroxylierung durch P450_{sky} untersucht, jedoch wurde für beide Substrate keine Umsetzung gefunden. Zwar wurden geringe Mengen an hydroxyliertem Produkt nach der Umsetzung von L-Phe-PCP₁₀ detektiert, im Vergleich zur Hydroxylierung von Phe-PCP₇ ist diese jedoch um das 25-fache reduziert. Mit einbezogen, dass Phe-PCP₁₀ ein artifizielles Substrat darstellt, da Phenylalanin *in vivo* von der entsprechenden A-Domäne nicht akzeptiert werden würde, lässt sich daraus schließen, dass PCP₁₀ keine geeignete PCP-Domäne für die β -Hydroxylierung darstellt. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit den Bindungsstudien, bei denen ebenfalls keine Bindung von PCP₁₀ an P450_{sky} nachgewiesen werden konnte (s. Abschnitt 5.2.2). Somit ist P450_{sky} in der Lage, zwischen Substrat- und Nicht-

Substrat-PCP-Domänen zu unterscheiden und sorgt dadurch für die selektive Hydroxylierung von Leu¹¹.

Um zu untersuchen, wie wichtig die PCP-Domäne bei der β -Hydroxylierung von P450_{sky} ist, wurden verschiedene Substrate getestet, die nicht an eine PCP-Domäne gebunden sind oder die deren Phosphopantethein-Arm teilweise imitieren. Die bei der Biosynthese von Vancomycin für den ersten oxidativen Ringschluss verantwortliche P450-Monooxygenase OxyB katalysiert die Oxidation auch an CoA- und SNAC-Derivaten und dem freien Peptid, wenn auch zu einem viel geringeren Anteil als an dem PCP-gebundenen Peptid.^[39] Im Gegensatz dazu lässt sich keine Bindung von nicht-PCP-gebundenen Substraten an OxyD feststellen.^[41] Daher wurden die in Abbildung 43 gezeigten Substrate dem Hydroxylierungsassay unterzogen. Für keine der getesteten freien Aminosäuren, SNAC-Derivate, PPant-Analoga oder Aminoacyl-CoA-Derivate

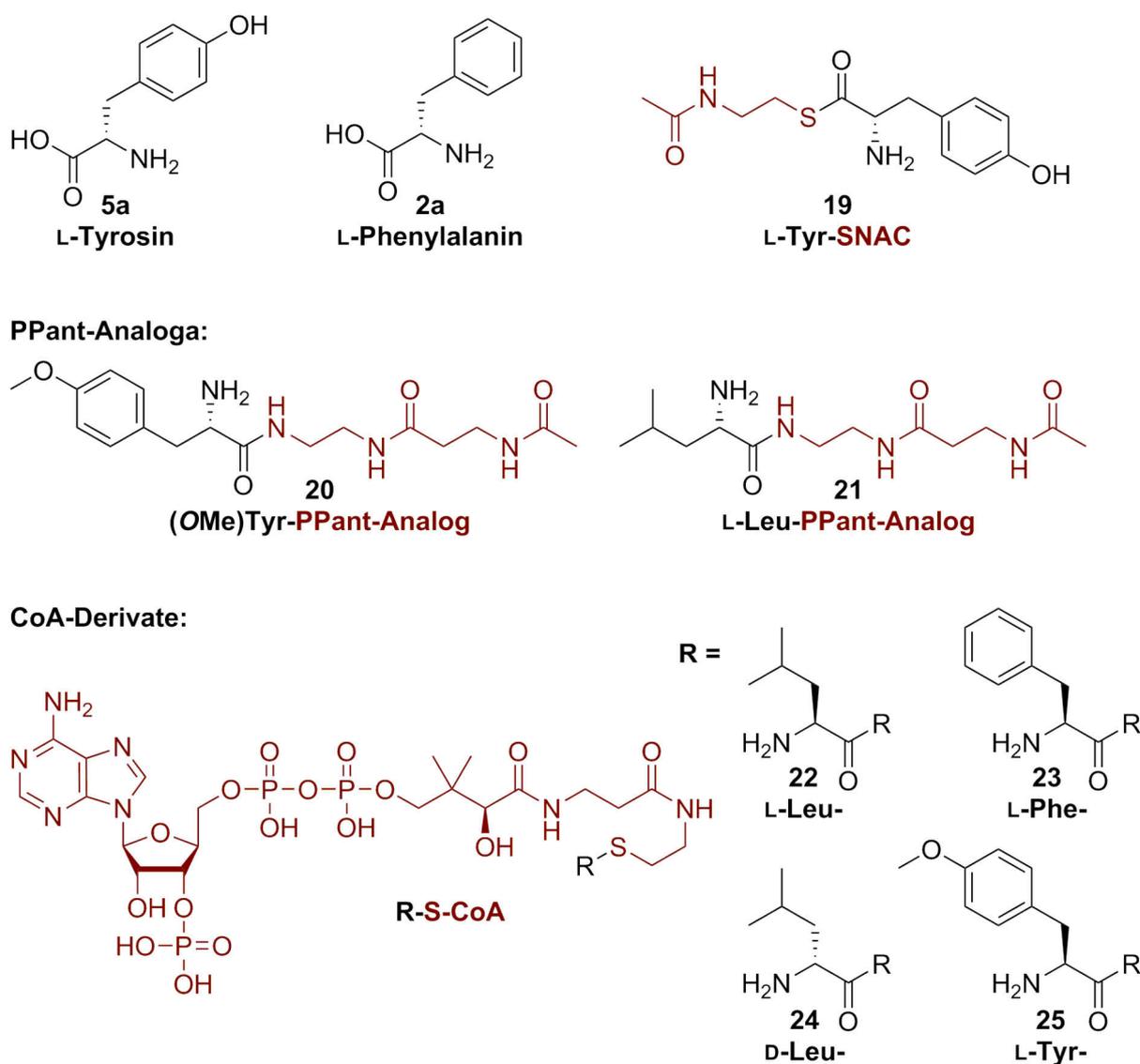


Abbildung 43. Getestete Substrate, die von P450_{sky} nicht für eine β -Hydroxylierung akzeptiert werden.

konnte ein Produkt nachgewiesen werden. Während die PCP-Domäne also für die β -Hydroxylierung notwendig ist, wurde hier wie auch im Falle von OxyD^[41] eine niedrigere Selektivität von P450_{sky} gegenüber den PCP-gebundenen Aminosäuren gezeigt (s. Tabelle 16). Es wird postuliert, dass dies mit der Selektivität der P450-Monooxygenase für die PCP-Domänen in Verbindung steht während die Selektivität für die einzubauende Aminosäure von der stromaufwärts gelegenen A-Domäne eingeführt wird.

Die bisher veröffentlichten β -Hydroxylierungen an PCP-gebundenen Substraten durch Cytochrom P450-Monooxygenasen resultierten in (*R*)-hydroxylierten Produkten^[41,42,65,143] Laut Strukturaufklärung sind die in Skyllamycin eingeführten β -Hydroxylierungen (*S*)-konfiguriert,^[71] dies lässt darauf schließen, dass P450_{sky} eine (*S*)-Hydroxylierung einführt. Diese Vermutung konnte belegt werden, indem das P450_{sky}-Produkt β -OH-L-Phe-PCP₇ mit Natronlauge hydrolysiert und die so erhaltene freie, β -hydroxylierte Aminosäure mit einer chiralen HPLC-Säule analysiert und deren Chromatogramme mit denen von enantiomerenreinen Standards verglichen wurden (s. Abschnitt 4.3.8, Tabelle 10 und Anhang, Abbildung A7).^[144]

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studien, dass P450_{sky} eine Cytochrom P450-Monooxygenase ist, die die β -Hydroxylierung von drei verschiedenen Aminosäuren katalysiert, die an drei verschiedenen PCP-Domänen der Skyllamycin-Synthetase gebunden sind. P450_{sky} akzeptiert nur PCP-gebundene Substrate, fügt die Hydroxylierungen während der Peptid-Synthese an der NRPS ein und differenziert darüber hinaus zwischen den drei Substrat-PCP-Domänen und anderen Nicht-Substrat-PCP-Domänen der NRPS. Dies unterscheidet P450_{sky} von den bekannten β -hydroxylierenden P450-Monooxygenasen und deren Wirkungsweise an externen AT-Modulen.

5.2.4 Kristallstruktur von P450_{sky}

Die Kristallisation und Strukturlösung von P450_{sky} erfolgte durch Dr. Max Cryle (MPI Heidelberg).^[144] Es konnten zwei verschiedene Strukturen aus zwei verschiedenen Kristallisationsbedingungen (PEG-3350 oder NH₄(SO₄)₂ als Präzipitans) gelöst werden, die sich mit einem RMSD-Wert von 0,9 Å jedoch sehr ähnlich sind (s. Tabelle 17). Die Auflösung beträgt 1,9 Å bei der PEG- und 2,7 Å bei der Ammoniumsulfat-Bedingung. P450_{sky} zeigt die typische Cytochrom P450-Faltung: es besteht größtenteils aus α -Helices, die den an Cys380 gebundenen Thiolat-Häm-Cofaktor in der Mitte des Proteins halten (Abbildung 44A).

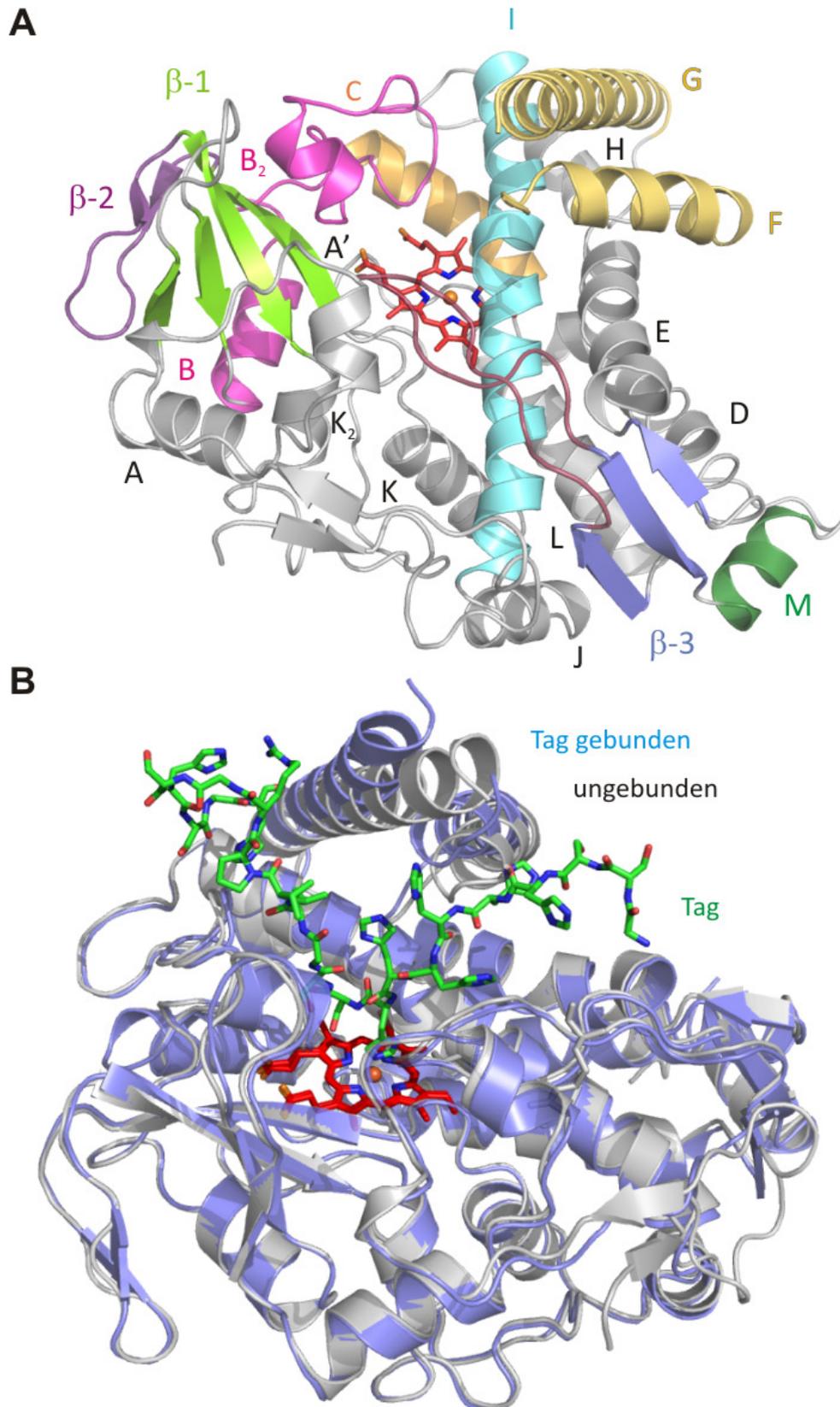


Abbildung 44. A: Kristallstruktur von P450_{sky}. Strukturelle Motive sind farblich hervorgehoben: B-B₂-Loop magenta, C-Helix orange, F-G-Helices gelb, I-Helix hellblau, β -1-Faltblatt grün, β -2-Faltblatt lila, β -Faltblatt dunkelblau, M-Helix dunkelgrün. **B: Strukturen von P450_{sky} mit gebundenem Tag (blau) und in ungebundener Form (grau)** (Abbildung von Dr. Max J. Cryle, MPI Heidelberg).

Das Enzym besteht aus 3 β -Strängen und 16 α -Helices, von denen die Helices D, E, I und L den Kern des Proteins bilden. Der größte Unterschied zwischen den Strukturen aus den verschiedenen Bedingungen ist der His₆-Tag eines Nachbarmoleküls, der bei der Ammoniumsulfat-Struktur in das aktive Zentrum von P450_{sky} hineinreicht und mit einem Histidin (His010) an das Häm-Eisen bindet. Verglichen mit der PEG-Struktur hat diese Bindung des His₆-Tags eine leichte Verschiebung der F- und G-Helices zum N-Terminus der I-Helix zur Folge (Abbildung 44B). Wie bei anderen Strukturen von Cytochrom P450-Monooxygenasen, die PCP-Domänen als Substrat binden, ist das aktive Zentrum in hohem Maße dem Lösungsmittel ausgesetzt.^[36,37,41,145] Die Bindung der PCP-Domäne an das Enzym verschließt wahrscheinlich den Zugang zum aktiven Zentrum und verhindert somit das Eindringen von Wasser und anderen störenden Stoffen.

Eine ungewöhnliche, zusätzliche C-terminale α -Helix (M-Helix) in der P450_{sky}-Struktur ist senkrecht zur L-Helix gelegen. Diese M-Helix könnte für die Interaktion mit den Redoxpartner-Proteinen von P450_{sky} oder mit NRPS-Domänen in der Nähe der Substrat-PCPs verantwortlich sein.

Die einzige funktionell nahe Verwandte von P450_{sky}, dessen Struktur bekannt ist, ist OxyD, die für die β -Hydroxylierung von PCP-gebundenem Tyrosin während der Vancomycin-Synthese zuständig ist.^[41] OxyD besitzt eine Sequenzidentität von 32% und einen RMSD-Wert von 2,2 Å zu P450_{sky}. Andere strukturell verwandte Enzyme sind der P450_{Biol}-ACP-Komplex^[146] und andere P450-Monooxygenasen, die ähnlich große Substrate wie Steroide, Makrolide oder Peptide akzeptieren.^[147–151]

Ausgehend von Sequenzvergleichen und der Struktur von OxyD wurde von Cryle et al. ein 23-Aminosäuren-Aminoacyl-Bindemotiv vorgeschlagen.^[41] Ein Sequenzvergleich von P450_{sky} zeigte 96% Identität mit dieser vorgeschlagenen Konsensussequenz. Es wird vermutet, dass diese Konsensussequenz die putative PCP-Bindestelle dieser P450-Klasse bildet. Sie besteht aus N- und C-terminalen Bereichen des B-B₂-Loops, der helikalen Regionen vor und nach dem F-G-Loop, N-terminalen Teilen der I-Helix und einigen Resten des β -1-Faltblattes (s. Abbildung 45). Die große Übereinstimmung von P450_{sky} mit dieser Konsensussequenz lässt darauf schließen, dass die PCP-Bindung von P450_{sky} sehr ähnlich zu der von OxyD und anderen Aminoacyl-PCP-bindenden P450-Monooxygenasen ist. Die Bindung und Orientierung des His₆-Tags in der Ammoniumsulfat-Bedingung legt nahe, dass die Bindung der PCP-Domäne an P450_{sky} ähnlich der Bindung der Acyl-ACP-Domäne im P450_{Biol}-Acyl-ACP-Komplex ist.^[146]

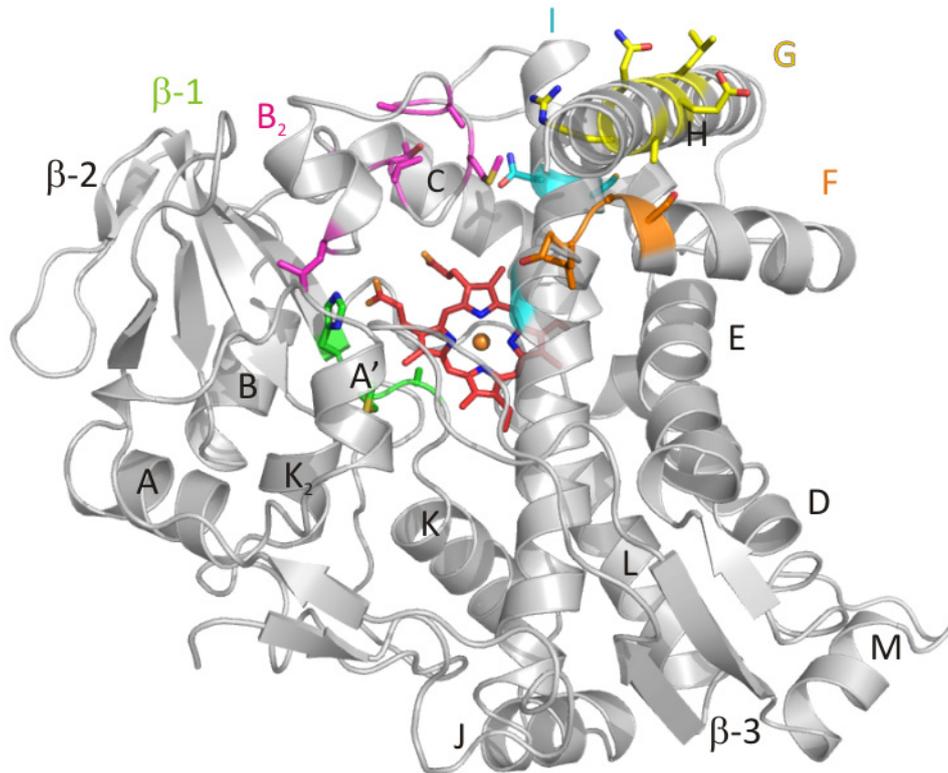


Abbildung 45. Putative PCP-Bindestellen (farblich hervorgehoben) (Abbildung von Dr. Max J. Cryle, MPI Heidelberg).

Tabelle 17. Kristallographische Daten für P450_{sky} (CYP163B3).

	P450 _{sky} PEG	P450 _{sky} (NH ₄) ₂ SO ₄
Datensammlung		
Raumgruppe	P2 ₁ (4)	P3 ₂ 2 ₁ (154)
Einheitszellparameter	48.0, 79.6, 62.9	91.6, 91.6, 123.3
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	$\beta = 104.5^\circ$	
Moleküle/asymmetr. Einheit	1	1
Röntgenquelle	SLS X10SA	SLS X10SA
Wellenlänge (Å)	0.9789	1.0000
Auflösung (Å) ^a	40.0 – 1.9	40.0 – 2.7
R_{merge} ^a	0.08 (0.37)	0.08 (0.57)
$I/\sigma I$ ^a	16.6 (4.6)	10.6 (1.8)
Vollständigkeit (%) ^a	98.5 (94.8)	96.9 (98.2)
Redundanz	6.6	2.8
Wilson <i>B</i> -Faktor (Å ²)	17.9	64.6
Verfeinerung		
Verwendete Reflexe	35636	16458
Auflösung bei Verfeinerung	40.0 – 1.9	40.0 – 2.7
R_{work} / R_{free} (%) ^b	17.9 / 22.1	24.8 / 29.3
TLS-Gruppen	-14-70; 71-166; 167-187; 188-216; 217-416; 417-423	-21-56; 57-151; 152-193; 194-304; 305-384; 385-421
Atome im Modell	3989	3506
Protein	3455	3435
Häm	43	43
Ethylenglykol	56	-
PEG	17	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	15
Wasser	418	13
<i>B</i> -Faktoren		
Protein	23.2	59.9
Häm	12.3	31.0
Ethylenglykol	30.5	-
PEG	11.6	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	53.0
Wasser	30.4	39.9
RMSD		
Bindungswinkel (Å)	0.011	0.006
Bindungswinkel (°)	1.258	0.883
Ramachandran-Statistik ^c	97.2/ 2.5/ 0.2 ^e	95.4/ 4.1/ 0.5 ^f
Ramachandran-Statistik ^d	97.2/ 1/ 0/ 1.44	95.2/ 2/ 4/ 1.69
PDB Code	4L0E	4L0F

^a Werte in Klammern beziehen sich auf die Bereiche höchster Auflösung (2.2–2.1 Å; 2.3–2.2 Å).

^b $R_{work} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$; R_{free} basierend auf 5% der Daten, die nicht für die Verfeinerung verwendet wurden.

^c Berechnet mit Procheck;^[152] Prozentsatz der Seitenketten in bevorzugten/erlaubten/nicht erlaubten Regionen.

^d Berechnet mit Molprobability;^[153,154] Prozentsatz der Seitenketten in bevorzugtesten Regionen; nicht erlaubte Seitenketten und Prozentsatz und Prozentsatz „bad rotamers“; Molprobability score.

^e Seitenketten in nicht erlaubten Regionen: Ile-153 (pre-Proilin helikale Seitenkette, definierte Dichte)

^f Seitenketten in nicht erlaubten Regionen: Pro-51 (flexible Loop-Region), Ile-153 (pre-Proilin helikale Seitenkette, definierte Dichte)

6 Ausblick

6.1 α -Hydroxylierung von Glycin

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die für die α -Hydroxylierung von Glycin verantwortlichen Flavin-abhängigen Enzyme SkyRed und SkyMono heterolog exprimiert und aufgereinigt werden. Die Aktivität der Reduktase wurde unter anaeroben Bedingungen nachgewiesen und die Kristallstruktur bis zu einer Auflösung von 2,35 Å gelöst. Aufgrund der vorhandenen biochemischen und strukturellen Daten wird ein geordneter, sequenzieller Reaktionsmechanismus postuliert, bei dem zunächst das Flavin und anschließend NADH bindet. Für eine abschließende biochemische Charakterisierung wäre eine genaue Beschreibung dieses Mechanismus mit Hilfe von kinetischen Daten wünschenswert.

Für die Monooxygenase SkyMono konnte nachgewiesen werden, dass FAD_{red} mit hoher Affinität an das Enzym gebunden wird. Nachweise für die Bildung des Hydroperoxid-Intermediates und für die eigentliche Hydroxylierungsreaktion stehen jedoch noch aus. Die ITC-Messung sollte mit FMN_{red} und FMN_{ox} wiederholt werden, um zu überprüfen ob neben FAD_{red} auch FMN_{red} gebunden wird. Es ist denkbar, dass die Hydroperoxid-Bildung nur mit einem bestimmten Flavin-Cofaktor möglich ist. So reduziert beispielsweise die Flavin-Reduktase PheA2 sowohl FAD als auch FMN und Riboflavin, die Aktivität der zugehörigen Monooxygenase PheA ist jedoch streng FAD-abhängig.^[57] Des Weiteren ist das Substrat für die Monooxygenase noch nicht bekannt. Die unregulierte α -Hydroxylierung von freiem Glycin ist biochemisch nicht sinnvoll, da dadurch möglicherweise mehr Glycin aus dem Primärmetabolismus entfernt wird als nötig. Zudem ist α -OH-Glycin chemisch instabil. Wahrscheinlicher ist daher die Hydroxylierung des fertigen Peptides nach Freisetzung durch die TE-Domäne. Berechnungen und NMR-Studien legen nahe, dass die α -Hydroxygruppe in Skyllamycin (*S*)-konfiguriert ist.^[71] In dem Fall zeigt die Hydroxygruppe nach außen, die Seite wäre damit für ein Enzym gut zugänglich. Auch bei der Biosynthese von Pristinamycin II_A und Actinorhodin, bei denen ähnliche Flavin-abhängige Enzymsysteme mitwir-

ken, ist die Hydroxylierung einer der letzten Schritte der Biosynthese.^[52,125,155] Nach dem Nachweis des Hydroperoxid-Intermediates von SkyMono sollte daher Hydroxylierungsreaktionen mit unhydroxyliertem Skyllamycin durchgeführt werden, welches aus der $\Delta mono$ -Mutante isoliert werden kann.^[8] Weitere Hinweise auf die Identität des Substrates von SkyMono könnte die Kristallstruktur liefern. Besonders interessant wäre hierbei eine Struktur mit gebundenem reduzierten Flavin, da eine solche Struktur in der Literatur noch nicht bekannt ist.

6.2 β -Hydroxylierungen von L-Phe⁵, L-(OMe)-Tyr⁷ und D-Leu¹¹

Es konnte gezeigt werden, dass P450_{sky} für die β -Hydroxylierung von L-Phe⁵, L-(OMe)-Tyr⁷ und D-Leu¹¹ in Skyllamycin verantwortlich ist. Hierbei akzeptiert P450_{sky} nur die PCP-gebundenen L-konfigurierten Aminosäuren. Während die Hydroxylierung von PCP₇-gebundenen Aminosäuren in guten Ausbeuten nachgewiesen werden konnte, zeigten PCP₅- und PCP₁₁-gebundene Aminosäuren nur geringe Umsetzungsraten. Dies könnte an dem Sequenzbereich der PCP-Domänen liegen, der für die Klonierung verwendet wurde. Für die Klonierung von PCP₇ und PCP₁₀ wurde der Bereich gewählt, der 40 Aminosäuren stromaufwärts und 39 Aminosäuren stromabwärts vom konservierten Serin umfasst (40-Ser-39), während bei PCP₅ und PCP₁₁ lediglich der Bereich 39-Ser-38 kloniert wurde. Ein Konstrukt mit einem größeren Ausschnitt könnte bereits zu einer Verbesserung der Löslichkeit und Stabilität führen, wie im Falle von PCP-6 der Vancomycin-Synthetase gezeigt werden konnte.^[39]

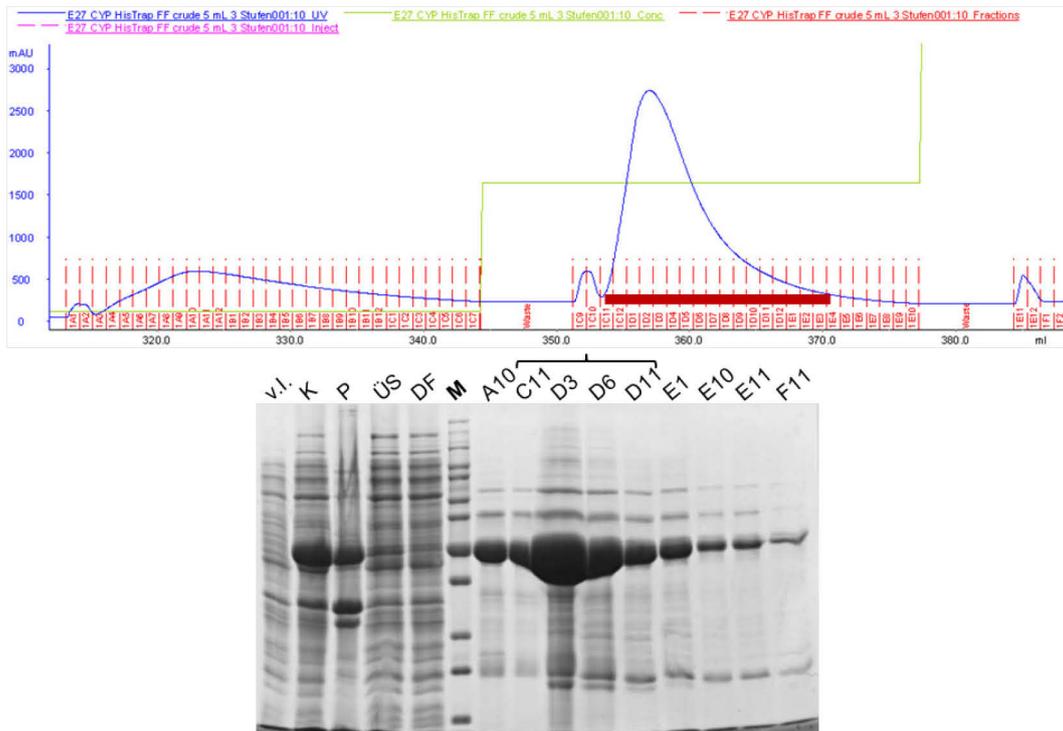
Weiterhin unklar bei der Biosynthese von Skyllamycin ist der Zeitpunkt und die Art der Epimerisierung von β -OH-L-Leu¹¹ zu β -OH-D-Leu¹¹. Im Gegensatz zu Modul 10 besitzt Modul 11 keine Epimerisierungsdomäne. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Epimerisierung in dem Fall bereits vor der β -Hydroxylierung stattfinden könnte und das so entstandene PCP-gebundene D-Leu dann nicht mehr von P450_{sky} akzeptiert werden würde. Eine externe Epimerase könnte diese Reaktion an dem PCP-gebundenen β -OH-L-Leu¹¹ ausführen, die benötigte Spezifität könnte dann von der C-Domäne aus Modul 11 eingeführt werden. Im Gencluster von Skyllamycin befinden sich einige hypothetische Proteine, die auf diese Funktion näher untersucht werden könnten.

Von P450_{sky} konnte die Kristallstruktur bis 1,9 Å gelöst werden. Die Struktur zeigt eine typische Cytochrom P450-Faltung mit einem weit geöffneten aktiven Zentrum, welches von einem großen Substrat wie die PCP-Domäne bedeckt werden könnte. Zwar lieferte besonders die Struktur der Ammoniumsulfat-Bedingung durch die Bindung des His₆-Tags Hinweise auf die Bindung des

Substrates, dennoch wäre es interessant, durch Co-Kristallisation die Struktur von P450_{sky} zusammen mit einer PCP-Domäne mit gebundener Aminosäure zu lösen und somit die Interaktion von PCP-Domäne und Cytochrom P450 zu untersuchen.

7 Anhang

His-Trap:



ResourceQ:

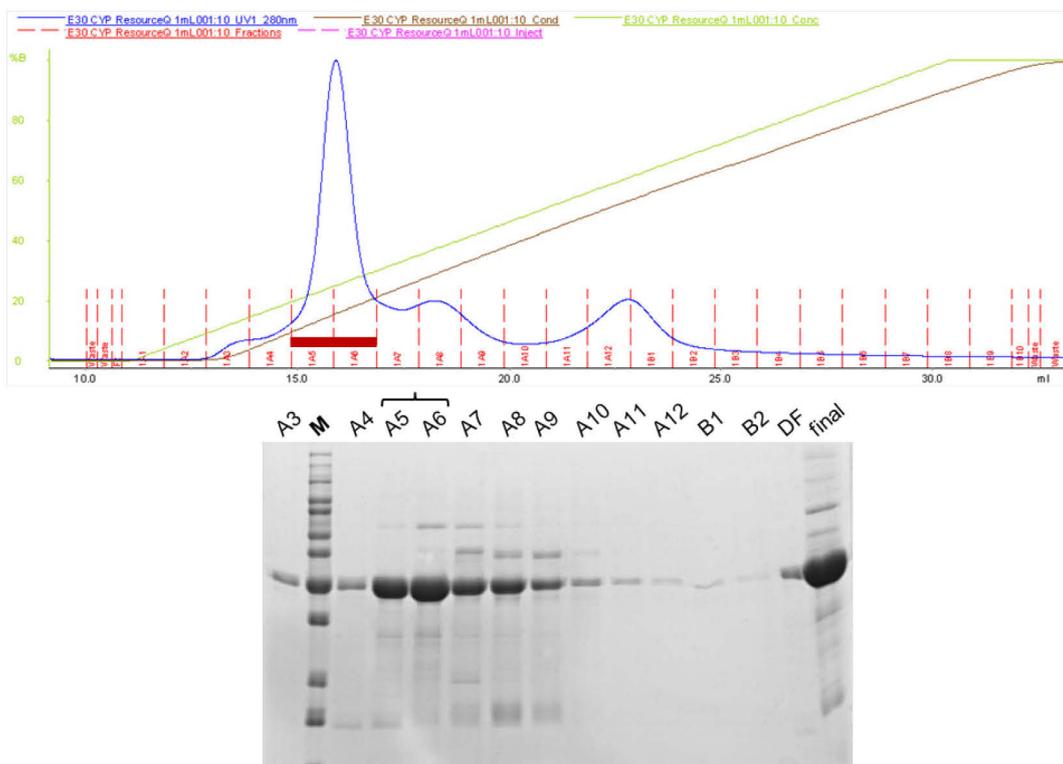


Abbildung A1. Aufreinigung von P450_{sky}. Oben: Chromatogramm der Ni-NTA-Affinitätschromatographie mit anschließender SDS-PAGE. Unten: Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie (Säule: ResourceQ, 1 mL) mit anschließender SDS-PAGE. UV-Spuren sind blau, vereinigte Fraktionen mit einem roten Balken gekennzeichnet. v.I. – vor Induktion, K – Probe der Expressionskultur vor Ernte, P, ÜS – Pellet bzw. Überstand nach Zellaufschluss und Zentrifugation, DF – Durchfluss, M – Marker (PageRuler Unstained, *Thermo Scientific*), A3-F11 – Fraktionen nach Chromatographie.

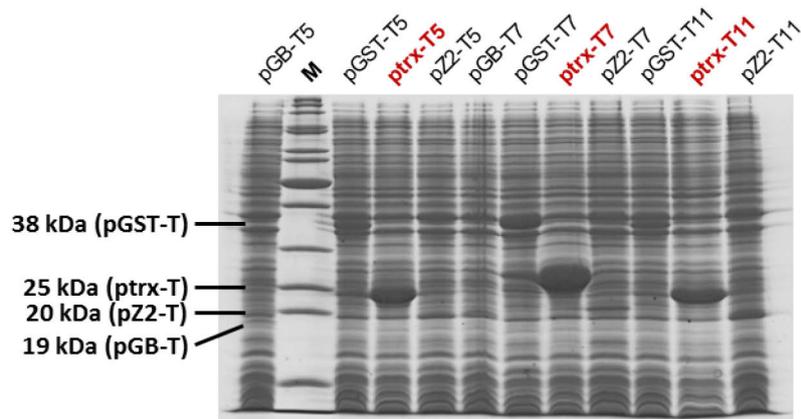
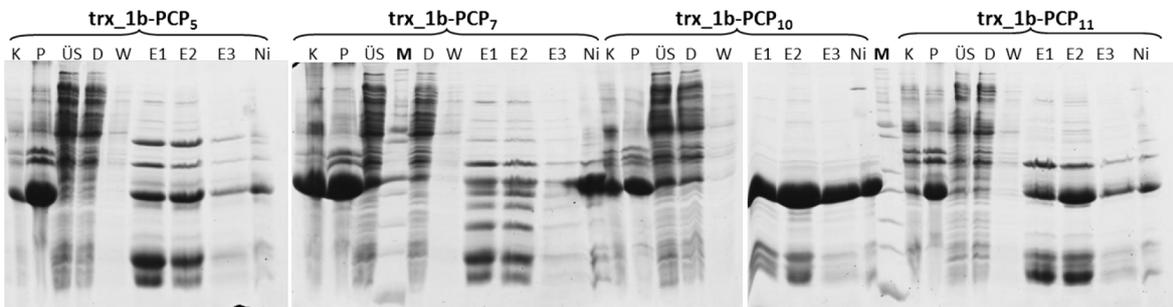


Abbildung A2. SDS-PAGE nach Testexpression einiger PCP-Konstrukte. Die höchste Expression zeigen die Thioredoxin-Fusionsproteine (trx).

A Testaufreinigung mit N-terminalem His-Tag:



B Testaufreinigung mit C-terminalem His-Tag:

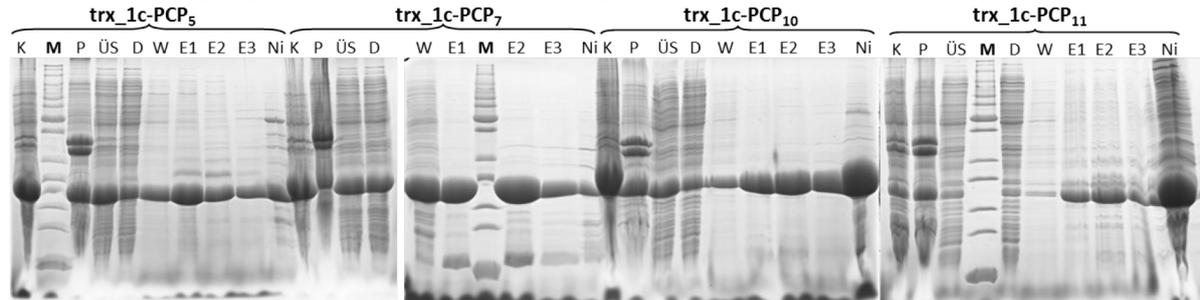


Abbildung A3. Testaufreinigungen von PCP-Domänen 5, 7, 10 und 11 als Thioredoxin-Fusionsprotein mit N-terminalem (A) bzw. C-terminalem His₆-Tag (B). K – Probe der Expressionskultur vor Ernte, P, ÜS – Pellet bzw. Überstand nach Zellaufschluss und Zentrifugation, DF – Durchfluss, W – Waschfraktion, E1-E3 – Elutionsfraktionen, Ni – Ni-NTA-Säulenmaterial nach Aufreinigung, M – Marker (PageRuler Unstained, Thermo Scientific).

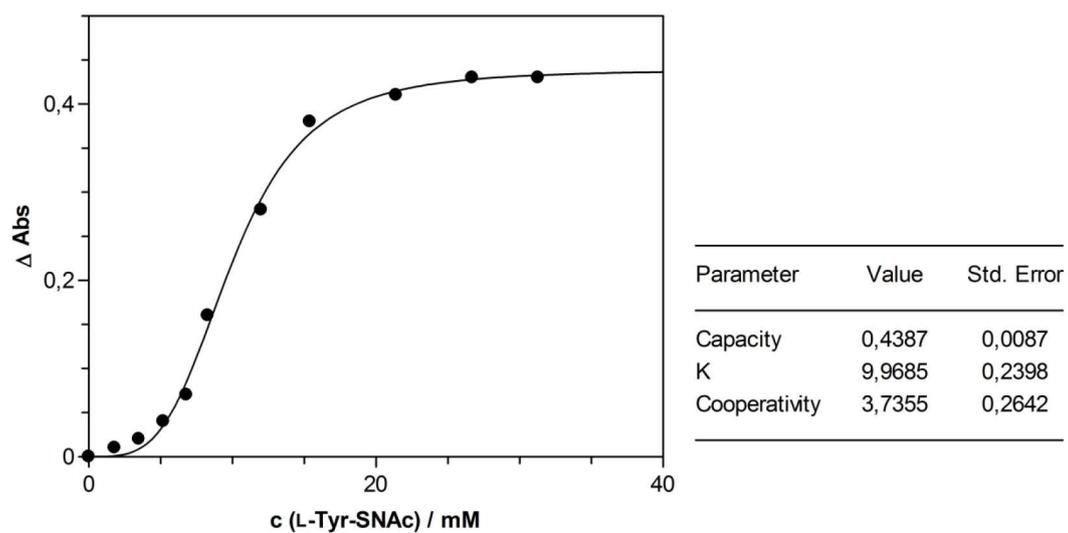


Abbildung A4. Titrationskurve von L-Tyrosin-SNAc zu P450_{sky}. Auf der x-Achse ist die Konzentration von L-Tyrosin-SNAc, auf der y-Achse die Absorptionsdifferenz von $\lambda = 392$ zu 419 nm angegeben.

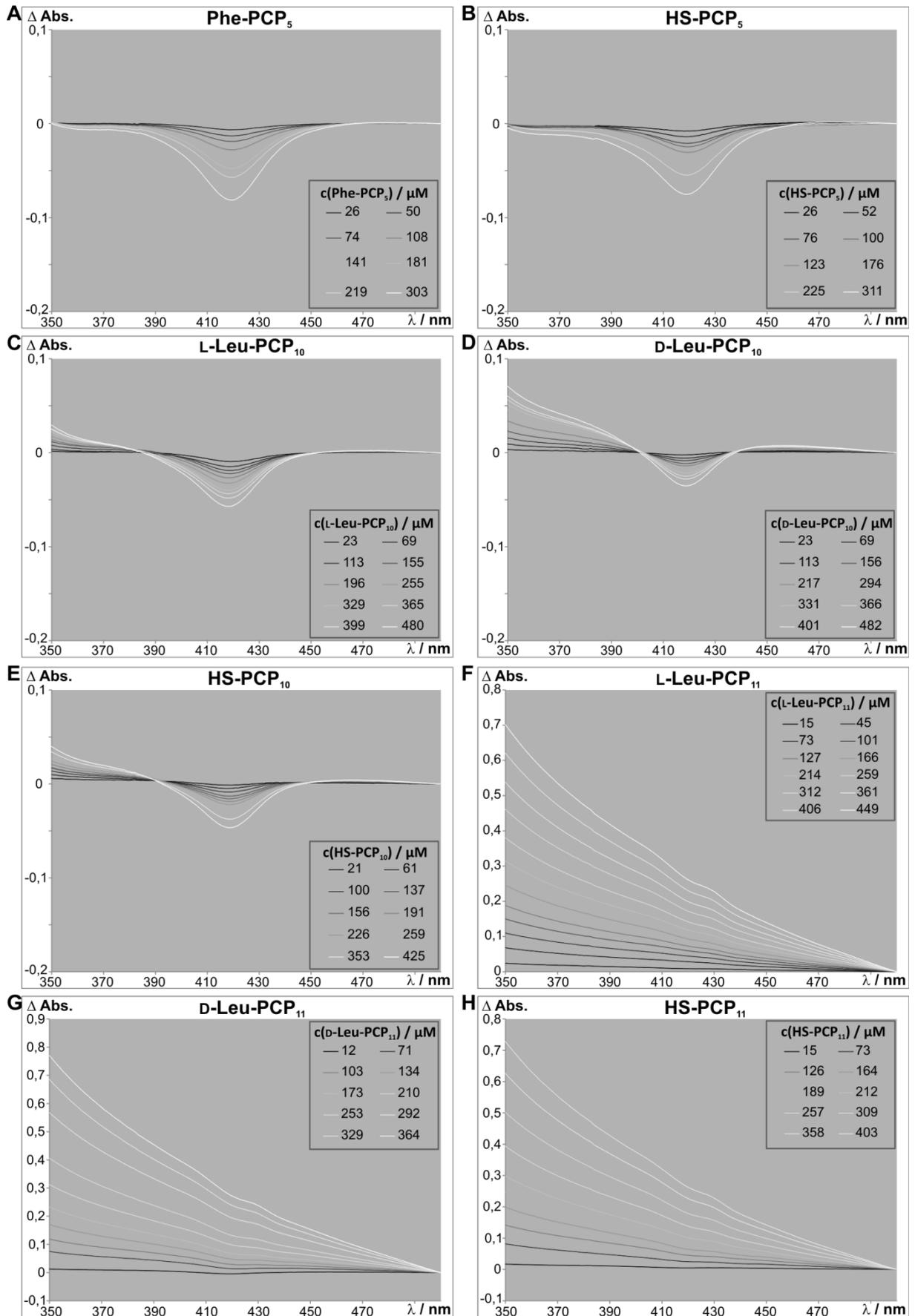


Abbildung A5. UV-Vis-Differenzspektren von Phe-PCP₅ (A), HS-PCP₅ (B), L-Leu-PCP₁₀ (C), D-Leu-PCP₁₀ (D), HS-PCP₁₀ (E), L-Leu-PCP₁₁ (F), D-Leu-PCP₁₁ (G) und HS-PCP₁₁ (H).

Tabelle A1. Getestete Redoxpartner-Systeme für die P450_{sky}-katalysierte Oxidation (2 μM P450_{sky}).

Redoxpartner-System		Hydridquelle (1 mM)	Substrat	Umsetzung (%)
ArR (1 μM)	Arx (5 μM) ^[136]	NADH	L-(OMe)Tyr-PCP ₇	45
PdR (1 μM)	Pdx (5 μM) ^[106]	NADH	L-(OMe)Tyr-PCP ₇	45
HaPuR (1 μM)	HaPux (5 μM) ^[137]	NADH	L-(OMe)Tyr-PCP ₇	40
PuR (1 μM)	Pux (5 μM) ^[138]	NADH	L-(OMe)Tyr-PCP ₇	20
PuR (1 μM)	PuxB (5 μM) ^[138]	NADH	L-(OMe)Tyr-PCP ₇	30
<i>E. coli</i> FdR (1 μM)	Cindoxin (5 μM) ^[139,140]	NADPH	L-(OMe)Tyr-PCP ₇	10

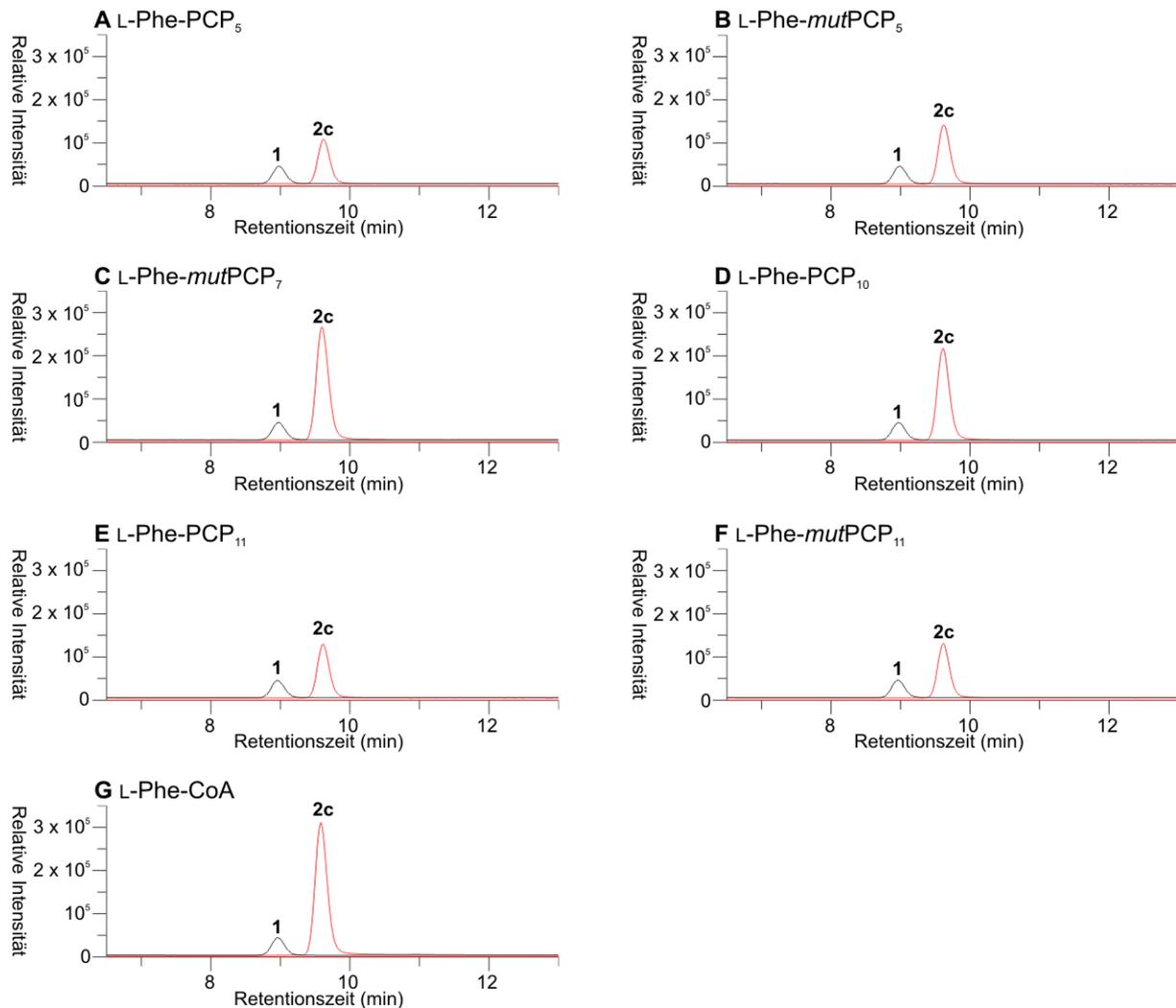
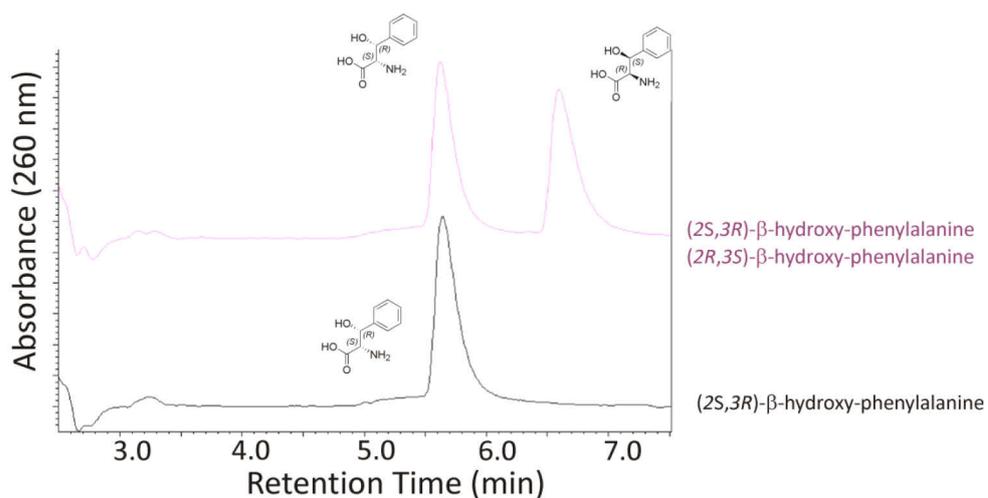
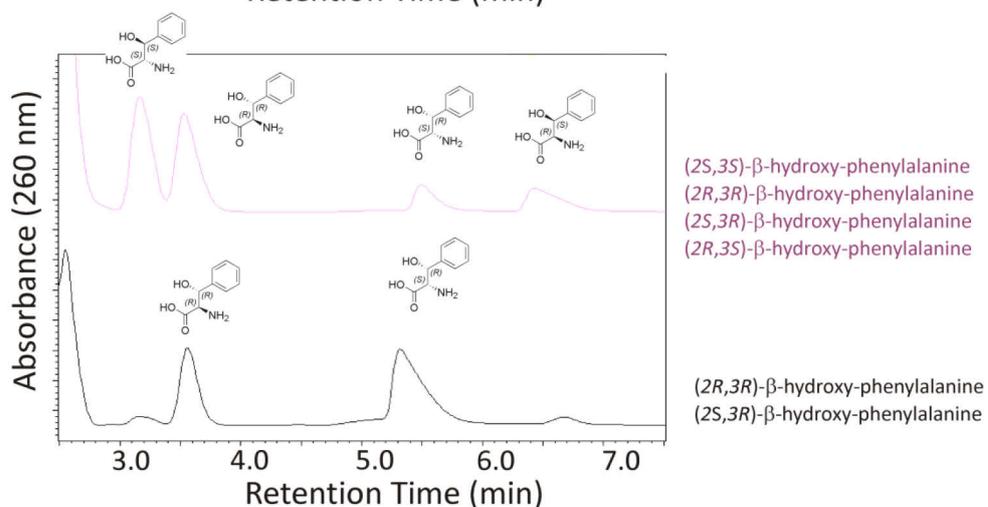


Abbildung A6. LC-MS-Analysen zur Beladungseffizienz von L-Phe-PCP₅ (A), L-Phe-mutPCP₅ (B), L-Phe-PCP₇ (C), L-Phe-PCP₁₀ (D), L-Phe-PCP₁₁ (E), L-Phe-mutPCP₁₁ (F) und L-Phe-CoA (G) als Kontrolle. SIM von Phenylalaninol (2c, [M+H]⁺ = 152 m/z) ist in rot, SIM des internen Standards (4-Fluorophenylalanin, 1, [M+H]⁺ = 184 m/z) in schwarz dargestellt.

Standards



Racemised Standards



Racemised Standards + Turnover

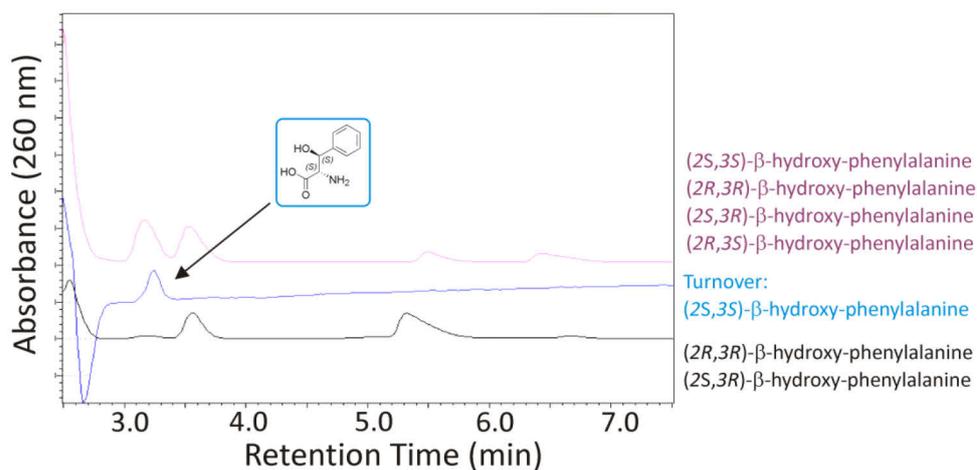


Abbildung A7. Enantiomeren-trennung von β-hydroxylierten Phenylalanin-Standards und dem Produkt der P450_{sky}-katalysierten Hydroxylierungsreaktion. Die Bestimmung der Stereochemie wurde von Dr. Max J. Cryle (MPI Heidelberg) durchgeführt.

8 Literatur

- [1] Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311–335.
- [2] Kieser, T.; Bibb, M. J.; Buttner, M. J.; Chater, K. F.; Hopwood, D. A. *Practical Streptomyces Genetics*; 2. Auflage.; John Innes Foundation: Norwich, England, **2000**.
- [3] Bentley, S. D.; Chater, K. F.; Cerdeño-Tárraga, A.-M.; Challis, G. L.; Thomson, N. R.; James, K. D.; Harris, D. E.; Quail, M. A.; Kieser, H.; Harper, D.; Bateman, A.; Brown, S.; Chandra, G.; Chen, C. W.; Collins, M.; Cronin, A.; Fraser, A.; Goble, A.; Hidalgo, J.; Hornsby, T.; Howarth, S.; Huang, C.-H.; Kieser, T.; Larke, L.; Murphy, L.; Oliver, K.; O’Neil, S.; Rabbinowitsch, E.; Rajandream, M.-A.; Rutherford, K.; Rutter, S.; Seeger, K.; Saunders, D.; Sharp, S.; Squares, R.; Squares, S.; Taylor, K.; Warren, T.; Wietzorrek, A.; Woodward, J.; Barrell, B. G.; Parkhill, J.; Hopwood, D. A. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **2002**, *417*, 141–147.
- [4] *Biologically Active Natural Products: Pharmaceuticals*; Stephen J. Cutler; Horace G. Cutler, Eds.; 1. Auflage.; CRC Press: Boca Raton, USA, **2000**.
- [5] Winter, J. M.; Tang, Y. Synthetic biological approaches to natural product biosynthesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2012**, *23*, 736–743.
- [6] Finking, R.; Marahiel, M. A. Biosynthesis of Nonribosomal Peptides. *Annu. Rev. Microbiol.* **2004**, *58*, 453–488.
- [7] Mootz, H. D.; Schwarzer, D.; Marahiel, M. A. Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *ChemBiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2002**, *3*, 490–504.
- [8] Pohle, S. Untersuchungen zur Biosynthese des ungewöhnlich hydroxylierten zyklischen Depsipeptids RP-1776 aus *Streptomyces* sp. Acta 2897. Dissertation, Technische Universität Berlin: Berlin, **2010**.
- [9] Pohle, S.; Appelt, C.; Roux, M.; Fiedler, H.-P.; Süßmuth, R. D. Biosynthetic Gene Cluster of the Non-ribosomally Synthesized Cyclodepsipeptide Skyllamycin: Deciphering Unprecedented Ways of Unusual Hydroxylation Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6194–6205.
- [10] Stachelhaus, T.; Marahiel, M. A. Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, *125*, 3–14.
- [11] Weckwerth, W.; Miyamoto, K.; Inuma, K.; Krause, M.; Glinski, M.; Storm, T.; Bonse, G.; Kleinkauf, H.; Zocher, R. Biosynthesis of PF1022A and Related Cyclooctadepsipeptides. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17909–17915.
- [12] Haese, A.; Schubert, M.; Herrmann, M.; Zocher, R. Molecular characterization of the enniatin synthetase gene encoding a multifunctional enzyme catalysing N-methyldepsipeptide formation in *Fusarium scirpi*. *Mol. Microbiol.* **1993**, *7*, 905–914.

- [13] Hornbogen, T.; Glinski, M.; Zocher, R. Biosynthesis of Depsipeptide Mycotoxins in *Fusarium*. *Eur. J. Plant Pathol.* **2002**, *108*, 713–718.
- [14] Guenzi, E.; Galli, G.; Grgurina, I.; Gross, D. C.; Grandi, G. Characterization of the Syringomycin Synthetase Gene Cluster - A Link Between Prokaryotic and Eukaryotic Peptide Synthetases. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32857–32863.
- [15] Keating, T. A.; Marshall, C. G.; Walsh, C. T. Vibriobactin Biosynthesis in *Vibrio cholerae*: VibH Is an Amide Synthase Homologous to Nonribosomal Peptide Synthetase Condensation Domains. *Biochemistry (Mosc.)* **2000**, *39*, 15513–15521.
- [16] Keating, T. A.; Marshall, C. G.; Walsh, C. T. Reconstitution and Characterization of the *Vibrio cholerae* Vibriobactin Synthetase from VibB, VibE, VibF, and VibH. *Biochemistry (Mosc.)* **2000**, *39*, 15522–15530.
- [17] Butterson, J. R.; Choi, M. H.; Watnick, P. I.; Carroll, P. A.; Calderwood, S. B. *Vibrio cholerae* VibF Is Required for Vibriobactin Synthesis and Is a Member of the Family of Nonribosomal Peptide Synthetases. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 1731–1738.
- [18] Wyckoff, E. E.; Smith, S. L.; Payne, S. M. VibD and VibH Are Required for Late Steps in Vibriobactin Biosynthesis in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 1830–1834.
- [19] Kraas, F. I.; Helmetag, V.; Wittmann, M.; Strieker, M.; Marahiel, M. A. Functional Dissection of Surfactin Synthetase Initiation Module Reveals Insights into the Mechanism of Lipoinitiation. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 872–880.
- [20] Weber, T.; Marahiel, M. A. Exploring the Domain Structure of Modular Nonribosomal Peptide Synthetases. *Structure* **2001**, *9*, R3–R9.
- [21] Sieber, S. A.; Marahiel, M. A. Molecular Mechanisms Underlying Nonribosomal Peptide Synthesis: Approaches to New Antibiotics. *Chem Rev* **2005**, *105*, 715–738.
- [22] Gao, X.; Haynes, S. W.; Ames, B. D.; Wang, P.; Vien, L. P.; Walsh, C. T.; Tang, Y. Cyclization of fungal nonribosomal peptides by a terminal condensation-like domain. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 823–830.
- [23] Hornbogen, T.; Riechers, S.; Prinz, B.; Schultchen, J.; Lang, C.; Schmidt, S.; Mügge, C.; Turkanovic, S.; Süssmuth, R. D.; Tauberger, E.; Zocher, R. Functional Characterization of the Recombinant N-Methyltransferase Domain from the Multienzyme Enniatin Synthetase. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1048–1054.
- [24] Roy, R. S.; Gehring, A. M.; Milne, J. C.; Belshaw, P. J.; Walsh, C. T. Thiazole and oxazole peptides: biosynthesis and molecular machinery. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 249–263.
- [25] Luo, L.; Kohli, R. M.; Onishi, M.; Linne, U.; Marahiel, M. A.; Walsh, C. T. Timing of Epimerization and Condensation Reactions in Nonribosomal Peptide Assembly Lines: Kinetic Analysis of Phenylalanine Activating Elongation Modules of Tyrocidine Synthetase B. *Biochemistry (Mosc.)* **2002**, *41*, 9184–9196.
- [26] Linne, U.; Stein, D. B.; Mootz, H. D.; Marahiel, M. A. Systematic and Quantitative Analysis of Protein-Protein Recognition between Nonribosomal Peptide Synthetases Investigated in the Tyrocidine Biosynthetic Template. *Biochemistry (Mosc.)* **2003**, *42*, 5114–5124.
- [27] Samel, S. A.; Marahiel, M. A.; Essen, L.-O. How to tailor non-ribosomal peptide products-new clues about the structures and mechanisms of modifying enzymes. *Mol. Biosyst.* **2008**, *4*, 387–393.
- [28] Walsh, C. T.; Chen, H.; Keating, T. A.; Hubbard, B. K.; Losey, H. C.; Luo, L.; Marshall, C. G.; Miller, D. A.; Patel, H. M. Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 525–534.
- [29] Bister, B.; Bischoff, D.; Nicholson, G. J.; Stockert, S.; Wink, J.; Brunati, C.; Donadio, S.; Pelzer, S.; Wohlleben, W.; Süssmuth, R. D. Bromobalhimycin and Chlorobromobalhimycins - Illuminating the Potential of Halogenases in Glycopeptide Antibiotic Biosyntheses. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 658–662.

- [30] Puk, O.; Huber, P.; Bischoff, D.; Recktenwald, J.; Jung, G.; Süßmuth, R. D.; van Pée, K.-H.; Wohlleben, W.; Pelzer, S. Glycopeptide Biosynthesis in *Amycolatopsis mediterranei* DSM5908: Function of a Halogenase and a Haloperoxidase/Perhydrolase. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 225–235.
- [31] Pelzer, S.; Süßmuth, R.; Heckmann, D.; Recktenwald, J.; Huber, P.; Jung, G.; Wohlleben, W. Identification and Analysis of the Balhimycin Biosynthetic Gene Cluster and Its Use for Manipulating Glycopeptide Biosynthesis in *Amycolatopsis mediterranei* DSM5908. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1565–1573.
- [32] Li, T.-L.; Huang, F.; Haydock, S. F.; Mironenko, T.; Leadlay, P. F.; Spencer, J. B. Biosynthetic Gene Cluster of the Glycopeptide Antibiotic Teicoplanin: Characterization of Two Glycosyltransferases and the Key Acyltransferase. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 107–119.
- [33] Bischoff, D.; Pelzer, S.; Bister, B.; Nicholson, G. J.; Stockert, S.; Schirle, M.; Wohlleben, W.; Jung, G.; Süßmuth, R. D. The Biosynthesis of Vancomycin-Type Glycopeptide Antibiotics - The Order of the Cyclization Steps. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4688–4691.
- [34] Bischoff, D.; Bister, B.; Bertazzo, M.; Pfeifer, V.; Stegmann, E.; Nicholson, G. J.; Keller, S.; Pelzer, S.; Wohlleben, W.; Süßmuth, R. D. The Biosynthesis of Vancomycin-Type Glycopeptide Antibiotics? A Model for Oxidative Side-Chain Cross-Linking by Oxygenases Coupled to the Action of Peptide Synthetases. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 267–272.
- [35] Bischoff, D.; Pelzer, S.; Hölzel, A.; Nicholson, G. J.; Stockert, S.; Wohlleben, W.; Jung, G.; Süßmuth, R. D. The Biosynthesis of Vancomycin-Type Glycopeptide Antibiotics - New Insights into the Cyclization Steps. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1693–1696.
- [36] Pylypenko, O.; Vitali, F.; Zerbe, K.; Robinson, J. A.; Schlichting, I. Crystal structure of OxyC, a cytochrome P450 implicated in an oxidative C-C coupling reaction during vancomycin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46727–46733.
- [37] Zerbe, K.; Pylypenko, O.; Vitali, F.; Zhang, W.; Rouset, S.; Heck, M.; Vrijbloed, J. W.; Bischoff, D.; Bister, B.; Süßmuth, R. D.; Pelzer, S.; Wohlleben, W.; Robinson, J. A.; Schlichting, I. Crystal structure of OxyB, a cytochrome P450 implicated in an oxidative phenol coupling reaction during vancomycin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 47476–47485.
- [38] Zerbe, K.; Woithe, K.; Li, D. B.; Vitali, F.; Bigler, L.; Robinson, J. A. An Oxidative Phenol Coupling Reaction Catalyzed by OxyB, a Cytochrome P450 from the Vancomycin-Producing Microorganism. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6709–6713.
- [39] Woithe, K.; Geib, N.; Zerbe, K.; Li, D. B.; Heck, M.; Fournier-Rousset, S.; Meyer, O.; Vitali, F.; Matoba, N.; Abou-Hadeed, K.; Robinson, J. A. Oxidative Phenol Coupling Reactions Catalyzed by OxyB: A Cytochrome P450 from the Vancomycin Producing Organism. Implications for Vancomycin Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6887–6895.
- [40] Schmartz, P. C.; Wölfel, K.; Zerbe, K.; Gad, E.; El Tamany, E. S.; Ibrahim, H. K.; Abou-Hadeed, K.; Robinson, J. A. Substituent Effects on the Phenol Coupling Reaction Catalyzed by the Vancomycin Biosynthetic P450 Enzyme OxyB. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11468–11472.
- [41] Cryle, M. J.; Meinhart, A.; Schlichting, I. Structural Characterization of OxyD, a Cytochrome P450 Involved in β -Hydroxytyrosine Formation in Vancomycin Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 24562–24574.
- [42] Chen, H.; Hubbard, B. K.; O'Connor, S. E.; Walsh, C. T. Formation of β -Hydroxyhistidine in the Biosynthesis of Nikkomycin Antibiotics. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 103–112.
- [43] Zhang, C.; Kong, L.; Liu, Q.; Lei, X.; Zhu, T.; Yin, J.; Lin, B.; Deng, Z.; You, D. In Vitro Characterization of Echinomycin Biosynthesis: Formation and Hydroxylation of L-

- Tryptophanyl-S-Enzyme and Oxidation of (2S,3S) β -Hydroxytryptophan. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e56772.
- [44] Ortiz de Montellano, P. R. *Cytochrome P450 structure, mechanism, and biochemistry*; Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, **2005**.
- [45] Fontecave, M.; Covès, J.; Pierre, J.-L. Ferric reductases or flavin reductases? *Biometals* **1994**, *7*, 3–8.
- [46] Fontecave, M.; Eliasson, R.; Reichard, P. NAD(P)H:flavin oxidoreductase of *Escherichia coli*. A ferric iron reductase participating in the generation of the free radical of ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 12325–12331.
- [47] Ingelman, M.; Ramaswamy, S.; Nivière, V.; Fontecave, M.; Eklund, H. Crystal Structure of NAD(P)H:Flavin Oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc.)* **1999**, *38*, 7040–7049.
- [48] Zenno, S.; Saigo, K. Identification of the genes encoding NAD(P)H-flavin oxidoreductases that are similar in sequence to *Escherichia coli* Fre in four species of luminous bacteria: *Photobacterium luminescens*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi*, and *Vibrio orientalis*. *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 3544–3551.
- [49] Fieschi, F.; Nivière, V.; Frier, C.; Décout, J.-L.; Fontecave, M. The Mechanism and Substrate Specificity of the NADPH:Flavin Oxidoreductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 30392–30400.
- [50] Galán, B.; Díaz, E.; Prieto, M. A.; García, J. L. Functional Analysis of the Small Component of the 4-Hydroxyphenylacetate 3-Monooxygenase of *Escherichia coli* W: a Prototype of a New Flavin:NAD(P)H Reductase Subfamily. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 627–636.
- [51] Gray, K. A.; Pogrebinsky, O. S.; Mrachko, G. T.; Xi, L.; Monticello, D. J.; Squires, C. H. Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1705–1709.
- [52] Thibaut, D.; Ratet, N.; Bisch, D.; Faucher, D.; Debussche, L.; Blanche, F. Purification of the two-enzyme system catalyzing the oxidation of the D-proline residue of pristinamycin IIB during the last step of pristinamycin IIA biosynthesis. *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 5199 – 5205.
- [53] Kendrew, S. G.; Harding, S. E.; Hopwood, D. A.; Marsh, E. N. G. Identification of a Flavin:NADH Oxidoreductase Involved in the Biosynthesis of Actinorhodin. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 17339–17343.
- [54] Parry, R. J.; Li, W. An NADPH:FAD Oxidoreductase from the Valanimycin Producer, *Streptomyces viridifaciens*. Cloning, Analysis, and Overexpression. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 23303–23311.
- [55] Okai, M.; Kudo, N.; Lee, W. C.; Kamo, M.; Nagata, K.; Tanokura, M. Crystal Structures of the Short-Chain Flavin Reductase HpaC from *Sulfolobus tokodaii* Strain 7 in Its Three States: NAD(P)⁺-Free, NAD⁺-Bound, and NADP⁺-Bound. *Biochemistry (Mosc.)* **2006**, *45*, 5103–5110.
- [56] Webb, B. N.; Ballinger, J. W.; Kim, E.; Belchik, S. M.; Lam, K.-S.; Youn, B.; Nissen, M. S.; Xun, L.; Kang, C. Characterization of Chlorophenol 4-Monooxygenase (TftD) and NADH:FAD Oxidoreductase (TftC) of *Burkholderia cepacia* AC1100. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 2014–2027.
- [57] Kirchner, U. Phenol Hydroxylase from *Bacillus thermoglucosidasius* A7, a Two-protein Component Monooxygenase with a Dual Role for FAD. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 47545–47553.
- [58] Van Berkel, W. J. H.; Kamerbeek, N. M.; Fraaije, M. W. Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 670–689.
- [59] Denisov, I. G.; Makris, T. M.; Sligar, S. G.; Schlichting, I. Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2253–2278.

- [60] Guengerich, F. P.; Johnson, W. W. Kinetics of Ferric Cytochrome P450 Reduction by NADPH–Cytochrome P450 Reductase: Rapid Reduction in the Absence of Substrate and Variations among Cytochrome P450 Systems. *Biochemistry (Mosc.)* **1997**, *36*, 14741–14750.
- [61] Munro, A. W.; Girvan, H. M.; McLean, K. J. Cytochrome P450–redox partner fusion enzymes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2007**, *1770*, 345–359.
- [62] Munro, A. W.; Girvan, H. M.; McVey, J. P.; McLean, K. J. Cytochrome P450 Redox Partner Systems: Biodiversity and Biotechnological Implications. In *Modern Biooxidation*; Schmid, R. D.; Urlacher, V. B., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2007**; pp. 123–153.
- [63] Cryle, M. J.; Stok, J. E.; De Voss, J. J. Reactions Catalyzed by Bacterial Cytochromes P450. *Aust J Chem* **2003**, *56*, 749–762.
- [64] Cryle, M. J. Carrier protein substrates in cytochrome P450-catalysed oxidation. *Metallomics* **2011**.
- [65] Chen, H.; Walsh, C. T. Coumarin formation in novobiocin biosynthesis: β -hydroxylation of the aminoacyl enzyme tyrosyl-S-NovH by a cytochrome P450 NovI. *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 301–312.
- [66] Schatz, A.; Bugle, E.; Waksman, S. A. Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Exp. Biol. Med.* **1944**, *55*, 66–69.
- [67] David A. Hopwood *Streptomyces in Nature and Medicine - The Antibiotic Makers*; Oxford University Press: New York, USA, **2007**.
- [68] De Lima Procópio, R. E.; da Silva, I. R.; Martins, M. K.; de Azevedo, J. L.; de Araújo, J. M. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz. J. Infect. Dis.* **2012**, *16*, 466–471.
- [69] Graf, E. Diplomarbeit, Universität Tübingen: Tübingen, **2004**.
- [70] Schubert, V. Synthese von Teilfragmenten des Lipopeptids RP-1776. Diplomarbeit, Technische Universität Berlin: Berlin, **2009**.
- [71] Schubert, V.; Meo, F. D.; Saaidi, P.-L.; Bartoschek, S.; Fiedler, H.-P.; Trouillas, P.; Süßmuth, R. D. Manuskript in Bearbeitung, **2013**.
- [72] Toki, S.; Agatsuma, T.; Ochiai, K.; Saitoh, Y.; Ando, K.; Nakanishi, S.; Lokker, N. A.; Giese, N. A.; Matsuda, Y. RP-1776, a novel cyclic peptide produced by *Streptomyces* sp., inhibits the binding of PDGF to the extracellular domain of its receptor. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2001**, *54*, 405–414.
- [73] Heldin, C. H.; Westermark, B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol. Rev.* **1999**, *79*, 1283–1316.
- [74] Lauer, B.; Russwurm, R.; Schwarz, W.; Kálmánchelyi, A.; Bruntner, C.; Rosemeier, A.; Bormann, C. Molecular characterization of co-transcribed genes from *Streptomyces tendae* Tü901 involved in the biosynthesis of the peptidyl moiety and assembly of the peptidyl nucleoside antibiotic nikkomycin. *Mol. Gen. Genet. MGG* **2001**, *264*, 662–673.
- [75] Maeda, K.; Umeda, Y.; Saino, T. Synthesis and Background Chemistry of 15-Deoxyspergualin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1993**, *685*, 123–135.
- [76] Silakowski, B.; Schairer, H. U.; Ehret, H.; Kunze, B.; Weinig, S.; Nordsiek, G.; Brandt, P.; Blöcker, H.; Höfle, G.; Beyer, S.; Müller, R. New Lessons for Combinatorial Biosynthesis from Myxobacteria - The Myxothiazol Biosynthetic Gene Cluster of *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 37391–37399.
- [77] Weinig, S.; Hecht, H.-J.; Mahmud, T.; Müller, R. Melithiazol biosynthesis: further insights into myxobacterial PKS/NRPS systems and evidence for a new subclass of methyl transferases. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 939–952.
- [78] Prigge, S. T.; Mains, R. E.; Eipper, B. A.; Amzel, L. M. New insights into copper monooxygenases and peptide amidation: structure, mechanism and function. *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 1236–1259.

- [79] Bogomolovas, J.; Simon, B.; Sattler, M.; Stier, G. Screening of fusion partners for high yield expression and purification of bioactive viscotoxins. *Protein Expr. Purif.* **2009**, *64*, 16–23.
- [80] Joseph Sambrook; David W. Russel *Molecular Cloning - A laboratory manual*; 3. Auflage.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, **2001**.
- [81] Dr. Martin Bommer, persönliche Mitteilung, Humboldt-Universität Berlin, **2012**.
- [82] Bachmann, B. O.; Ravel, J. Chapter 8: Methods for In Silico Prediction of Microbial Polyketide and Nonribosomal Peptide Biosynthetic Pathways from DNA Sequence Data. In *Methods in Enzymology*; David A. Hopwood, Ed.; Academic Press, **2009**; Vol. Volume 458, pp. 181–217.
- [83] Cole, C.; Barber, J. D.; Barton, G. J. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, W197–W201.
- [84] Linne, U.; Marahiel, M. A. Reactions Catalyzed by Mature and Recombinant Nonribosomal Peptide Synthetases. In *Protein Engineering*; Academic Press, **2004**; Vol. Volume 388, pp. 293–315.
- [85] Studier, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* **2005**, *41*, 207–234.
- [86] Kapust, R. B.; Tözsér, J.; Fox, J. D.; Anderson, D. E.; Cherry, S.; Copeland, T. D.; Waugh, D. S. Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency. *Protein Eng.* **2001**, *14*, 993–1000.
- [87] Sunbul, M.; Marshall, N. J.; Zou, Y.; Zhang, K.; Yin, J. Catalytic Turnover-Based Phage Selection for Engineering the Substrate Specificity of Sfp Phosphopantetheinyl Transferase. *J. Mol. Biol.* **2009**, *387*, 883–898.
- [88] Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- [89] Gasteiger, E.; Gattiker, A.; Hoogland, C.; Ivanyi, I.; Appel, R. D.; Bairoch, A. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3784–3788.
- [90] 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 *The Proteomics Protocols Handbook*; Walker, J. M., Ed.; Humana Press, **2005**; pp. 571–607.
- [91] Chapman, S. K.; Reid, G. A. *Flavoprotein protocols*; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, N.J., **1999**; Vol. 131.
- [92] Mueller, U.; Darowski, N.; Fuchs, M. R.; Förster, R.; Hellmig, M.; Paithankar, K. S.; Pühringer, S.; Steffien, M.; Zocher, G.; Weiss, M. S. Facilities for macromolecular crystallography at the Helmholtz-Zentrum Berlin. *J. Synchrotron Radiat.* **2012**, *19*, 442–449.
- [93] Kabsch, W. Automatic indexing of rotation diffraction patterns. *J. Appl. Crystallogr.* **1988**, *21*, 67–72.
- [94] McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 658–674.
- [95] Adams, P. D.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Hung, L.-W.; Ioerger, T. R.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Read, R. J.; Sacchettini, J. C.; Sauter, N. K.; Terwilliger, T. C. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr. Sect.* **2002**, *58*, 1948–1954.
- [96] Emsley, P.; Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect.* **2004**, *60*, 2126–2132.
- [97] Svergun, D. I.; Koch, M. H. J. Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Reports Prog. Phys.* **2003**, *66*, 1735.
- [98] Petoukhov, M. V.; Svergun, D. I. Applications of small-angle X-ray scattering to biomacromolecular solutions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 429–437.

- [99] Blanchet, C. E.; Svergun, D. I. Small-Angle X-Ray Scattering on Biological Macromolecules and Nanocomposites in Solution. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2013**, *64*, 37–54.
- [100] Svergun, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr.* **1992**, *25*, 495–503.
- [101] Fischer, H.; De Oliveira Neto, M.; Napolitano, H. B.; Polikarpov, I.; Craievich, A. F. Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. *J. Appl. Crystallogr.* **2010**, *43*, 101–109.
- [102] Svergun, D. I.; Petoukhov, M. V.; Koch, M. H. Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2946–2953.
- [103] Yu, C.-A.; Gunsalus, I. C.; Katagiri, M.; Suhara, K.; Takemori, S. Cytochrome P-450cam - Crystallization and Properties. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 94–101.
- [104] Dawson, J. H.; Andersson, L. A.; Sono, M. Spectroscopic investigations of ferric cytochrome P-450-CAM ligand complexes. Identification of the ligand trans to cysteinate in the native enzyme. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 3606–3617.
- [105] Peterson, J. A.; Lu, J. Y.; Geisselsoder, J.; Graham-Lorence, S.; Carmona, C.; Witney, F.; Lorence, M. C. Cytochrome P-450terp. Isolation and purification of the protein and cloning and sequencing of its operon. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 14193–14203.
- [106] Peterson, J. A.; Lorence, M. C.; Amarneh, B. Putidaredoxin reductase and putidaredoxin. Cloning, sequence determination, and heterologous expression of the proteins. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 6066–6073.
- [107] Barron, E. J.; Mooney, L. A. Determination of acyl-thioesters by gas-liquid chromatography of their sodium borohydride reduction products. *Anal. Chem.* **1968**, *40*, 1742–1744.
- [108] Yamada, S.; Hongo, C.; Yoshioka, R.; Chibata, I. Method for the racemization of optically active amino acids. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 843–846.
- [109] Strieker, M.; Nolan, E. M.; Walsh, C. T.; Marahiel, M. A. Stereospecific Synthesis of threo- and erythro- β -Hydroxyglutamic Acid During Kutzneride Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13523–13530.
- [110] BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Zugriff am 18.09.2013).
- [111] Uetz, T.; Schneider, R.; Snozzi, M.; Egli, T. Purification and characterization of a two-component monooxygenase that hydroxylates nitrilotriacetate from “*Chelatobacter*” strain ATCC 29600. *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 1179–1188.
- [112] Valton, J.; Mathevon, C.; Fontecave, M.; Nivière, V.; Ballou, D. P. Mechanism and Regulation of the Two-component FMN-dependent Monooxygenase ActVA-ActVB from *Streptomyces coelicolor*. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 10287–10296.
- [113] Filisetti, L. Mechanism and Substrate Specificity of the Flavin Reductase ActVB from *Streptomyces coelicolor*. *J. Biol. Chem.* **2002**, *278*, 296–303.
- [114] Valton, J. A Two-component Flavin-dependent Monooxygenase Involved in Actinorhodin Biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 44362–44369.
- [115] Van den Heuvel, R. H. H.; Westphal, A. H.; Heck, A. J. R.; Martin A. Walsh; Stefano Rovida; Willem J. H. van Berkel; Andrea Mattevi Structural Studies on Flavin Reductase PheA2 Reveal Binding of NAD in an Unusual Folded Conformation and Support Novel Mechanism of Action. *J. Biol. Chem.* **2003**, *279*, 12860–12867.
- [116] Sucharitakul, J.; Phongsak, T.; Entsch, B.; Svasti, J.; Chaiyen, P.; Ballou, D. P. Kinetics of a Two-Component p-Hydroxyphenylacetate Hydroxylase Explain How Reduced Flavin Is Transferred from the Reductase to the Oxygenase. *Biochemistry (Mosc.)* **2007**, *46*, 8611–8623.
- [117] RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (Zugriff am 17.09.2013).

- [118] Zhang, Y.; Edwards, T. E.; Begley, D. W.; Abramov, A.; Thompkins, K. B.; Ferrell, M.; Guo, W. J.; Phan, I.; Olsen, C.; Napuli, A.; Sankaran, B.; Stacy, R.; Van Voorhis, W. C.; Stewart, L. J.; Myler, P. J. Structure of nitrilotriacetate monooxygenase component B from *Mycobacterium thermoresistibile*. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2011**, *67*, 1100–1105.
- [119] Pfam: Search Pfam, <http://pfam.sanger.ac.uk/search/> (Zugriff am 17.09.2013).
- [120] Chiu, H.-J.; Johnson, E.; Schröder, I.; Rees, D. C. Crystal Structures of a Novel Ferric Reductase from the Hyperthermophilic Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* and Its Complex with NADP⁺. *Structure* **2001**, *9*, 311–319.
- [121] Dr. Tobias Werther, persönliche Mitteilung, Humboldt-Universität Berlin, **2013**.
- [122] Sucharitakul, J.; Chaiyen, P.; Entsch, B.; Ballou, D. P. Kinetic Mechanisms of the Oxygenase from a Two-component Enzyme, p-Hydroxyphenylacetate 3-Hydroxylase from *Acinetobacter baumannii*. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 17044–17053.
- [123] Sheng, D.; Ballou, D. P.; Massey, V. Mechanistic Studies of Cyclohexanone Monooxygenase: Chemical Properties of Intermediates Involved in Catalysis. *Biochemistry (Mosc.)* **2001**, *40*, 11156–11167.
- [124] Beaty, N. B.; Ballou, D. P. The oxidative half-reaction of liver microsomal FAD-containing monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 4619–4625.
- [125] Valton, J.; Fontcave, M.; Douki, T.; Kendrew, S. G.; Nivière, V. An Aromatic Hydroxylation Reaction Catalyzed by a Two-component FMN-dependent Monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 27–35.
- [126] Anderson, A. C.; O'Neil, R. H.; DeLano, W. L.; Stroud, R. M. The Structural Mechanism for Half-the-Sites Reactivity in an Enzyme, Thymidylate Synthase, Involves a Relay of Changes between Subunits. *Biochemistry (Mosc.)* **1999**, *38*, 13829–13836.
- [127] Frank, R. a. W.; Leeper, F. J.; Luisi, B. F. Structure, mechanism and catalytic duality of thiamine-dependent enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 892–905.
- [128] Covian, R.; Trumpower, B. L. Regulatory interactions in the dimeric cytochrome bc1 complex: The advantages of being a twin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **2008**, *1777*, 1079–1091.
- [129] Schröder-Tittmann, K.; Meyer, D.; Arens, J.; Wechsler, C.; Tietzel, M.; Golbik, R.; Tittmann, K. Alternating Sites Reactivity Is a Common Feature of Thiamin Diphosphate-Dependent Enzymes As Evidenced by Isothermal Titration Calorimetry Studies of Substrate Binding. *Biochemistry (Mosc.)* **2013**, *52*, 2505–2507.
- [130] Nelson, D. R. The Cytochrome P450 Homepage. *Hum. Genomics* **2009**, *4*, 59.
- [131] Cytochrome P450 Homepage, <http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html> (Zugriff am 02.10.2013).
- [132] Kyte, J.; Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **1982**, *157*, 105–132.
- [133] Ikai, A. Thermostability and Aliphatic Index of Globular Proteins. *J. Biochem. (Tokyo)* **1980**, *88*, 1895–1898.
- [134] Bisswanger, H. *Enzyme kinetics: principles and methods*; Wiley-VCH: Weinheim, **2008**.
- [135] Geib, N.; Weber, T.; Wörtz, T.; Zerbe, K.; Wohlleben, W.; Robinson, J. A. Genome mining in *Amycolatopsis balhimycina* for ferredoxins capable of supporting cytochrome P450 enzymes involved in glycopeptide antibiotic biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **2010**, *306*, 45–53.
- [136] Bell, S. G.; Dale, A.; Rees, N. H.; Wong, L.-L. A cytochrome P450 class I electron transfer system from *Novosphingobium aromaticivorans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 163–175.
- [137] Bell, S. G.; Tan, A. B. H.; Johnson, E. O. D.; Wong, L.-L. Selective oxidative demethylation of veratric acid to vanillic acid by CYP199A4 from *Rhodospseudomonas palustris* HaA2. *Mol. Biosyst.* **2009**, *6*, 206–214.

- [138] Bell, S. G.; Xu, F.; Johnson, E. O. D.; Forward, I. M.; Bartlam, M.; Rao, Z.; Wong, L.-L. Protein recognition in ferredoxin–P450 electron transfer in the class I CYP199A2 system from *Rhodospseudomonas palustris*. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15*, 315–328.
- [139] Hawkes, D. B.; Slessor, K. E.; Bernhardt, P. V.; De Voss, J. J. Cloning, Expression and Purification of Cindoxin, an Unusual FMN-Containing Cytochrome P450 Redox Partner. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1107–1114.
- [140] Stok, J. E.; De Voss, J. J. Expression, Purification, and Characterization of BioI: A Carbon–Carbon Bond Cleaving Cytochrome P450 Involved in Biotin Biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *384*, 351–360.
- [141] Stachelhaus, T.; Mootz, H. D.; Marahiel, M. A. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 493–505.
- [142] Trauger, J. W.; Walsh, C. T. Heterologous expression in *Escherichia coli* of the first module of the nonribosomal peptide synthetase for chloroeremomycin, a vancomycin-type glycopeptide antibiotic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 3112–3117.
- [143] Puk, O.; Bischoff, D.; Kittel, C.; Pelzer, S.; Weist, S.; Stegmann, E.; Süßmuth, R. D.; Wohlleben, W. Biosynthesis of Chloro- β -Hydroxytyrosine, a Nonproteinogenic Amino Acid of the Peptidic Backbone of Glycopeptide Antibiotics. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 6093–6100.
- [144] Uhlmann, S.; Süßmuth, R. D.; Cryle, M. J. Cytochrome P450_{sky} Interacts Directly with the Nonribosomal Peptide Synthetase to Generate Three Amino Acid Precursors in Skyllamycin Biosynthesis. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 2586–2596.
- [145] Cryle, M. J.; Staaden, J.; Schlichting, I. Structural characterization of CYP165D3, a cytochrome P450 involved in phenolic coupling in teicoplanin biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *507*, 163–173.
- [146] Cryle, M. J.; Schlichting, I. Structural insights from a P450 Carrier Protein complex reveal how specificity is achieved in the P450_{BioI} ACP complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 15696–15701.
- [147] Savino, C.; Montemiglio, L. C.; Sciara, G.; Miele, A. E.; Kendrew, S. G.; Jemth, P.; Gianni, S.; Vallone, B. Investigating the Structural Plasticity of a Cytochrome P450 - Three-Dimensional Structures of P450 EryK and Binding to its Physiological Substrate. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 29170–29179.
- [148] McLean, K. J.; Lafite, P.; Levy, C.; Cheesman, M. R.; Mast, N.; Pikuleva, I. A.; Leys, D.; Munro, A. W. The Structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP125 - Molecular Basis for Cholesterol Binding in a P450 Needed for Host Infection. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 35524–35533.
- [149] Johnston, J. B.; Kells, P. M.; Podust, L. M.; Montellano, P. R. O. de Biochemical and structural characterization of CYP124: A methyl-branched lipid ω -hydroxylase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 20687–20692.
- [150] Ouellet, H.; Podust, L. M.; Montellano, P. R. O. de *Mycobacterium tuberculosis* CYP130 - Crystal Structure, Biophysical Characterization, and Interactions with Antifungal Azole Drugs. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 5069–5080.
- [151] Zhang, H.; Chen, J.; Wang, H.; Xie, Y.; Ju, J.; Yan, Y.; Zhang, H. Structural analysis of HmtT and HmtN involved in the tailoring steps of himastatin biosynthesis. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 1675–1680.
- [152] Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 283–291.
- [153] Davis, I. W.; Leaver-Fay, A.; Chen, V. B.; Block, J. N.; Kapral, G. J.; Wang, X.; Murray, L. W.; Arendall, W. B.; Snoeyink, J.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, W375–W383.

- [154] Chen, V. B.; Arendall, W. B.; Headd, J. J.; Keedy, D. A.; Immormino, R. M.; Kapral, G. J.; Murray, L. W.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. Sect.* **2010**, *66*, 12–21.
- [155] Blanc, V.; Lagneaux, D.; Didier, P.; Gil, P.; Lacroix, P.; Crouzet, J. Cloning and analysis of structural genes from *Streptomyces pristinaespiralis* encoding enzymes involved in the conversion of pristinamycin IIB to pristinamycin IIA (PIIA): PIIA synthase and NADH:riboflavin 5'-phosphate oxidoreductase. *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 5206–5214.

Danksagung

Zunächst danke ich Professor Roderich Süßmuth herzlich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Vergabe dieses interessanten Themas, die guten Arbeitsbedingungen und seine stetige Unterstützung.

Professor Mohamed Marahiel danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und Professor Michael Gradzielski für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Besonderer Dank gilt Dr. Max Cryle für die sehr gute Zusammenarbeit bei dem P450_{sky}-Projekt. Durch sein stetes Interesse an meiner Arbeit, seine wissenschaftliche Erfahrung, die vielen Anregungen und seine Unterstützung habe ich sehr viel gelernt und dabei, besonders während der zwei Wochen in Heidelberg, viel Spaß gehabt. Ich möchte mich auch bei allen Mitarbeitern für die herzliche Aufnahme und die Hilfsbereitschaft während meiner Zeit am MPI bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt Dr. Tobias Werther für die Kooperation auf dem SkyMono-Projekt. Seine wissenschaftliche Neugier und fachliche Kompetenz hat unsere Forschung immer voran getrieben. Obwohl wir SkyMono nicht alles entlocken konnten, haben wir doch viel geschafft. Vielen Dank auch für den spannenden Einblick in das nächtliche Geheimnis der Proteinkristallographen am BESSY.

Bei allen Mitgliedern des Arbeitskreis Süßmuth möchte ich mich für das gute Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft bedanken. Auch wenn nicht immer alles ganz rund lief, und das Labor so manches Mal im Chaos zu versinken drohte, war es immer schön zu wissen, so nette Arbeitskollegen zu haben, besonders wenn die PCR/Klonierung/Aufreinigung/Reaktion (...) mal nicht so lief wie erhofft. Besonders meinen b...ezaubernden Bürokolleginnen Anja Kuthning, Sophia Zobel, Laura Vieweg und Natalia Piwowska danke ich von ganzem Herzen für die immer tatkräftige Unterstützung, ihre ehrliche Art und guten Ratschläge.

Tobias Werther, Sophia Zobel und Felix Gärtner danke ich für fleißiges Korrekturlesen dieser Arbeit und die sehr konstruktive Kritik.

Meiner Familie und meinem Freund Felix danke ich von ganzem Herzen für die Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit.