Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen der Biosynthese und Metabolisierung von cyclischen Dipeptiden in Actinobacteria

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Kirsten Brockmeyer

aus **Wuppertal**

Marburg/Lahn **2019**

Erstgutachter: **Prof. Dr. Shu-Ming Li**

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Michael Keusgen**

Eingereicht am **16.09.2019**

Tag der mündlichen Prüfung am **28.10.2019**

Hochschulkennziffer: 1180

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS I

PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN V

ERKLÄRUNG VI

ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE VII

ZUSAMMENFASSUNG 1

SUMMARY 3

1 EINLEITUNG 5

1.1 2,5-Diketopiperazine 5

1.1.1 Allgemeines 5

1.1.2 Derivatisierte Diketopiperazine 8

1.2 CDPS-haltige Gencluster 9

1.2.1 Allgemeines 9

1.2.2 Cyclodipeptidsynthasen 13

1.2.3 Cyclodipeptidoxidasen 16

1.3 Actinobacteria 18

1.3.1 Allgemeines 18

1.3.2 *Streptomyces noursei* 20

1.3.3 *Nocardiopsis dassonvillei* 21

1.3.4 *Nocardiopsis prasina* 23

2 ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT 25

3 MATERIAL UND METHODEN 27

3.1 Chemikalien, Geräte, Säulenmaterialien und Enzyme 27

3.1.1 Chemikalien 27

3.1.2 Geräte ... 29
3.1.3 Materialien zur Chromatographie ... 31
3.1.4 Enzyme und Kits ... 31

3.2 Nährmedien, Antibiotika und Puffer ... 31
3.2.1 Wasser ... 32
3.2.2 Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli* ... 32
3.2.3 Nährmedien zur Kultivierung von Actinobacteria ... 32
3.2.4 Antibiotika ... 32
3.2.5 Puffer und Lösungen ... 33

3.3 Plasmide, Primer, Mikroorganismen ... 36
3.3.1 Plasmide ... 36
3.3.2 Primer ... 40
3.3.3 Mikroorganismen ... 41

3.4 Bioinformatische Methoden ... 42

3.5 Methoden der Mikrobiologie ... 42
3.5.1 Kultivierung von *E. coli* ... 42
3.5.2 Kultivierung von Actinobacteria ... 43

3.6 Methoden der Molekularbiologie ... 43
3.6.1 Isolierung von genomischer DNA aus Actinobacteria ... 43
3.6.2 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* (Alkalische Lyse) ... 44
3.6.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ... 45
3.6.4 PCR zur zielgerichteten Mutagenese ... 46
3.6.5 Agarose-Gelelektrophorese ... 47
3.6.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen ... 47
3.6.7 Restriktion von DNA ... 47
3.6.8 Ligation von DNA-Fragmenten ... 48
3.6.9 Transformation von *E. coli* ... 49
3.6.10 DNA-Sequenzierung ... 50
3.6.11 Heterologe Genexpression in *E. coli* ... 50

3.7 Methoden der Biochemie ... 51
3.7.1 Gewinnung von Proteinrohextrakten aus *E. coli* ... 51
3.7.2 Reinigung von Hexahistidin-Fusionsproteinen mittels Nickel-Affinitätschromatographie ... 51
3.7.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung ... 51
3.7.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford ... 52
3.7.5 Western Blot-Analyse ... 52

3.7.6 Enzymatische Reaktionsansätze ... 53

3.8 Isolierung von Sekundärstoffen ... 54

3.8.1 Extraktion der Kulturen von *E. coli* ... 54

3.9 Instrumentelle Analytik niedermolekularer Substanzen ... 54

3.9.1 Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS) ... 54

4 ERGEBNISSE ... 55

4.1 Untersuchungen zur Cyclodipeptidsynthase CDPS-Np aus *Nocardiopsis prasina* *NRRL B-16235* ... 55

4.1.1 Einleitung ... 55

4.1.2 Amplifikation und Klonierung von *CDPS-Np* aus genomischer DNA von *N. prasina* B-16235 zur Expression in *E. coli* ... 57

4.1.3 Identifizierung der enzymatischen Produkte von CDPS-Np-His_6 ... 59

4.1.4 Vergleich der aktiven Zentren von ausgewählten Cyclodipeptidsynthasen ... 63

4.1.5 Analysen zur zielgerichteten Mutagenese der Bindetasche P1 von CDPS-Np ... 66

4.1.6 Analysen zur zielgerichteten Mutagenese der Bindetasche P2 von CDPS-Np ... 70

4.2 Untersuchungen zu Cyclodipeptidoxidasen aus Actinobacteria ... 73

4.2.1 Einleitung ... 73

4.2.2 Analysen zur Cyclodipeptidoxidase CDO_A-Np und CDO_B-Np aus *N. prasina* ... 82

4.2.3 Vergleichende Analysen zu Cyclodipeptidoxidasen aus *N. prasina*, *N. dassonvillei* und *S. noursei* ... 109

4.2.4 Analysen zum putativen Reaktionsmechanismus der Cyclodipeptidoxidasen ... 127

5 DISKUSSION ... 133

5.1 Die Cyclodipeptidsynthase CDPS-Np aus *Nocardiopsis prasina* NRRL B-16235 ... 133

5.2 Die Cyclodipeptidoxidasen aus Actinobacteria ... 134

5.2.1 Die Cyclodipeptidoxidase CDO_A-Np und CDO_B-Np aus *N. prasina* ... 134

5.2.2 Die drei Cyclodipeptidoxidasen aus *N. prasina*, *N. dassonvillei* und *S. noursei* im Vergleich ... 136

5.2.3 Der putative Reaktionsmechanismus der Cyclodipeptidoxidasen ... 136

6 REFERENZEN ... 137

7 ANHANG 143

7.1 Identifizierung der enzymatischen Produkte von CDPS-Np und deren Mutanten 143

7.2 Aminosäure-Motive der beiden Bindungstaschen im aktiven Zentrum ausgewählter CDPSs 145

7.3 Multipler Sequenzvergleich von putativen CDOs benachbarten CDPS aus Actinobacteria 146

7.4 Identifizierung der enzymatischen Produkte der Biotransformation von *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) durch CDO_A-Np und CDO_B-Np (pKB81) 150

7.5 Identifizierung der Bildung von *E*- und *Z*-Isomeren der Produkte der enzymatischen Umsetzung von *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) durch CDO_A-Np und CDO_B-Np (pKB81) 154

7.6 Identifizierung der enzymatischen Produkte der Biotransformation von *cyclo*(L-Phe-L-Leu) durch His_6-CDO_A-Np und CDO_B-Np-His_6 (pKB83) 155

7.7 Identifizierung der enzymatischen Produkte der Biotransformation von *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) und *cyclo*(L-Tyr-L-Tyr) durch CDO_A-Np und CDO_B-Np (pKB158 und pKB81) 156

7.8 Identifizierung der enzymatischen Produkte der Biotransformation von cyclischen Dipeptiden durch CDO_A-Np und CDO_B-Np (pKB81) 160

7.9 Identifizierung der enzymatischen Produkte der Biotransformation von cyclischen Dipeptiden durch Ndas_1146 und Ndas_1147 163

7.10 Identifizierung der enzymatischen Produkte der Biotransformation von cyclischen Dipeptiden durch AlbA und AlbB (pKB90) 166

7.11 Identifizierung der enzymatischen Produkte der Biotransformation von deuteriertem *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) durch CDO_A-Np und CDO_B-Np (pKB81) 169

7.12 Identifizierung der enzymatischen Produkte der Biotransformation von deuteriertem *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) durch Ndas_1146 und Ndas_1147 173

7.13 Identifizierung der enzymatischen Produkte der Biotransformation von deuteriertem *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) durch AlbA und AlbB (pKB90) 175

DANKSAGUNG 178

CURRICULUM VITAE 179

Publikationen und Präsentationen

Publikationen

Mutations of Residues in Pocket P1 of a Cyclodipeptide Synthase Strongly Increase Product Formation

Kirsten Brockmeyer and Shu-Ming Li

Journal of Natural Products 2017, 80, 2917-2922

Comparative studies on similarities and differences of cyclodipeptide oxidases for installation of C-C double bonds at the diketopiperazine ring

Lena Mikulski, Johanna Schäfer, **Kirsten Brockmeyer**, Rixa Kraut, and Shu-Ming Li

ACS Chemical Biology, under revision

Präsentation bei Tagungen

Enzymatische Dehydrierung von cyclischen Dipeptiden

Kirsten Brockmeyer, Rixa Kraut und Shu-Ming Li

Posterpräsentation und Kurzvortrag,

29. Irseer Naturstofftage (Dechema), 22.-24. Februar 2017, Irsee

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„MOLEKULARBIOLOGISCHE UND BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN DER BIOSYNTHESE UND METABOLISIERUNG VON CYCLISCHEN DIPEPTIDEN IN ACTINOBACTERIA“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

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

Marburg, am 16.09.2019

.....

(Kirsten Brockmeyer)

Abkürzungen und Fachbegriffe

Im Rahmen dieser Arbeit wurden physikalische Größen und Einheiten nach dem Internationalen Einheitensystem (SI; *Système international d'unités*) verwendet, ebenso wie daraus abgeleitete Größen und Einheiten. Aminosäuren wurden entweder im Einbuchstaben- oder im Dreibuchstabencode (IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature 1984) benannt.

2,5-DKP	2,5-Diketopiperazin
A	Adenin
aa	Aminosäure (amino acid)
aaRS	Aminoacyl-tRNA-Synthetase
ABAS	Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe
Ant	Anthranilsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoyl-phosphat
bidest.	bidestilliert
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar (base pair)
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CDO	Cyclodipeptidoxidase
CDPS	Cyclodipeptidsynthase
Da	Dalton
DAD	Photodioden-Array-Detektor
dem.	demineralisiert
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'Desoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylenediamine tetraacetic acid)
EIC	extrahiertes Ionenchromatogramm (extracted-ion chromatogram)
et al.	und andere (et alii)
G	Guanin
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
h	Stunde
His_6	Hexahistidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
IPTG	Isopropyl-ß-thiogalactopyranosid
JGI-PGF	US DOE Joint Genome Institute
kb	Kilobase
LB	Lysogeny Broth
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometie-Kopplung (liquid chromatography-mass spectrometry)

M	Molarität (mol/l)
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MCS	Multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometie
MT	Methyltransferase
N. dassonvillei	*Nocardiopsis dassonvillei*
N. prasina	*Nocardiopsis prasina*
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Ni-NTA	Nickel-Nitritoltriessigsäure
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase
NRRL	Northern Regional Research Laboratory (ARS Culture Collection)
OD	optische Dichte
P. roqueforti	*Penicillium roqueforti*
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	parts per million
Primer	Oligonukleotid
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease (ribonuclease)
RP	Umkehrphase (reversed-phase)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
S. noursei	*Streptomyces noursei*
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
sec	Sekunde (seconds)
T	Thymin
TAE	Tris-EDTA-Acetat
TB	Terrific Broth
TEMED	N,N,N‘,N‘-Tetramethyethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TRBA	Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
U	unit
UV	ultraviolett
v	Volumen
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
w	Masse (weight)
W	Watt
w/v	Masse pro Volumen (weight per volume)
x *g*	Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-ß-D-galactopyranosid

Zusammenfassung

2,5-Diketopiperazine sind die Grundgerüste von einigen bereits zugelassenen Arzneistoffen mit unterschiedlichen Indikationen und stellen ebenso wichtige Grundstrukturen für weitere potentielle Wirkstoffe dar. Das Grundgerüst der 2,5-Diketopiperazine kann unter anderem von Cyclodipeptidsynthasen (CDPSs) synthetisiert werden. Es wurde bereits berichtet, dass die Motive im aktiven Zentrum dieser Enzyme eine Vorhersage über die potentiell gebildeten cyclischen Dipeptide zulassen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine putative Cyclodipeptidsynthase namens CDPS-Np aus *Nocardiopsis prasina* analysiert. Nach der Betrachtung der Motive im aktiven Zentrum zufolge waren hierbei phenylalanin-haltige cyclische Dipeptide zu erwarten. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass CDPS-Np mit *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) als Hauptprodukt und *cyclo*(L-Tyr-L-Tyr), *cyclo*(L-Tyr-L-Met) und *cyclo*(L-Tyr-L-Leu) oder *cyclo*(L-Tyr-L-Ile) als Nebenprodukte tyrosin-haltige cyclische Dipeptide synthetisiert. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass diese Vorhersagen zwar einen Hinweis auf die Synthese cyclischer Dipeptide ermöglichen, der experimentelle Nachweis der tatsächlichen Produkte jedoch unverzichtbar ist. Aufgrund der Abweichung der tatsächlichen von der erwarteten Produktbildung von CDPS-Np wurden die Motive im aktiven Zentrum genauer betrachtet. Durch zielgerichtete Mutagenese innerhalb der zwei Bindetaschen P1 und P2 des aktiven Zentrums von CDPS-Np solllte deren Substratspezifität verändert werden. Hierfür wurden zunächst verschiedene zielgerichtete Mutationen innerhalb der Bindetasche P1 in den Positionen Thr82 und Tyr196 eingeführt. Die ursprüngliche Absicht die Substratspezitität von CDPS-Np zu verändern konnte durch diese Experimente jedoch nicht erzielt werden. Allerdings konnte bei CDPS-Np_T82V_Y196F im Vergleich zum Wildtypen die 8- bzw. 10-fache Produktion von *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) bzw. *cyclo*(L-Tyr-L-Tyr) festgestellt werden. Gezielt eingeführte Mutationen innerhalb der Bindetasch P2 von CDPS-Np führten ebenso nicht zur Änderung des Produktspektrums.

Während die Cyclodipeptidsynthasen die Grundstruktur für potentielle Wirkstoffe bilden, können diese durch unterschiedliche Enzyme derivatisiert werden. Hierbei können zum einen Methyltransferasen Methyl-Reste auf C- oder O-Atomen anfügen. Zum anderen können Cytochrom P450 Enzyme C-C-Bindungen, Hydroxygruppen oder Doppelbindungen einfügen. In dieser Arbeit wurden Cyclodipeptidoxidasen (CDOs), welche Doppelbindungen an Positionen 3 und 6 in 2,5-Diketopiperazin-Grundgerüste einfügen können, analysiert. Cyclodipeptidoxidasen bestehen aus zwei Untereinheiten, welche nur zusammen zu der enzymatischen Bildung einer Doppelbindung führen. Bisher wurden zwei Cyclodipeptidoxidasen genauer analysiert. Zum einen AlbA und AlbB aus *Streptomyces noursei* und zum anderen Ndas_1146 und Ndas_1147 aus *Nocardiopsis dassonvillei*. In dieser Arbeit wurde eine weitere putative Cyclodipeptidoxidase, CDO_A-Np und CDO_B-Np aus

Nocardiopsis prasina, genauer betrachtet. Hierfür wurde die überlappende Gensequenz in einen Vektor zur Überproduktion von CDO_A-Np und CDO_B-Np in *E. coli* kloniert. Durch die Identifizierung der enzymatischen Produkte einer Biotransformation des naturlichen Substrats *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) in *E. coli* konnte die Aktivität von CDO_A-Np und CDO_B-Np bestätigt werden. Des Weiteren konnte ebenso die Aktivität von His_6-CDO_A-Np und CDO_B-Np-His_6 gezeigt werden. Für weitere Untersuchungen wurden die einzelnen Gensequenzen der Cyclodipeptidoxidasen aus *Nocardiopsis prasina und Nocardiopsis dassonvillei* in verschiedene Expressionsvektoren für *E. coli* kloniert. Hierbei bedarf es der Optimierung der Überproduktion und Reinigung von CDO_A-Np-His_6, CDO_B-Np-His_6, Ndas-1146-His_6 und Ndas-1147-His_6. Des Weiteren sollte die Cyclodipeptidoxidase aus *Nocardiopsis prasina* mit den bereits bekannten Cyclodipeptidoxidasen aus *Nocardiopsis dassonvillei* und *Streptomyces noursei* verglichen werden. Hierfür wurde zunächst die überlappende Gensequenz aus *Streptomyces noursei* zur Überproduktion von AlbA und AlbB in *E. coli* kloniert. Anschließend wurde die Biotransformation verschiedener cyclischer Dipeptide durch CDO_A-Np/CDO_B-Np, Ndas_1146/Ndas_1147 sowie AlbA/AlbB untersucht. Nach der Identifizierung der enzymatischen Produktbildung durch die drei Cyclodipeptidoxidasen mittels LC-MS wurden diese miteinander verglichen, was bisher noch nicht betrachtet wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass diese sich sehr ähnlich, jedoch nicht gleich verhalten.

Der Reaktionsmechanismus der CDOs ist weitgehend unbekannt. Es kommt hierbei eine direkte Dehydrierung, eine α-Hydroxylierung mit anschließender Dehydratation oder eine Imin-Bildung in Verbindung mit einer anschließenden Isomerisierung in Frage. In dieser Arbeit wurde der Reaktionsmechanismus anhand einer Biotransformation von deuteriertem *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) durch CDO_A-Np/CDO_B-Np aus *Nocardiopsis prasina*, Ndas_1146/Ndas_1147 aus *Nocardiopsis dassonvillei* und AlbA/AlbB aus *Streptomyces noursei* in *E. coli* analysiert. Nach der Identifizierung der enzymatischen Produkte mittels LC-MS konnten keine Produkte, welche auf Bildung einer Imin-Zwischenstufe hindeuten, festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten somit auf eine direkte Dehydrierung.

Summary

2,5-Diketopiperazines are the basic structures of some already approved drugs with different indications and therefore represent important skeletons for new potential biological active structures. This basic structure can be formed by cycliodipeptide synthases (CDPSs). It has been postulated that special motifs in the active center allow a prediction of possibly formed cyclic dipeptides.

In this work, a cyclodipeptide synthase from *Nocardiopsis prasina* named CDPS-Np was analyzed. According to the motives in the active center, this CDPS is proposed to produce phenylalanine-containing cyclic dipeptides. After experimental proof, CDPS-Np was shown to produce tyrosine-containing cyclic dipeptides with *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) as the main and *cyclo*(L-Tyr-L-Tyr), *cyclo*(L-Tyr-L-Met) and *cyclo*(L-Tyr-L-Leu) or *cyclo*(L-Tyr-L-Ile) as minor products. These results provided evidence that this kind of prediction allows to become a hint of possible product formation, but an experimental proof is necessary. Due to the deviation of the actual from the expected product formation, motifs in the active center were analyzed. The substrate specificity should be changed by site-directed mutagenesis in the two binding pockets P1 and P2. For this purpose, various mutations were first introduced in position Thr82 and Tyr196 in binding pocket P1 of CDPS-Np. The original intention to change the substrate specificity could not be achieved by these experiments. However, an 8-fold increase in product formation of *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) and 10-fold of *cyclo*(L-Tyr-L-Tyr) were detected in the case of the mutant CDPS-Np_T82V_Y196 compared to that of the wild type. Site-directed mutagenesis in the binding pocket P2 also did not change the product spectrum.

While the CDPSs are able to form the basic structure of potential active agents, different enzymes are able to modify these structures. Methyltransferases are able to attach a methyl-residue to either C- or O-atoms. Cytochrome P450 enzymes are for example able to bild C-C-bonds and to introduce hydroxy groups or double bonds. In this work, cyclodipeptide oxidases (CDOs) were analyzed, which introduce double bonds at positions 3 and 6 of 2,5-diketopiperazine skeleton. CDOs consist of two subunits, which are only together active for introduction of double bonds. Until now only two CDOs has been analyzed in details. AlbA and AlbB from *Streptomyces noursei* and Ndas_1146 and Ndas_1147 from *Nocardiopsis dassonvillei*. The third CDO named CDO_A-Np and CDO_B-Np from *Nocardiopsis prasina* has been analyzed in this work. For this purpose, the overlapping nucleotide sequence was cloned into a vector for overproduction of CDO_A-Np and CDO_B-Np in *E. coli*. By identifying the enzymatic products of a biotransformation of the natural substrate *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) in *E. coli*, the functionality of CDO_A-Np and CDO_B-Np could be confirmed. Furthermore, the activity of His_6-CDO_A-Np and CDO_B-Np-His_6 was also shown. For futher investigations, the separated genes of the cyclodipeptide oxidases from *Nocardiopsis prasina* and *Nocardiopsis dassonvillei* were already cloned into different expression

vectors for overproduction in *E. coli*. This requires the optimization of overproduction and purification of CDO_A-Np-His_6, CDO_B-Np-His_6, Ndas-1146-His_6 and Ndas-1147-His_6. Furthermore, the cyclodipeptide oxidase from *Nocardiopsis prasina* was compared with the alrady known cyclodipeptide oxidases from *Nocardiopsis dassonvillei* and *Streptomyces noursei*. For this purpose, the overlapping nucleotide sequence from *Streptomyces noursei* was cloned into an expression vector for overproduction of AlbA and AlbB in *E. coli*. Subsequently, the biotransformation of various cyclic dipeptides by CDO_A-Np/ CDO_B-Np, Ndas_1146/Ndas_1147 as well as AlbA/AlbB was investigated. After identification of the enzymatic products by LC-MS, these results were compared. In this context it was the first time that these three cyclodipeptide oxidases has been compared with each other. These enzymes share similar, but not identical behaviors.

The mechanism of the CDO reaction is unknown. A direct dehydration, α-hydroxylation followed by loss of water or imine formation and a following isomerization are possible scenarios. The mechanism was analyzed by biotransformation of deuterated *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) using CDO_A-Np/CDO_B-Np from *Nocardiopsis prasina*, Ndas_1146/Ndas_1147 from *Nocardiopsis dassonvillei* and AlbA/AlbB from *Streptomyces noursei* in *E. coli*. After analysis of the products by LC-MS, no product indicating an imine-intermediate were detected. These results suggest a direct dehydration as plausible mechanism of the reaction.

1 Einleitung

1.1 2,5-Diketopiperazine

1.1.1 Allgemeines

Chemische Strukturen, welche die Grundstruktur von 2,5-Diketopiperazinen (2,5-DKPs) besitzen, verfügen über vielseitige biologische Eigenschaften und stellen somit potentielle Wirkstoffkandidaten für die pharmazeutische Industrie dar (Borthwick, 2012; Huang *et al.*, 2014). In Abbildung 1-1 sind einige Arzneistoffe dargestellt, welche momentan therapeutisch genutzt werden bzw. sich bereits in der Klinischen Prüfung befinden. Tadalafil wird unter dem Handelsnamen Cialis® als Phosphodiesterase-5-Hemmer zur Behandlung der erektilen Dysfunktion oder des benignen Prostatasyndroms beim erwachsenen Mann angewendet (Rote Liste® online, Stand 6.07.2018). Retosiban fungiert als Oxytocin-Antagonist und wird derzeit zur Behandlung vorzeitiger Wehen in einer Klinischen Phase III Studie untersucht (NCT02377466, ClinicalTrials.gov). Aplaviroc ist ein CCR5 Entry-Inhibitor, der zur Behandlung einer HIV-Infektion entwickelt wurde. Er schaffte es ebenso bis hin zu Klinischen Phase III Studien, welche jedoch im Jahre 2005 aufgrund auftretender arzneimittelinduzierter Hepatitis eingestellt wurde (Borthwick, 2012). Plinabulin erwies sich als Mikrotubuli-Inhibitor

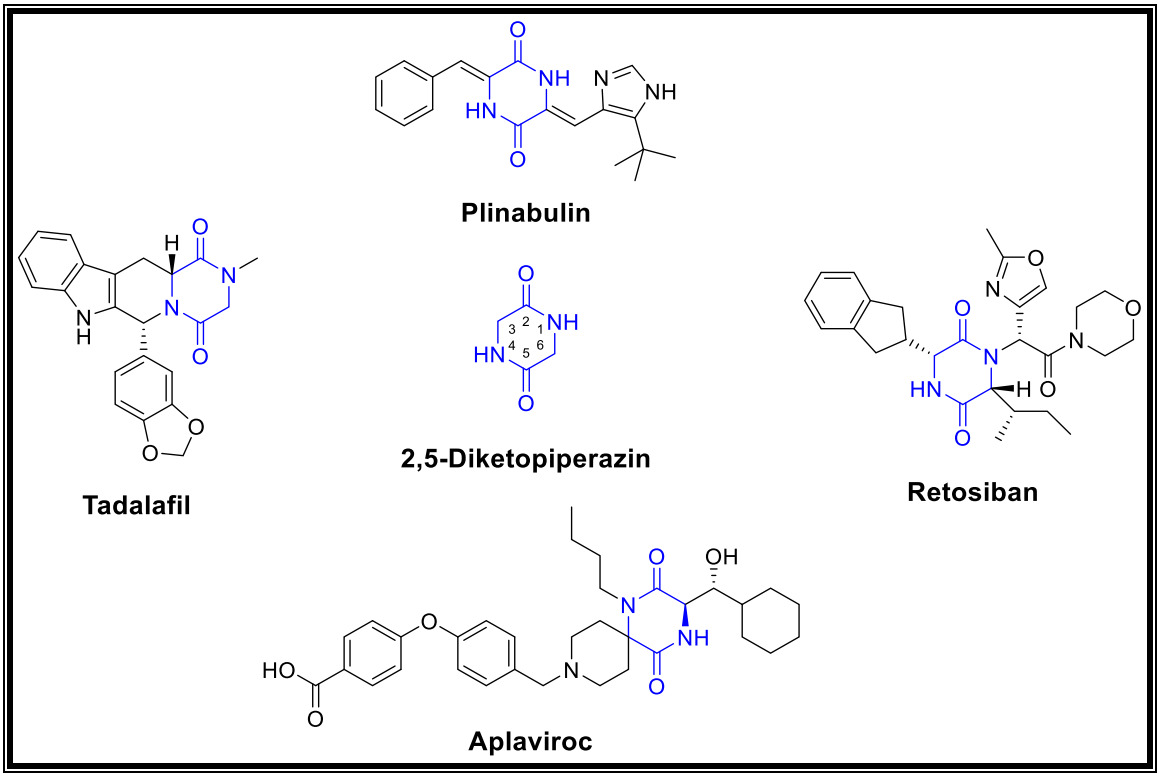


Abbildung 1-1: Chemische Strukturen von ausgewählten Arzneistoffen bzw. Arzneistoffkandidaten mit 2,5-DKP-Struktur. Die Grundstruktur der 2,5-DKPs ist hierbei in blau markiert.

(Nicholson *et al.*, 2006; Yamazaki *et al.*, 2012) und befindet sich zur Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) in Phase III der Klinischen Prüfung (NCT02504489, ClinicalTrials.gov).

Bei der Entwicklung von neuen Arzneistoffen können Naturstoffe als Grundlage dienen. Plinabulin stellt hierbei ein Beispiel dafür dar, denn bei diesem handelt es sich um ein synthetisches Derivat des Naturstoffes (-)-Phenylahistin. (-)-Phenylahistin wurde zuerst aus *Aspergillus ustus* NSC-F038 isoliert und fungiert bereits als Mitose-Hemmstoff mit cytotoxischer Wirkung gegenüber verschiedener Tumorzelllinien (Kanoh *et al.*, 1997; Kanoh *et al.*, 1999). Naturstoffe mit einem 2,5-Diketopiperazin-Grundgerüst verfügen jedoch über vielfältige biologische Aktivitäten. Zum Beispiel besitzen einige von ihnen antibakterielle, antimykotische, antivirale, antitumor, immunsupressive oder entzündungshemmende Eigenschaften (Belin *et al.*, 2012). In Abbildung 1-2 sind einige weitere Naturstoffe mit einem 2,5-Diketopiperazin-Grundgerüst dargestellt, welche bereits aus Pilzen oder aus Bakterien isoliert werden konnten. Es handelt sich bei diesen um derivatisierte cyclische Dipeptide. Während die enzymatische Biosynthese dieser Grundstrukturen in Ascomyceten weitestgehend mit Hilfe von **N**icht-**r**ibosomalen **P**eptid-**S**ynthetasen (NRPSs) erfolgt, können in Actinobacteria auch sogenannte **C**yclo**di**peptid**s**ynthasen (CDPSs) für die Bildung dieser Strukturen verantwortlich sein (Belin *et al.*, 2012; Giessen & Marahiel, 2014; Walsh, 2016). Die hierbei gebildeten cyclischen Dipeptide werden weitergehend enzymatisch derivatisiert. Zum Beispiel können diese Grundstrukturen durch Methyltransferasen an O- oder N-Atomen methyliert, durch Prenyltransferasen regulär oder revers prenyliert oder durch Cytochrom P450-Enzyme oder **C**yclo**d**ipeptid**o**xidasen (CDOs) dehydriert werden (Giessen & Marahiel, 2015; Mishra *et al.*, 2017).

Roquefortin C ist ein weiterer Naturstoff, der aus dem cyclischen Dipeptid *cyclo*(L-Trp-L-His) hervorgeht. Es handelt sich hierbei um ein Mycotoxin, welches bakteriostatische Eigenschaften gegenüber grampositiven Bakterien besitzt und mit Cytochrom P450 Enzymen aus Säugetieren interagieren kann (Aninat *et al.*, 2001; Borthwick, 2012; Kopp-Holtwiesche & Rehm, 1990). Besonders *Penicillium roqueforti* ist neben weiteren *Penicillium* spp. dafür bekannt, große Mengen dieses Mycotoxins zu produzieren. Allerdings korrelieren diese *in vitro* produzierten Mengen nicht mit jenen aus verschiedenen Blauschimmelkäse-Sorten, bei deren Herstellung diese Stämme verwendet werden (Finoli *et al.*, 2001). Tryprostain B aus *Aspergillus fumigatus*, welches auf der Grundstruktur *cyclo*(L-Trp-L-Pro) basiert, erwies sich als Inhibitor des Zellzyklus während der G2/M-Phase (Cui *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2002). Neoechinulin A, ein Derivat von *cyclo*(L-Trp-L-Ala), wurde aus *Aspergillus* spp. isoliert und besitzt aufgrund seiner neuroprotektiven Wirkung Potential eine Anwendung bei neurodegenerativen Erkrankungen zu finden (Borthwick, 2012). Thaxtomin A wiederum ist ein Phytotoxin aus Actinobacteria (Borthwick, 2012). Dieses Derivat von *cyclo*(L-Trp-L-Phe) wird von *Streptomyces* spp. produziert und besitzt herbizide Wirkung gegen Mono- und Dikotylen (Borthwick, 2012). Gliotoxin, bekannt aus *Aspergillus fumigatus*, ist ein weiteres Mycotoxin aus Ascomyceten mit

immunsuppressiven und cytotoxischen Eigenschaften (Borthwick, 2012). Dieses geht auf die Grundstruktur von *cyclo*(L-Phe-L-Ser) zurück. Ein Beispiel für einen Naturstoff, der auf einem weiteren phenylalanin-haltigen cyclischen Dipeptid basiert, stellt XR334 dar. Dieses Derivat von *cyclo*(L-Phe-L-Tyr) wurde aus *Streptomyces* sp. isoliert und vermag den inhibitorischen Effekt des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors Typ 1 (PAI-1) umzukehren (Borthwick, 2012; Bryans *et al.*, 1996). Albonoursin, ein Derivat von *cyclo*(L-Phe-L-Leu), wird von *Streptomyces noursei* synthetisiert und wirkt antibiotisch gegenüber verschiedenen *Bacillus* spp. (Borthwick, 2012; Fukushima *et al.*, 1973). Bicyclomycin wurde aus *Streptomyces sapporonesis* und *Streptomyces aizumenses* isoliert und ist ein Breitspektrum-Antibiotikum gegen gramnegative Bakterien, sowie gegen das grampositive Bakterium *Micrococcus luteus* (Borthwick, 2012). Dieses Derivat von *cyclo*(L-Ile-L-Leu) wurde bis 2005 unter dem Namen Bicozamycin zur Behandlung von Diarrhoe beim Menschen und von bakterieller Diarrhoe bei Schweinen und Kälbern eingesetzt (Borthwick, 2012).

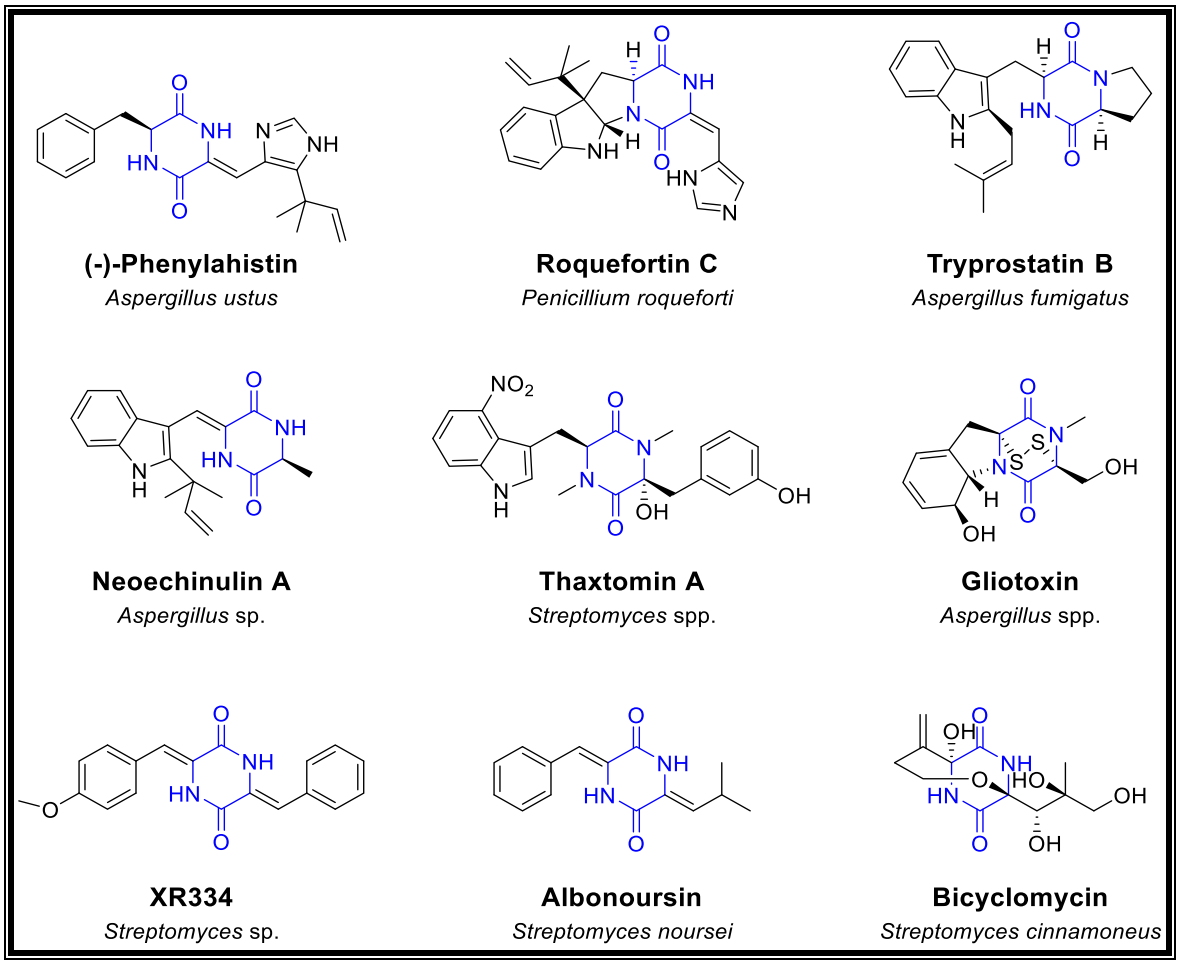


Abbildung 1-2: Chemische Strukturen einiger derivatisierter cyclischer Dipeptide aus Bakterien und Pilzen.

1.1.2 Derivatisierte Diketopiperazine

1.1.2.1 Dehydro-2,5-Diketopiperazine

Neben anderen Derivaten kommen in der Natur unterschiedliche Dehydro-2,5-Diketopiperazine vor. Diese Derivatisierung der Grundstrukturen erfolgen in der Regel entweder unter Einwirkung von Cytochrom P450 Enzymen oder von Cyclodipeptidoxidasen. In Kapitel 1.1.1 wurden bereits einige Naturstoffe wie Roquefortin C, XR334, Albonoursin und (-)-Phenylahistin vorgestellt (Abbildung 1-2). Bei dem Naturstoff (-)-Phenylahistin handelt es sich um ein 6-Dehydro-Derivat des revers prenylierten *cyclo*(L-Phe-L-His) (Kanoh *et al.*, 1997; Kanoh *et al.*, 1999). Bei Plinabulin wiederum handelt es sich um ein synthetisches 3,6-Dehydro-Derivat des (-)-Phenylahistins, bei welchem die reverse Prenylierung durch einen tertiären Butyl-Rest substituiert wurde. Wie bereits zuvor erwähnt, schaffte es Plinabulin bisher aufgrund seiner biologischen Aktivität in Phase III Studien der Klinischen Prüfung zur Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC). Auf dem Weg hierhin wurden einige Untersuchungen an unterschiedlichen Dehydro-Derivaten durchgeführt (Kanzaki *et al.*, 2002; Kanzaki *et al.*, 2004). In Abbildung 1-3 sind einige interessante Strukturen dieser Derivate dargestellt.

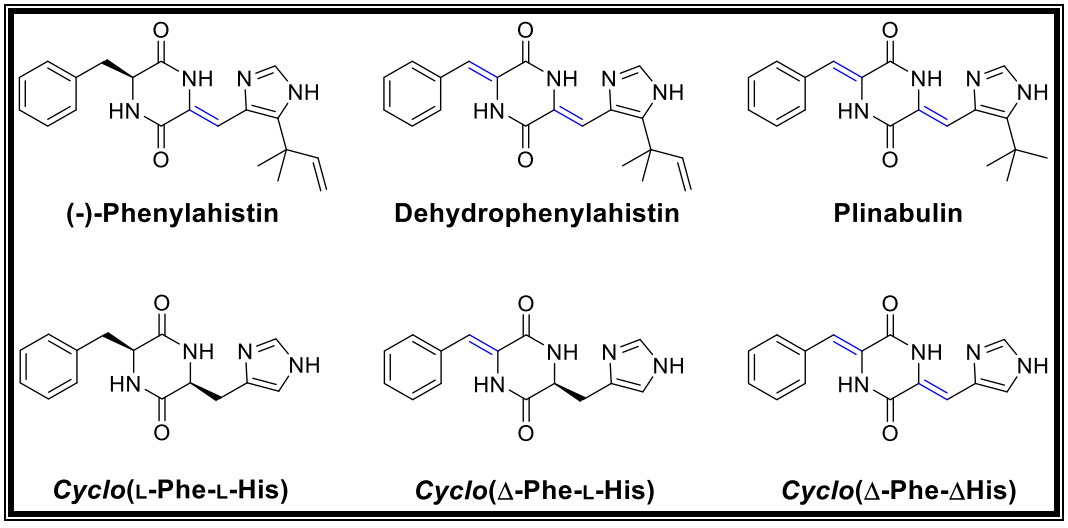


Abbildung 1-3: Chemische Strukturen ausgewählter Dehydro-2,5-Diketopiperazine. Die betreffenden Doppelbindungen sind blau markiert.

Cyclo(L-Phe-L-His) sowie dessen beiden 3-Dehydro- bzw. 3,6-Dehydro-Derivate, *cyclo*(Δ-Phe-L-His) bzw. *cyclo*(Δ-Phe-ΔHis), wurden in Hinblick auf deren inhibitorische Aktivität anhand der ersten Zellteilung von Seeigelembryonen getestet (Kanzaki *et al.*, 2004). Während *cyclo*(L-Phe-L-His) und *cyclo*(Δ-Phe-L-His) hier keine biologische Aktivität zeigten, erwies sich *cyclo*(Δ-Phe-ΔHis) immerhin mehr als 8-fach wirksamer als Albonoursin. Das 3,6-Dehydro-Derivat von (-)-Phenylahistin, Dehydrophenylahistin, wurden ebenso in Hinblick auf dessen biologische Aktivität anhand derselben Zelllinie untersucht und zeigte sich wiederum 2000-fach aktiver als *cyclo*(Δ-Phe-ΔHis), welches auf die

reverse Prenylierung zurückzuführen ist (Kanzaki *et al.*, 2004). Dehydrophenylahistin zeigte hierbei weitergehend eine um mehr als 1000-fach bzw. mehr als 10.000-fach höhere Aktivität als (-)-Phenylahistin bzw. Albonoursin (Kanzaki *et al.*, 2002; Kanzaki *et al.*, 2004). Dies zeigt deutlich, dass die unterschiedlichen Dehydrierungen der cyclischen Dipeptide, neben anderen Substituierungen, einen nicht unwesentlichen Einfluss auf die biologische Aktivität dieser ausüben können.

1.2 CDPS-haltige Gencluster

1.2.1 Allgemeines

Einige der in Kapitel 1.1 vorgestellten Substanzen gehen aus sogenannten Cyclodipeptidsynthase- (CDPS-) Genclustern hervor. Bisher wurden lediglich einige dieser Cluster aus grampositiven Bakterien aufgeklärt. Hierzu gehören die Biosynthese von Albonoursin in *Streptomyces noursei* (*S. noursei*), die von methyliertem *cyclo*(L-Trp-L-Trp) in *A. mirum* (*A. mirum*), die Biosynthese verschiedener Nocazine in *Nocardiopsis dassonvillei* (*N. dassonvillei*), die Biosynthese von Pulcherrimin in *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) sowie die von Mycocyclosin in *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Diese Cluster bestehen zum einen jeweils aus einem Gen, welches die CDPS kodiert, und somit für die Bildung der jeweiligen Grundstrukturen verantwortlich ist, und zum anderen aus zusätzlichen Genen, welche diese Grundstrukturen weiter modifizieren. Hierbei kommen unterschiedliche Enzymgruppen in Frage, welche im Folgenden vorgestellt werden.

Mit der Aufklärung der Biosynthese von Albonoursin aus *S. noursei* (Abbildung 1-4) wurde im Jahre 2002 zum ersten Mal ein solches CDPS-haltiges Gencluster beschrieben (Lautru *et al.*, 2002). Hierbei ist die Cyclodipeptidsynthase (CDPS) namens AlbC für die Bildung des cyclischen Dipeptides *cyclo*(L-Phe-L-Leu) verantwortlich. In einem weiteren Schritt wird diese Grundstruktur durch die Cyclodipeptidoxidase (CDO), bestehend aus den beiden Untereinheiten AlbA und AlbB, zu dessen 3,6-Dehydro-Derivat *cyclo*(ΔPhe-ΔLeu), Albonoursin, umgewandelt.

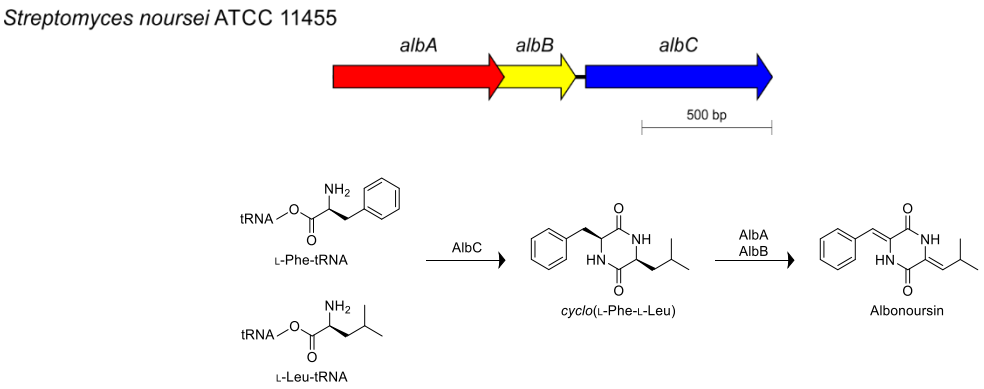


Abbildung 1-4: Biosynthese von Albonoursin in Streptomyces noursei (Lautru et al., 2002).

Ein weiteres Beispiel für ein aus zwei Genen bestehendes CDPS-haltiges Gencluster aus Actinobacteria stellt die Biosynthese von methyliertem *cyclo*(L-Trp-L-Trp) aus *A. mirum* dar (Abbildung 1-5) (Giessen *et al.*, 2013a). Die CDPS Amir_4627 ist für die Bildung von *cyclo*(L-Trp-L-Trp) verantwortlich, während die *S*-Adenosylmethionin (SAM)-abhängige Methyltransferase Amir_4628 anschließend ein oder zwei *N*-Methylierungen einfügt.

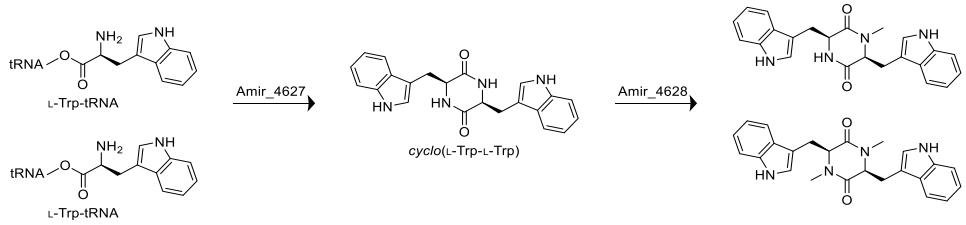


Abbildung 1-5: Biosynthese von methyliertem cyclo*(L-Trp-L-Trp) in Actinosynnema mirum (Giessen et al., 2013a).*

Es kommen jedoch auch Cluster vor, in denen die Grundstrukturen durch eine CDO sowie durch Methyltransferasen modifiziert werden. Ein Beispiel hierfür stellt die Biosynthese verschiedener Nocazine aus *N. dassonvillei* dar (Abbildung 1-6) (Giessen *et al.*, 2013b). Die CDPS Ndas_1148 bildet hierbei zunächst *cyclo*(L-Phe-L-Tyr). Die CDO, bestehend aus Ndas_1146 und Ndas_1147, überführen diese wiederum in dessen 3-Dehydro-, 6-Dehydro- bzw. 3,6-Dehydro-Derivate. Die SAM-abhängige *O*-Methyltransferase Ndas_1149 fügt schließlich eine Methylierung an der Hydroxyl-Gruppe des Tyrosin-Restes ein. Ausgehend von der Grundstruktur resultieren so zum Beispiel Nocazine E oder XR334. Die SAM-abhängige *O*-/*N*-Methyltransferase Ndas_1145 kann des Weiteren Methylierungen am 2,5-DKP-Ring einfügen und führt somit zu Bildung weiterer Vertreter der Nocazin-Familie (Giessen & Marahiel, 2014).

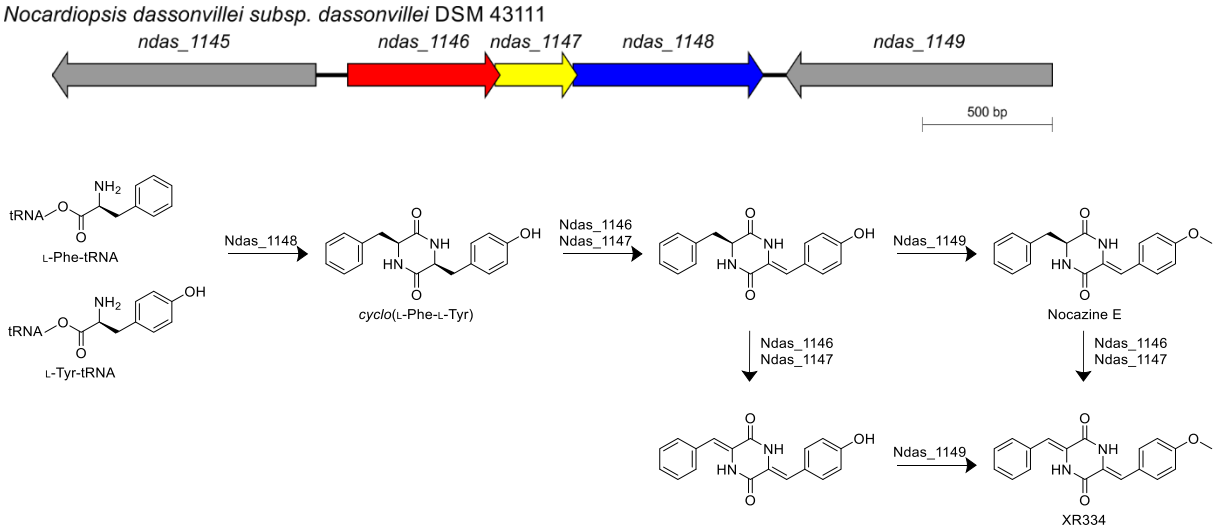


Abbildung 1-6: Biosynthese von Nocazinen in Nocardiopsis dassonvillei (Giessen et al., 2013b).

Neben CDOs und Methyltransferasen sind ebenso CDPS-haltiges Gencluster bekannt, bei denen Cytochrom P450 Enzyme die cyclischen Dipeptide weiter umsetzten. In *M. tuberculosis* produziert die CDPS Rv2275 *cyclo*(L-Tyr-L-Tyr) (Belin *et al.*, 2009; Belin *et al.*, 2012). Diese wird anschließend durch das Cytochrom P450 Enzym CYP121 zu Mycocyclosin umgesetzt (Abbildung 1-7). Hierbei wird oxidativ eine C-C-Bindung zwischen den beiden Tyrosin-Resten katalysiert (Belin *et al.*, 2009).

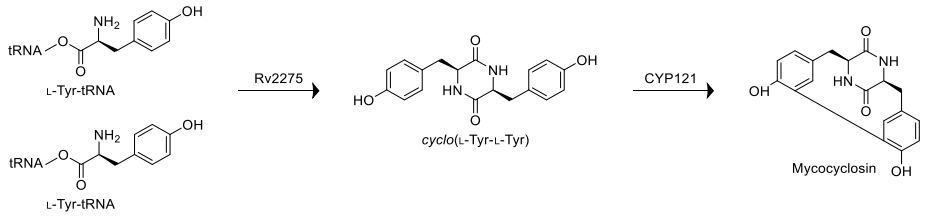


Abbildung 1-7: Biosynthese von Mycocyclosin in Mycobacterium tuberculosis (Belin et al., 2009).

Die Biosynthese von Pulcherrimin in *B. subtilis* (Abbildung 1-8) erfolgt ebenso mit Hilfe einer CDPS sowie eines Cytochrom P450 Enzyms (Cryle *et al.*, 2010). YvmC bildet hierbei das cyclische Dipeptid *cyclo*(L-Leu-L-Leu). CypX, ein CYP134A1 Enzym, katalysiert die Bildung von Pulcherriminsäure. Hierbei kommt es zu einer zweifachen N-Oxid-Bildung sowie einer Aromatisierung der Grundstruktur. Durch die Reaktion mit Fe^{3+}-Ionen wird anschließend Pulcherrimin gebildet.

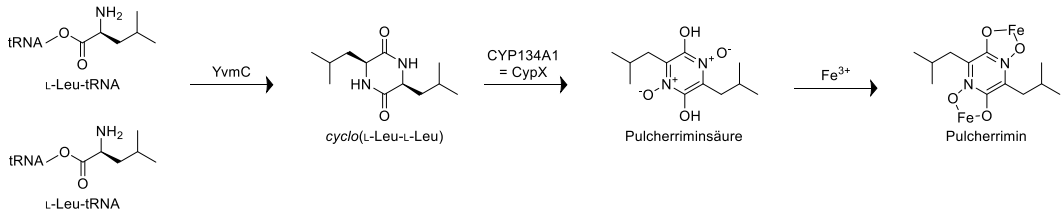


Abbildung 1-8: Biosynthese von Pulcherrimin in Bacillus subtilis (Cryle et al., 2010).

Ein weiteres Cytochrom P450 Enzym ist in der Biosynthese von Naseseazine C in *Streptomyces* sp. involviert (Abbildung 1-9) (Tian *et al.*, 2018). Eine Sequenzanalyse von NascA impliziert, dass es sich hierbei um eine CDPS mit *cyclo*(L-Trp-L-Pro) als Produkt handelt (Borgman *et al.*, 2019). Das Cytochrom P450 Enzym NascB katalysiert anschließend eine intermolekulare C-C-Bindung zwischen zwei Molekülen der Vorstufe (Tian *et al.*, 2018).

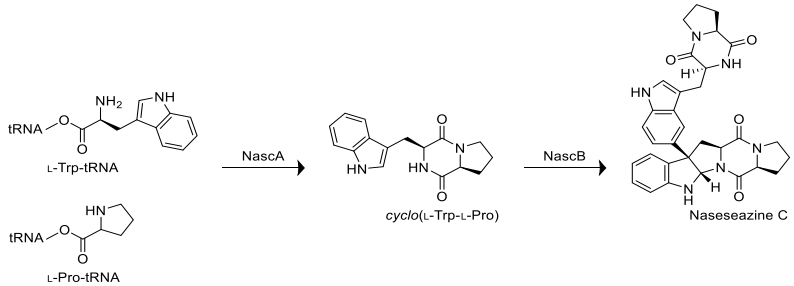


Abbildung 1-9: Biosynthese von Nasesezain C in Streptomyces sp. (Borgman et al., 2019; Tian et al., 2018).

Die Biosynthese von 1-(8-Guaninyl)-*cyclo*(L-Tpr-L-Tpr) in *Streptomyces purpureus* (Abbildung 1-10) beruht ebenfalls auf dem Zusammenspiel einer CDPS ($CDPS_{NB5737}$) und einem Cytochrom P450 Enzym ($P450_{NB5737}$) (Yu *et al.*, 2018). $CDPS_{NB5737}$ synthetisiert hierbei zunächst *cyclo*(L-Tyr-L-Tyr), während $P450_{NB5737}$ eine C-N-Bindung zwischen dem Stickstoff-Molekül des Indol-Restes von *cyclo*(L-Tyr-L-Tyr) und einem Kohlenstoff-Molekül von Guanin katalysiert.

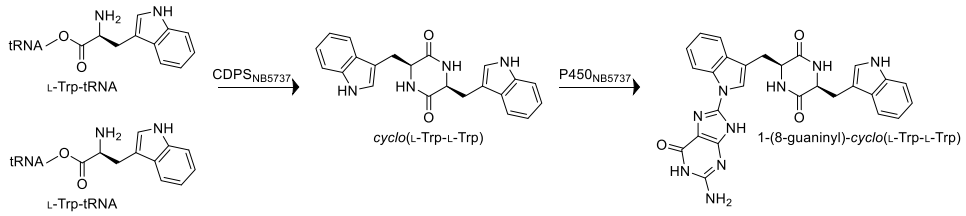


Abbildung 1-10: Biosynthese von 1-(8-Guaninyl)-cyclo(L-Trp-L-Tpr) in Streptomyces purpureus NRRL B-5737 (Yu et al., 2018).

Das mit sieben Genen größte bisher identifizierte CDPS-haltiges Gencluster stellt die Biosynthese von Bicyclomycin in *Streptomyces* spp. dar (Abbildung 1-11) (Borgman *et al.*, 2019). Die Synthese erfolgt unter dem Mitwirken einer CDPS (BcmA), fünf α-Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (BcmB, BcmC, BcmE, BcmF und BcmG) und einer Cytochrom P450 Monooxygenase (BcmD) (Meng *et al.*, 2018).

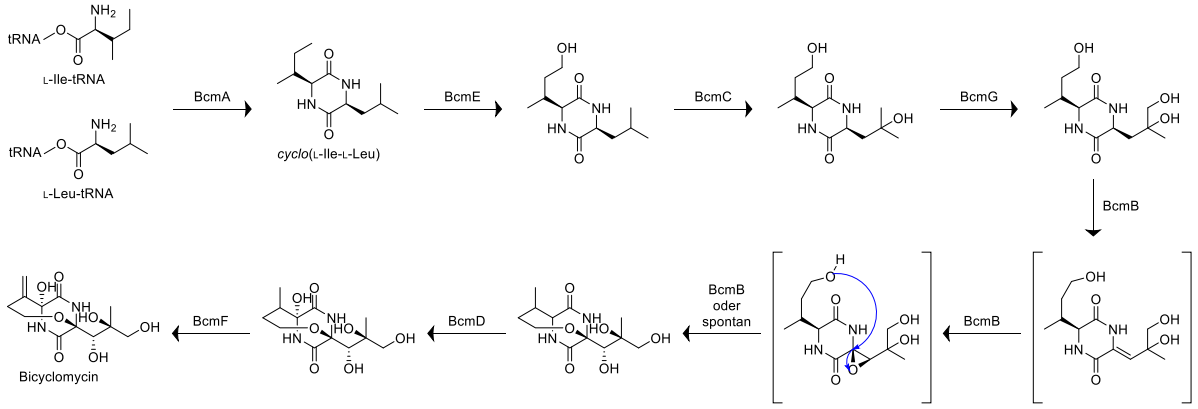


Abbildung 1-11: Biosynthese von Bicyclomycin in Streptomyces sapporonensis (Borgman et al., 2019; Meng et al., 2018).

In der Biosynthese von Drimentin G in *Streptomyces* spp. (Abbildung 1-12) sind drei Enzyme involviert (Yao *et al.*, 2018). Während die CDPS DmtB zunächst *cyclo*(L-Tyr-L-Val) bildet, überträgt die Indol-Prenyltransferase DmtC eine Farnesyl-Gruppe auf den Indol-Rest dieser Grundstruktur. Anschließend katalysiert die Farnesyl-Cyclase DmtA die Cyclisierung des Farnesyl-Restes und führt somit zu Bildung von Drimentin G.

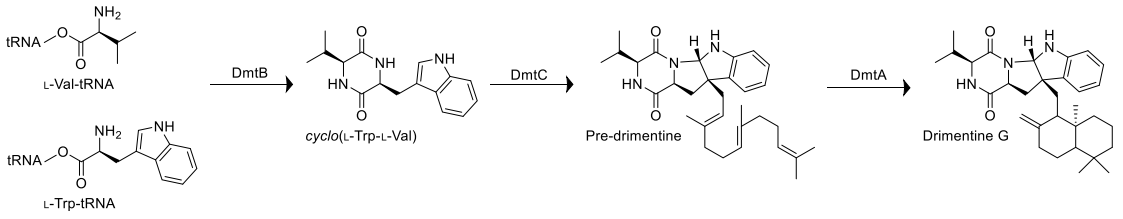


Abbildung 1-12: Biosynthese von Drimentin G in Streptomyces spp. (Borgman et al., 2019).

1.2.2 Cyclodipeptidsynthasen

In Kapitel 1.2.1 wurden die neun bereits charakterisierten Biosynthesewege inklusive der jeweiligen CDPSs vorgestellt. Insgesamt wurden jedoch mehr als 100 CDPSs experimentell untersucht (Alqahtani *et al.*, 2015; Brockmeyer & Li, 2017; Giessen *et al.*, 2013a; Giessen *et al.*, 2013b; Gondry *et al.*, 2009; Jacques *et al.*, 2015; James *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018a; Liu *et al.*, 2018b; Patteson *et al.*, 2017; Seguin *et al.*, 2011). Hierbei konnte die Synthese von zusammen mehr als 75 verschieden cyclischen Dipeptiden identifiziert werden (Borgman *et al.*, 2019). Die meisten dieser Gene wurden in Bakterien, genauer betrachtet in Actinobacteria, gefunden. Lediglich eine CDPS wurde bisher in Eukaryoten und bisher keine einzige in Archaeen identifiziert (Moutiez *et al.*, 2017; Seguin *et al.*, 2011). Zu Beginn dieser Arbeit konnte jedoch die Bildung verschiedener 2,5-DKPs durch insgesamt lediglich elf dieser Gene nachgewiesen werden (Belin *et al.*, 2012; Giessen *et al.*, 2013a; Giessen *et al.*, 2013b). Des Weiteren konnten über 700 putative Gene von CDPSs in öffentlich zugänglichen Datenbanken identifiziert werden (Borgman *et al.*, 2019; Gondry *et al.*, 2018).

Die CDPSs bestehen in der Regel aus 200-300 Aminosäuren und besitzen untereinander mit nicht selten weniger als 30 % eine eher moderate Übereinstimmung in ihren Sequenzen (Moutiez *et al.*, 2017). Sie besitzen konservierte Bereiche in den Positionen 31, 54, 79, 128, 184 und 225, sowie katalytische Bereiche in den Positionen 37, 40, 178, 182, 202 und 203 (Nummerierung von AlbC) (Jacques *et al.*, 2015). CDPSs werden in die zwei Unterfamilien NYH und XYP eingeteilt (Jacques *et al.*, 2015). Diese Einteilung erfolgt aufgrund der katalytischen Bereiche in den Positionen X40, Tyr202 und X203 (Nummerierung von AlbC). Während CDPSs der NYH Unterfamilie in diesen Positionen über Asn40, Tyr202 und His203 verfügen, sind bei CDPS der XYP Unterfamilie X40 (Gln40, Ser40, Ala40, Gly40, Lys40 oder Asn40), Tyr202 und Pro203 zu finden (Jacques *et al.*, 2015). Bisher wurden Kristallstrukturen von drei CDPSs untersucht. Während AlbC aus *S. noursei* mit einer Auflösung von 1,9 Å (PDB ID: SOQV) (Sauguet *et al.*, 2011) sowie von 2,9 Å (PDB ID: 4Q24) (Moutiez *et al.*, 2014a) untersucht wurde, wurde Rv2275 aus *M. tuberculosis* mit einer Auflösung von 2,0 Å (PDB ID: 2X9Q) (Vetting *et al.*, 2010) und YvmC-Blic aus *Bacillus licheniformis* mit Auflösungen von 1,9, 1,7 und 2,4 Å (PDB ID: 3OQH, 3OQI, 3OQJ) (Bonnefond *et al.*, 2011) analysiert. Somit wurden Kristallstrukturen von drei CDPSs der NYH Unterfamilie betrachtet (Abbildung 1-13). Kristallstrukturen von CDPSs der XYP Unterfamilie sind dagegen noch nicht bekannt. CDPSs kommen als Monomere mit einer Rossmann-Faltung vor, welche durch die β-Faltblätter β3 – β5 und die α-Helices α2 und α4 gebildet wird (Moutiez *et al.*, 2017).

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu den katalytischen Berichten von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (aaRSs) der Klasse Ic wird vermutet, dass CDPSs von diesen Enzymen abstammen (Moutiez *et al.*, 2017). Es bestehen jedoch signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Enzym-Klassen. Zum einen besitzen CDPSs im Gegensatz zu den aaRSs keine ATP-Bindungsstellen, so dass die Aminosäuren nicht aktiviert werden können. Zum anderen sind CDPSs als Monomere aktiv, während die aaRSs TyrRS und TrpRS als Homodimere funktionieren (Schmitt *et al.*, 2018).

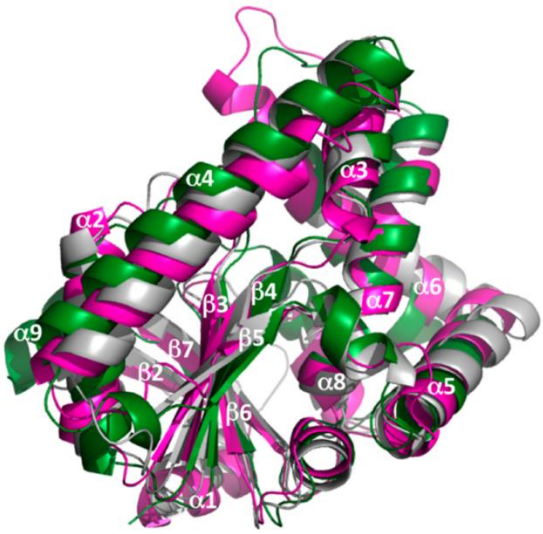


Abbildung 1-13: Kristallstrukturen von AlbC (PDB ID: 3OQV; grün), Rv2275 (PDB ID: 2X9Q; grau) und YvmC-Blic (PDB ID: 3OQH; magenta). Die Elemente der ß-Faltblätter und α-Helices der Sekundärstrukturen sind markiert. Die Abbildung stammt aus der Veröffentlichung von Moutiez et al. (2017).

Der Reaktionsmechanismus der CDPSs wurde bisher intensiv anhand von AlbC untersucht (Moutiez *et al.*, 2014a). Es konnte gezeigt werden, dass diese kleinen Enzyme Aminoacyl-tRNAs aus dem primären Metabolismus als Substrate nutzen und ATP-unabhängig durch die Bildung von zwei Peptidbindungen die Synthese von cyclischen Dipeptiden katalysieren (Belin *et al.*, 2012; Giessen *et al.*, 2013a; Giessen *et al.*, 2013b; Giessen & Marahiel, 2014; Gondry *et al.*, 2009; Jacques *et al.*, 2015). An dieser Reaktion der CDPSs sind jeweils zwei Bindetaschen „Pocket P1“ und „P2“ von großer Bedeutung (Jacques *et al.*, 2015). Während die Bindetasche P1 aus den Positionen 33, 35, 65, 67, 119, 185, 186, und 200 besteht, wird P2 aus den Positionen 152, 155, 156, 159, 204, 206 und 207 gebildet (Nummerierung von AlbC). Neben diesen sind hierbei ebenso die katalytischen Bereiche in Positionen Ser37, Asn40, Tyr178, Glu182, Tyr202 und His203 von AlbC involviert (Moutiez *et al.*, 2017).

Bei der Synthese der cyclischen Dipeptide bindet zunächst eine Aminoacyl-tRNA mit dessen Aminosäure-Rest im aktiven Zentrum innerhalb der Bindetasche P1 der CDPS und überträgt diesen auf den katalytischen Ser37-Rest (Nummerierung von AlbC) (Abbildung 1-14). Die tRNA wird abgespalten und es bildet sich ein Peptidyl-Enzym-Intermediat. In einem weiteren Schritt bindet der Aminosäure-Rest einer zweiten Aminoacyl-tRNA in der Bindetasche P2. Es wurde postuliert, dass bei der Erkennung des zweiten Substrates ebenso die Bindung der tRNA von Bedeutung ist (Moutiez *et al.*, 2014b). Das Peptidyl-Enzym-Intermediat reagiert anschließend mit diesem zweiten Substrat und bildet ein Dipeptidyl-Enzym-Intermediat, aus welchem nach intramolekularer Cyclisierung ein cyclisches Dipeptid hervorgeht (Moutiez *et al.*, 2017).

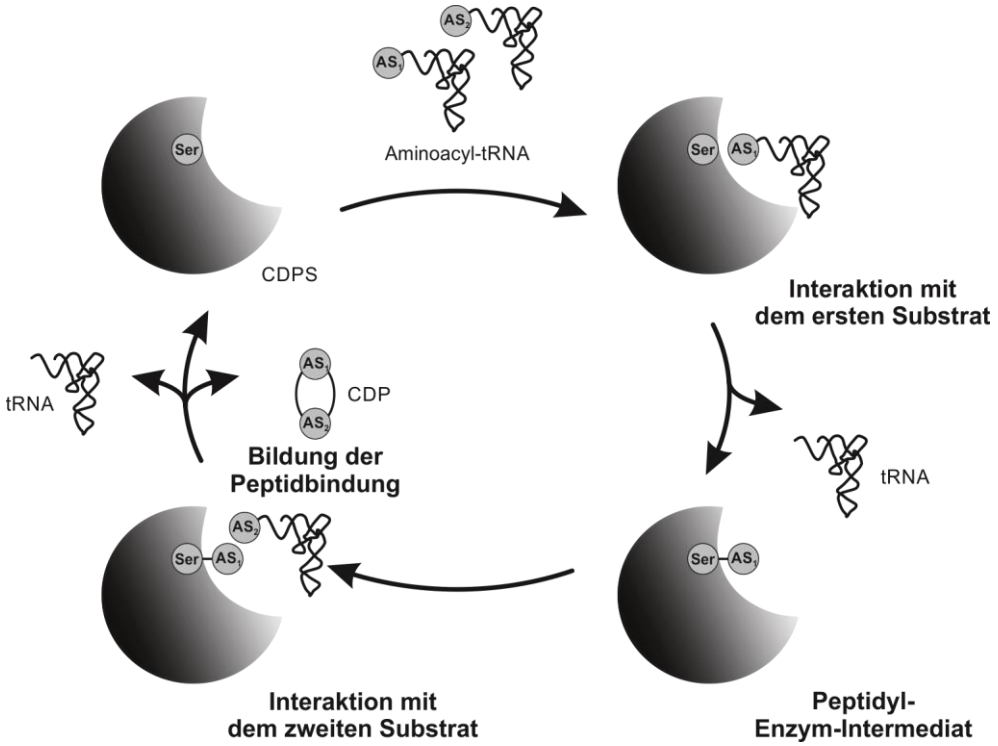


Abbildung 1-14: Biosynthese von cyclischen Dipeptiden (CDPs) durch Cyclodipeptidsynthasen (CDPSs). Modifiziert nach (Belin et al., 2012) und (Giessen & Marahiel, 2014).

Zunächst wurde postuliert, dass der erste Aminosäure-Rest auf den Ser37-Rest übertragen wird sowie dass Tyr178 und Glu182 zur Stabilisierung dieses Aminosäure-Restes sowie später zur Bildung des Dipeptidyl-Enzym-Intermediat beitragen (Moutiez *et al.*, 2014a; Sauguet *et al.*, 2011; Schmitt *et al.*, 2018). In Ergänzung dazu dient Tyr202 der Protonenübertragung und katalysiert so die Cyclisations-Reaktion (Abbildung 1-15) (Schmitt *et al.*, 2018). Neben Tyr178 sind Asn40 und His203 dafür verantwortlich, die Dipeptidyl-Reste während der Reaktion in korrekter Konformation zu halten (Schmitt *et al.*, 2018).

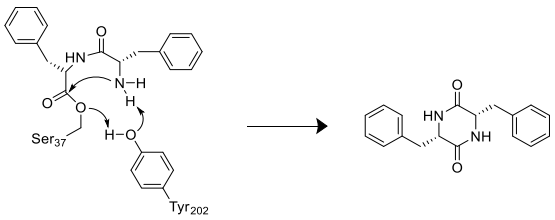


Abbildung 1-15: Cyclisations-Reaktion von CDPSs in Anlehnung den die Veröffentlichung von (Gondry et al., 2018).

Es wurde postuliert, dass anhand der Motive innerhalb der Bindungstaschen P1 und P2 eine Vorhersage der überwiegend synthetisierten Produkte getroffen werden kann (Gondry *et al.*, 2018; Jacques *et al.*, 2015). CDPSs sollen demnach ein Hauptprodukt und weitere Nebenprodukte nach der Formel *cyclo*(AA_1-X) synthetisieren. Hierbei ist AA_1 der in P1 bevorzugt gebundene Aminoacyl-Rest, während X den etwas variableren und in P2 gebundenen Aminoacyl-Rest darstellt.

Es wird also für die Bindung des ersten Substrates in P1 eine hohe und für die des zweiten Substrates in P2 eine geringere Substratspezifität vorausgesetzt. Im Jahre 2015 wurden die in Abbildung 1-16 gezeigten entsprechenden Sequenzlogos identifiziert (Jacques *et al.*, 2015). Nach diesem Schema produziert AlbC neben *cyclo*(L-Phe-L-Leu), welches in der Biosynthese von Albonoursin involviert ist, noch weitere 2,5-DKPs. Dazu gehören die phenylalanin-haltigen 2,5-DKPs *cyclo*(L-Phe-L-Leu), *cyclo*(L-Phe-L-Phe), *cyclo*-(L-Phe-L-Tyr) und *cyclo*(L-Phe-L-Met) (Belin *et al.*, 2012; Gondry *et al.*, 2009).

Abbildung 1-16: Sequenzlogos von Aminosäuren, welche die beiden Bindungstaschen P1 und P2 bilden, für Gruppen von CDPSs, welche die gleichen cyclischen Dipeptide synthetisieren. (Abbildung aus (Jacques et al., 2015)).

Die CDPS Ndas_1148 bildet ebenso weitere 2,5-DKPs. Neben dem bereits beschriebenen *cyclo*(L-Phe-L-Tyr) produziert diese *cyclo*(L-Phe-L-Phe) und *cyclo*(L-Phe-L-Leu) als Hauptprodukte sowie *cyclo*(L-Phe-L-Ala), *cyclo*(L-Phe-L-Met), *cyclo*(L-Tyr-L-Leu) und *cyclo*(L-Tyr-L-Tyr) als Nebenprodukte (Giessen *et al.*, 2013b). Rv2275 bildet hauptsächlich *cyclo*(L-Tyr-L-Tyr) und lediglich zu einem geringen Anteil *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) (Belin *et al.*, 2012). Etwa die Hälfte der CDPSs verfügen jedoch über eine hohe Substratspezifität und produzieren lediglich ein einziges cyclisches Dipeptid (Moutiez *et al.*, 2017). Ein Beispiel hierfür stellt Amir_4627 mit der Produktion von *cyclo*(L-Trp-L-Trp) dar (Giessen *et al.*, 2013a). Jedoch bieten diese Motive lediglich einen Hinweis auf mögliche Produkte der CDPSs, so dass die experimentelle Analyse dennoch notwendig ist.

1.2.3 Cyclodipeptidoxidasen

Eine Enzymklasse, die es vermag deren Substrate zu dehydrieren, sind Cyclodipeptidoxidasen (CDOs) (Belin *et al.*, 2012). Diese kommen geclustert mit Cyclodipeptidsynthasen (CDPSs) sowie teilweise mit Methyltransferasen und Cytochrom P450 Enzymen in Actinobacteria vor. Die erste CDO wurde in *Streptomyces albulus* (*S. albulus*), einem Albonoursin-Produzenten, in Japan identifiziert (Kanzaki *et al.*, 1999). Die Untersuchungen beschränkten sich hierbei jedoch auf Reaktionen mit löslichem Enzym aus zellfreien Extrakten und Biotransformationen (Kanzaki *et al.*, 1999; Kanzaki *et al.*, 2000a; Kanzaki *et al.*, 2000c). In Frankreich wurde dagegen die gesamte Biosynthese von Albonoursin in *S. noursei* identifiziert und charakterisiert (Gondry *et al.*, 2001; Lautru *et al.*, 2002). Bei dieser CDO handelt es sich um einen Enzymkomplex aus den beiden Untereinheiten AlbA und AlbB, bestehend aus 219 bzw.

105 Aminosäuren, welche zusammen in der Lage sind, durch Dehydrierung an beiden Substituenten des 2,5-Diketopiperazin-Grundgerüstes Doppelbindungen einzufügen (Belin *et al.*, 2012). Die Molekulargröße dieses Komplexes umfasst insgesamt mehr als 2000 kDa (Gondry *et al.*, 2001). Der größere Anteil besteht hierbei aus der Untereinheit AlbA, während der Anteil von AlbB lediglich ein Zehntel dieses Komplexes ausmacht (Belin *et al.*, 2012). Obwohl die Rolle der Untereinheit AlbB bisher nicht geklärt werden konnte, ist diese für die Reaktion zwingend notwendig. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression der Untereinheit AlbA alleine zu keiner Produktbildung, sondern lediglich zu unlöslichem Protein führt (Belin *et al.*, 2012; Lautru *et al.*, 2002). Der Reaktionsmechanismus der CDO konnte bisher also nicht aufgeklärt werden. Als mögliche Mechanismen wurden eine direkte α,β-Dehydrierung, eine β-Hydroxylierung mit anschließender Dehydratisierung oder die Bildung eines Imin-Intermediats mit anschließender Umlagerung zum Enamin postuliert (Gondry *et al.*, 2001). Es ist bekannt, dass die CDO aus *S. noursei* (AlbA/AlbB) den kovalent gebundenen Cofaktor Flavin enthält und dass es sich um eine aerobe Reaktion handelt, bei der O_2 als Elektronen-akzeptor agiert und H_2O_2 als Nebenprodukt entsteht (Gondry *et al.*, 2001). Das Gen *albA* besteht aus 660 bp, während *albB* aus 318 bp besteht. Diese beiden Nukleotidsequenzen überlappen hierbei in einem Bereich von 41 bp. In diesem Zusammenhang wurde postuliert, dass eine Regulation während der Synthese der beiden Untereinheiten für die Funktionsfähigkeit des Enzymkomplexes verantwortlich sein könnte (Belin *et al.*, 2012).

Die natürlichen Substrate der CDOs stellen verschiedene cyclische Dipeptide dar, welche durch die jeweils benachbarten CDPSs synthetisiert werden. CDOs akzeptieren unterschiedliche cyclische Dipeptide mit 2,5-DKP-Grundgerüst, linearen Dipeptide hingegen werden nicht umgesetzt (Gondry *et al.*, 2001). AlbA und AlbB setzen bekanntermaßen ihr natürliches Substrat *cyclo*(L-Phe-L-Leu) zu Albonoursin um (Abbildung 1-4). Des Weiteren wurde die Akzeptanz gegenüber einigen weiteren cyclischen Dipeptiden getestet, welche in der Tabelle 1-1 aufgelistet sind. Es wurde postuliert, dass CDOs große aromatische Seitenketten ihrer Substrate, wie z. B. Phenylalanin und Tryptophan, bevorzugen (Belin *et al.*, 2012). Die dehydrierten Produkte konnten *in vitro* sowohl in *E*- als auch in *Z*-Konfiguration detektiert werden (Gondry *et al.*, 2001; Kanzaki *et al.*, 2000c). Das Auftreten der *Z*,Z-Konfiguration von Albonoursin, welches zuvor aus Kulturen von *S. noursei* extrahiert wurde, spricht jedoch für ein bevorzugtes Einbringen der Doppelbindungen durch CDOs in Z-Konfiguration (Belin *et al.*, 2012; Gondry *et al.*, 2001).

Eine weitere charakterisierte CDO stellen Ndas_1146 und Ndas_1147 aus *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43111 dar (Giessen *et al.*, 2013b). Ndas_1146 besteht hierbei aus 195 Aminosäuren, während Ndas_1147 ebenso aus 105 Aminosäuren besteht. Die hierfür codierenden Nukleotidsequenzen von *ndas_1146* und *ndas_1147* bestehen aus 588 bzw. 318 bp und überlappen mit 20 bp. Diese CDO katalysiert die Dehydrierung von phenylalanin- sowie tyrosin-haltigen

2,5-Diketopiperazinen und trägt somit, neben zwei Methyltransferasen, zur Biosynthese verschiedener Nocazine bei (Abbildung 1-6) (Giessen *et al.*, 2013b). Die Untersuchungen der CDO beschränkten sich hierbei auf die natürlichen Substrate dieser, genauso wie bei der CDO aus *Nocardiopsis alba* ATCC BAA-2165 (Tabelle 1-1) (Li *et al.*, 2014).

Im Folgenden werden putative Homologe der beiden Proteine AlbA und Ndas_1146 als CDO_A, putative Homologe von AlbB und Ndas_1147 als CDO_B bezeichnet.

Tabelle 1-1: Übersicht über bisher identifizierte Cyclodipeptidoxidasen und deren Substrate.

Organismus	CDO	Substrate
S. noursei **ATCC 11455**	AlbA / AlbB	cFL (Gondry *et al.*, 2001; Lautru *et al.*, 2002) cFL, cFH, cFG, cLA, cLG, cSG, cEG, cWW (Gondry *et al.*, 2001)
S. albulus **KO-23**		cFL (Kanzaki *et al.*, 1999; Kanzaki *et al.*, 2000a; Kanzaki *et al.*, 2000c) cFG, cFA, cFV, cFF (Kanzaki *et al.*, 2000b) cFH (Kanzaki *et al.*, 2004) cFP, cYP (Arunrattiyakorn *et al.*, 2006; Arunrattiyakorn *et al.*, 2007)
N. alba **ATCC BAA-2165**	AlbA / AlbB	cFL, cYL (Li *et al.*, 2014)
N. dassonvillei subsp. dassonvillei DSM 43111	Ndas_1146 / Ndas_1147	cFY, cFF, cFL, cFA, cFM, cYL, cYY (Giessen *et al.*, 2013b)

1.3 Actinobacteria

1.3.1 Allgemeines

Die Klasse der Actinobacteria innerhalb der Domäne der Eubacteria umfasst die Ordnungen Actinomycetales, Bifidobacteriales, Catenulisporales, Corynebacteriales, Cryptosporangiales, Frankiales, Glycomycetales, Jiangellales, Kineosporiales, Micrococcales, Micromonosporales, Propionibacteriales, Pseudonocardiales, Sporichthyales, Streptomycetales und Streptosporangiales (Nouioui et al., 2018). In Abbildung 1-17 ist die taxonomische Einordnung der im Rahmen dieser Arbeit relevanten Species *Streptomyces noursei*, *Nocardiopsis dassonvillei* und *Nocardiopsis prasina* wiedergegeben.

Es handelt sich bei Actinobacteria um meist aerobe grampositive Eubakterien mit hohem Guanin-Cytosin-Gehalt (GC-Gehalt) im Genom (Barka *et al.*, 2016). Morphologisch unterscheiden sich die Ordnungen innerhalb der Actinobacteria erheblich voreinander, so reichen die Zellstrukturen von Kokken (z. B. *Micrococcus* spp.) über Stäbchen (z. B. *Corynebacterium* spp.) bis zu Mycel-Strukturen (z. B. *Streptomyces* spp.) (Nouioui *et al.*, 2018). Sie können sich heterotroph, chemoautotroph oder chemoheterotroph ernähren (Barka *et al.*, 2016) und sind in unterschiedlichsten Umgebungen zu finden. Während *Streptomyces* spp. in Böden oder wässriger Umgebung leben, sind z. B. *Corynebacterium* spp. und *Mycobacterium* spp. als Pflanzen- oder Tierpathogene, *Bifidobacterium* spp. hingegen als gastrointestinale Kommensale bekannt (Barka *et al.*, 2016).

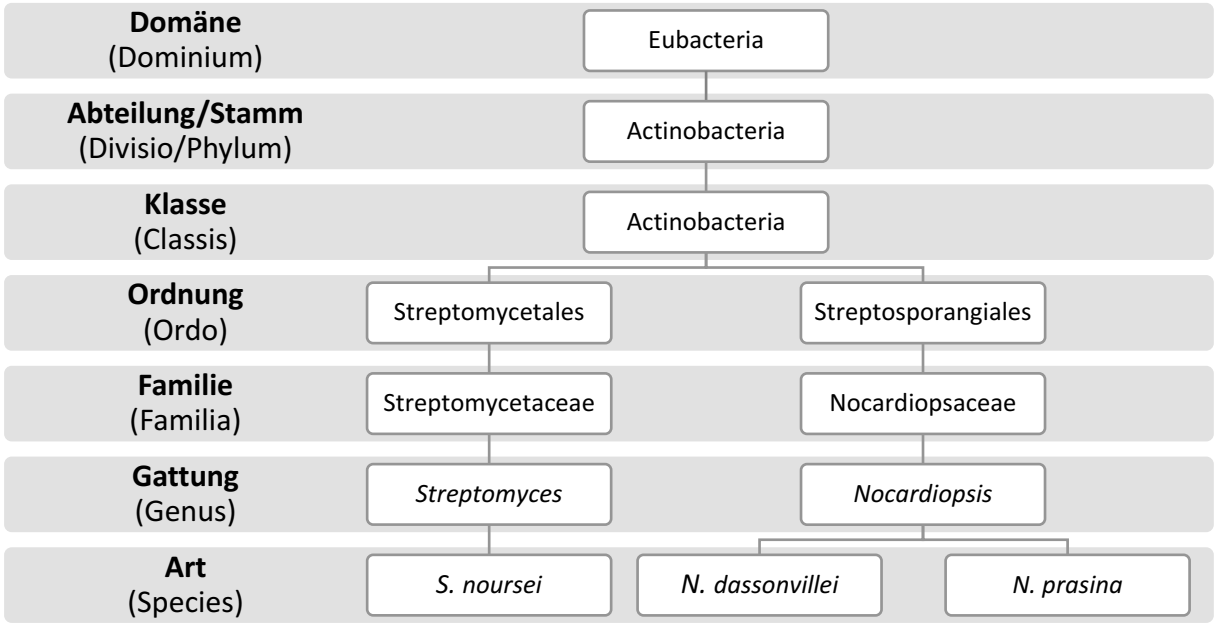


Abbildung 1-17: Taxonomische Einordnung von Streptomyces noursei, Nocardiopsis dassonvillei und Nocardiopsis prasina.

1.3.2 *Streptomyces noursei*

Die Species *Streptomyces noursei* Brown 1953 (Ettlinger *et al.*, 1958; Hazen & Brown, 1951; Skerman *et al.*, 1980) gehört zur Gattung *Streptomyces*, der Familie *Streptomycetaceae, der* Ordnung *Streptomycetales* innerhalb der Abteilung Actinobacteria und ist somit ein grampositives Bakterium mit hohem GC-Gehalt (Abbildung 1-18).

Abbildung 1-18: Streptomyces noursei DSM 40635 kultiviert auf GYM-Medium bei 28 °C. (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, abgerufen am 23.01.2018)

Die Sequenzierung des Genomes von *Streptomyces noursei* ATCC 11455 erfolgte durch die Universität Bielefeld und wurde im Jahre 2015 in der Datenbank von NCBI unter der Accession-Nummer NZ_CP011533 hinterlegt. Das Genom umfasst 9,8 Mb, enthält einen GC-Gehalt von 71,35 % und codiert insgesamt 8102 Proteine.

Die Biosynthese des Antimykotikums Nystatin (= Fungicidin) (Abbildung 1-19), welches zur Behandlung von Infektionen mit *Candida albicans* oder *Aspergillus fumigatus* verwendet wird, konnte in *S. noursei* aufgeklärt werden (Brautaset *et al.*, 2000; Hazen & Brown, 1951).

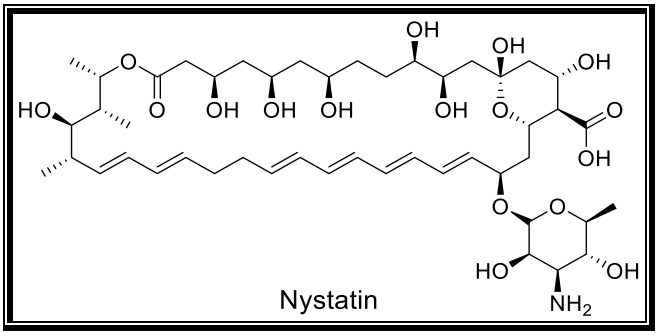


Abbildung 1-19: Ausgewählte Sekundärmetabolite aus Streptomyces noursei.

Des Weiteren konnte die Synthese von Albonoursin (Abbildung 1-2), dessen biologische Aktivität bereits in Kapitel 1.1.1 beschrieben wurde, in *S. noursei* identifiziert werden (Gondry *et al.*, 2001; Lautru *et al.*, 2002).

1.3.3 *Nocardiopsis dassonvillei*

Die Gattung *Nocardiopsis* gehört zur Familie der Nocardiopsaceae innerhalb der Ordnung der Streptosporangiales und somit zur Abteilung der Actinobacteria. Sie wurde im Jahre 1976 von Meyer auf Grund von morphologischen Gegebenheiten für Bakterien beschrieben, welche bis dahin unter *Streptothrix dassonvillei*, *Nocardia dassonvillei* oder *Actinomadura dassonvillei* bekannt waren (Brocq-Rousseu, 1904; Gordon & Horan, 1968; Lechevalier & Lechevalier, 1970; Sun *et al.*, 2010).

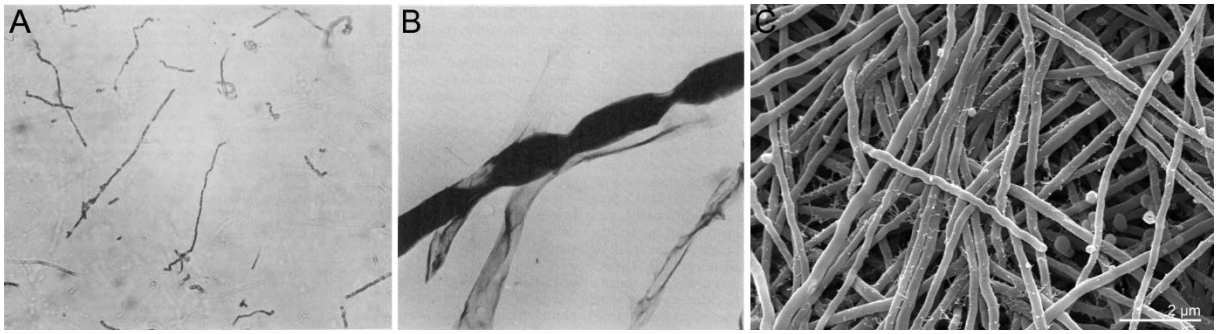


Abbildung 1-20: Aufnahmen von Nocardiopsis dassonvillei IMRU 509. A: Mikroskopische Aufnahmen von sporulierendem Luftmycel von Nocardiopsis dassonvillei IMRU 509 auf Bennett Medium, x480 (Aufnahme aus (Meyer, 1976)). B: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Nocardiopsis dassonvillei IMRU 509, x16.500 (Aufnahme aus (Meyer, 1976)). C: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Nocardiopsis dassonvillei IMRU 509 (Aufnahme aus (Sun et al., 2010)).

Bei der von Meyer beschriebenen Species *Nocardiopsis dassonvillei* IMRU 509 handelt es sich um ein grampositives Bakterium mit einem hohen GC-Gehalt (Sun *et al.*, 2010). Das Temperaturoptimum seines Wachstums befindet sich bei etwa 28 °C, wobei über 45 °C kein Wachstum mehr beobachtet werden konnte (Sun *et al.*, 2010). Das pH Optimum liegt hierbei bei 8,0 (Sun *et al.*, 2010). *Nocardiopsis dassonvillei* IMRU 509 bildet ein Luftmycel, welches aus langen, dünnen und moderat verzweigten Hyphen besteht (Abbildung 1-20, A-C). Dieses zeigt zu Beginn der Sporenbildung ein mehr oder weniger ausgeprägtes zickzackförmiges Aussehen (Abbildung 1-20, C) (Meyer, 1976). Die Farbe des Luftmycels ist abhängig vom Medium weiß oder gelblich bis gräulich (Abbildung 1-21), während das Substratmycel gelblich-braun oder olivfarben bis dunkel braun ist (Meyer, 1976). Dieser Species ist es möglich Arabinose, Xylose, Mannose, Glucose, Rhamnose, Maltose, Mannitol, Fruktose, Lactose, Sucrose, Raffinose und Glycerol als Kohlenstoffquelle zu verwenden (Meyer, 1976; Sun *et al.*, 2010).

Nocardiopsis dassonvillei wurde bereits aus schimmeligem Getreide, Erde oder Meeressediment isoliert (Sun *et al.*, 2010), steht jedoch zusätzlich im Zusammenhang mit Infektionen der Haut, des Auges sowie der Lunge beim Menschen (Beau *et al.*, 1999). Daher wurde *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* vom Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe (ABAS) im Rahmen der Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA) in den TRBA 466 „Einstufung von Prokaryonten (Bacteria und Archaea) in Risikogruppen“ (Stand: Ausgabe August 2015, 3. Änderung vom 2.5.2018) in die Risikogruppe 2 eingestuft und somit im Umgang entsprechend eingeschränkt.

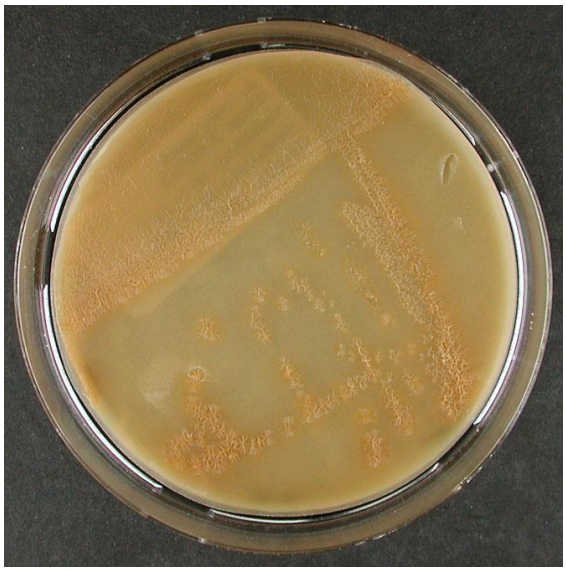


Abbildung 1-21: Nocardiopsis dassonvillei DSM 43111 kultiviert auf GYM-Medium bei 28 °C. (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, abgerufen am 23.01.2018)

N. dassonvillei IMRU 509 (= DSM 43111) wurde im Jahre 2010 sequenziert und durch das US DOE Joint Genome Institute (JGI-PGF) unter den Accession-Nummern NC_014210 und NC_014211 in der Datenbank von NCBI hinterlegt (Brocq-Rousseu, 1904; Sun *et al.*, 2010). Das Genom besteht aus 6,6 Mb, verteilt auf zwei Chromosomen, besitzt einen GC-Gehalt von 72,73 % und codiert wahrscheinlich insgesamt 5437 Proteine. Bisher wurden einige Sekundärmetabolite aus *N. dassonvillei* identifiziert und teilweise deren Biosynthese aufgeklärt. In Abbildung 1-22 sind ausgewählte Strukturen abgebildet.

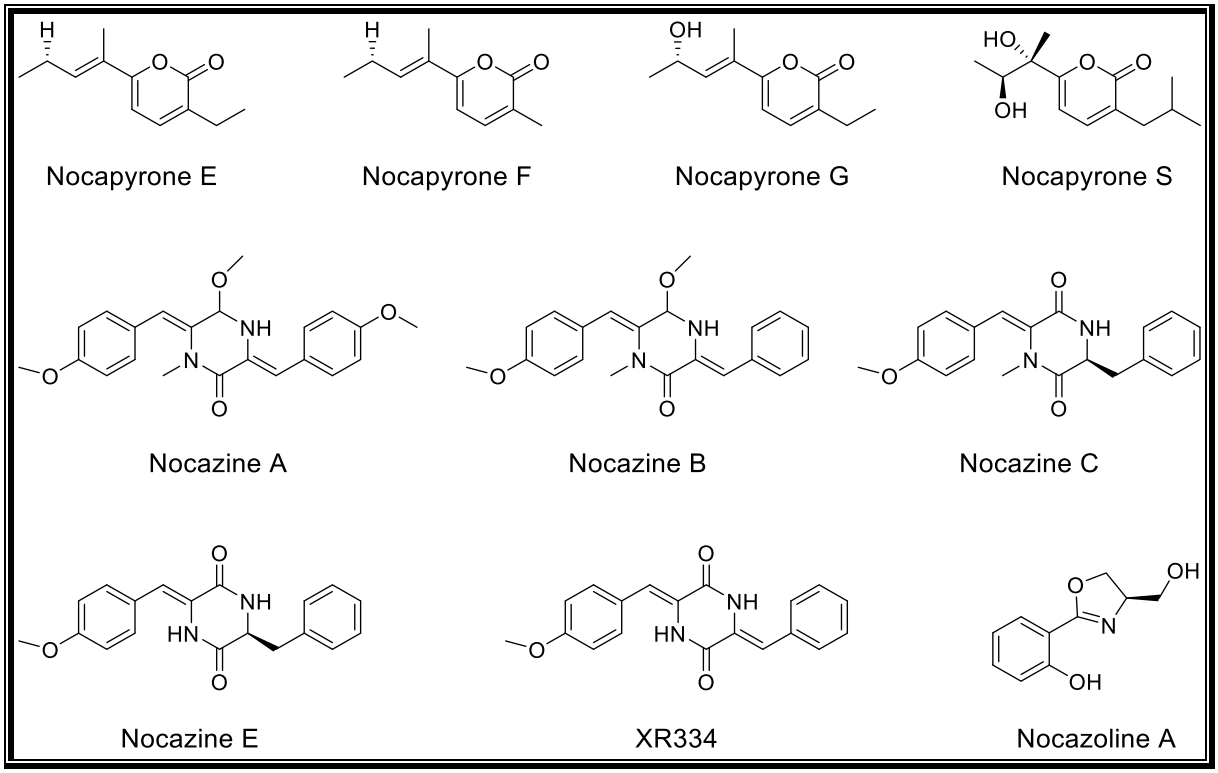


Abbildung 1-22: Ausgewählte Sekundärmetabolite aus Nocardiopsis dassonvillei.

Aus *N. dassonvillei* HR10-5 wurden Nocapyrone E-G, Nocazine A-C und Nocazoline A isoliert und identifiziert (Fu *et al.*, 2011). Die Biosynthese von Nocazine E und XR334 in *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43111 konnte im Jahre 2013 aufgeklärt werden (Giessen *et al.*, 2013b). Aus demselben Stamm wurde im Jahre 2016 mit Nocapyrone S ein weiteres α-Pyrone isoliert (Zou *et al.*,

2017). Einige dieser Strukturen verfügen über biologische Aktivitäten, welche bereits in Kapitel 1.1.1 beschrieben wurden.

1.3.4 *Nocardiopsis prasina*

Nocardiopsis dassonvillei subsp. *prasina* subsp. nov. wurde zuerst im Jahre 1984 von Miyashita beschrieben (Miyashita *et al.*, 1984). Dieser Stamm wurde ursprünglich in Japan aus Erde isoliert. Es handelt sich hierbei um ein grampositives alkaliphiles Bakterium, welches ein pH Optimum von 9,0 bis 10,0 besitzt (Miyashita *et al.*, 1984). Das Wachstumsoptimum liegt hier bei einer Temperatur von 28 °C, wobei bei 45 °C kein Wachstum mehr auftritt (Grund & Kroppenstedt, 1990).

Es wird reichlich oberirdisches Mycel gebildet, wobei die Sporenträger vom Typ Rectus flexibilis sind. Sie verlaufen hierbei nahezu geradlinig und bilden Ketten von bis zu 50 Sporen (Abbildung 1-23, A und C). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen eine glatte Oberfläche der Sporen (Abbildung 1-23, B) (Miyashita *et al.*, 1984).

Die Farbe des oberirdischen Mycels ist abhängig vom Medium weiß bis blassrosa, während das vegetative Mycel weitgehend farblos ist. Teilweise wurde eine grüne Schattierung des Mycels beobachtet (Miyashita *et al.*, 1984). Diesem Stamm ist es möglich, Glukose, Arabinose, Glycerol, Mannose, Fruktose, Xylose und Mannitol als Kohlenstoffquelle zu verwenden (Miyashita *et al.*, 1984). Aufgrund einiger Unterschiede zu anderen Stämmen von *N. dassonvillei*, wie seiner Unfähigkeit Maltose und Rhamnose als Kohlenstoffquelle nutzen zu können sowie seines höheren pH Wachstumsoptimums, wurde dieser Stamm zu dieser Zeit als neue Unterart von *N. dassonvillei* definiert (Miyashita *et al.*, 1984).

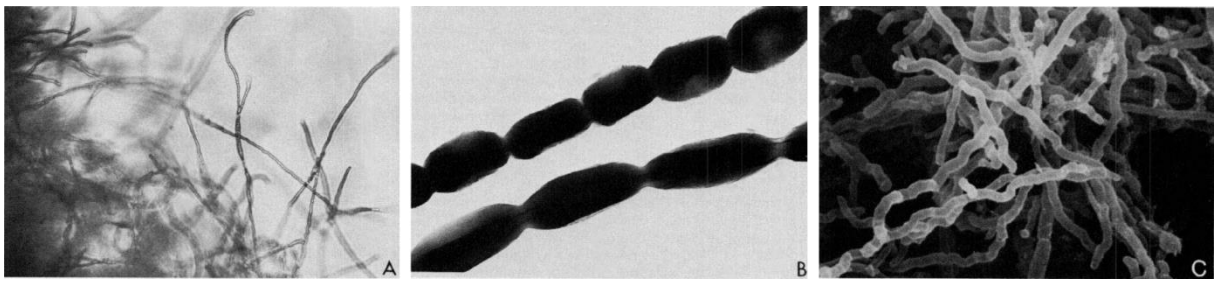


Abbildung 1-23: Mikroskopische Aufnahmen von sporulierenden oberirdischem Mycel von Nocardiopsis dassonvillei subsp. prasina auf Hefe- und Malzextrakt-Festmedium (pH 9,0). A: Lichtmikroskopische Aufnahme, x440. B: Elektronenmikroskopische Aufnahme, x29.000. C: Elektronenmikroskopische Aufnahme, x5.800. (Aufnahmen aus (Miyashita et al., 1984).

Im Jahre 1990 wurde *N. dassonvillei* in Anlehnung an chemotaxonomische und physiologische Untersuchungen in zwei Gattungen aufgeteilt, *N. dassonvillei* und *N. alba.* In diesem Zusammenhang wurde *N. dassonvillei* subsp. *prasina* DSM 43845 in *N. alba* subsp. *prasina* DSM 43845 (Miyashita et al. 1984) umbenannt (Grund & Kroppenstedt, 1990). Aufgrund genetischer Unterschiede zwischen *N. alba*

subsp. *alba* DSM 43377 und *N. alba* subsp. *prasina* DSM 43845 bezüglich 16S rDNA Sequenzvergleichen und Untersuchungen zur DNA-DNA Hybridisierung, wurde *N. alba* subsp. *prasina* DSM 43845 im Jahre 1997 schließlich zu *N. prasina* DSM 43845 erhoben (Abbildung 1-24) (Yassin *et al.*, 1997).

Abbildung 1-24: Nocardiopsis prasina DSM 43845 kultiviert auf GYM-Medium bei 28 °C. (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, abgerufen am 23.01.2018)

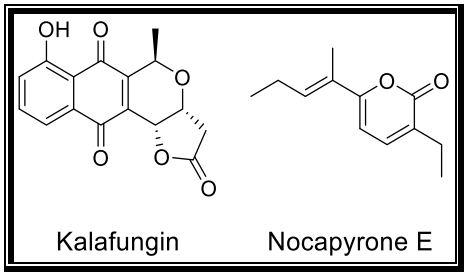


Abbildung 1-25: Ausgewählte Sekundärmetabolite aus Nocardiopsis prasina.

N. prasina DSM 43845 (= NRRL B-16235) wurde vom Yunnan Institute of Microbiology (Yunnan University, China) sequenziert und im Jahre 2012 unter der Accession-Nummer NZ_ANAE00000000 in der Datenbank von NCBI hinterlegt (Li *et al.*, 2013). Das Genom umfasst 6,0 Mb und enthält 4.960 proteinkodierende Gene. Der GC Anteil beträgt hierbei 70,8 %.

Zur Biosynthese von Sekundärmetaboliten durch *N. prasina* ist bisher nur wenig bekannt. In Abbildung 1-25 sind ausgewählte Strukturen abgebildet. Im Jahre 1990 konnte das cytotoxische Kalafungin aus *N. dassonvillei* subsp. *prasina* OPC-553 identifiziert werden (Tsujibo *et al.*, 1990). Aus dem Stamm *N. prasina* CLA68 wurde 2016 das Polyketid Nocapyrone E isoliert (Rao *et al.*, 2016). Über die Synthese von Sekundärmetaboliten mit dem Grundgerüst von 2,5-Diketopiperazinen (2,5-DKPs) lagen hingegen zu Beginn dieser Arbeit keine Informationen vor.

2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

Untersuchungen zur putativen Cyclodipeptidsynthase CDPS-Np aus *N. prasina*

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Biosynthese von cyclischen Dipeptiden durch die putative Cyclodipeptidsynthase CDPS-Np in *N. prasina*. Hierfür sollten folgende Schritte durchgeführt werden:

- Amplifikation von *CDPS-Np* aus genomischer DNA von *N. prasina* NRRL B-16235
- Klonierung von *CDPS-Np* in pQE-60 zur Expression in *E. coli*
- Überproduktion von CDPS-Np in *E. coli*
- Identifizierung der Produktbildung durch CDPS-Np mittels LC-MS

Im Anschluss daran sollte durch zielgerichtete Mutagenese innerhalb der Bindetaschen P1 und P2 des aktiven Zentrums von CDPS-Np deren Substratspezifität verändert werden. Diesbezüglich sollten folgende Arbeiten durchgeführt werden:

- Analyse der Bindetaschen P1 und P2 des aktiven Zentrums von CDPS-Np
- gezielte Einführung von Mutationen durch PCR zum Austausch einzelner oder mehrerer Aminosäuren innerhalb der Bindetaschen P1 und P2 im aktiven Zentrum von CDPS-Np
- Überproduktion der mutierten Proteine in *E. coli*
- Identifizierung der Produktbildung durch die mutierten Proteine mittels LC-MS und Vergleich dieser mit der vom Wildtypen

Analysen zur putativen Cyclodipeptidoxidase CDO_A-Np und CDO_B-Np aus *N. prasina*

Ziel war die Untersuchung der Biosynthese von dehydrierten cyclischen Dipeptiden durch die putative Cyclodipeptidoxidase CDO_A-Np und CDO_B-Np in *N. prasina*. Hierfür sollten folgende Arbeiten ausgeführt werden:

- Amplifikation der überlappenden Sequenz von *CDO_A-Np* und *CDO_B-Np* aus genomischer DNA von *N. prasina* NRRL B-16235 und Klonierung der Gene in pQE-60 zur Überproduktion von CDO_A-Np und CDO_B-Np in *E. coli*
- Amplifikation der überlappenden Sequenz von *CDO_A-Np* und *CDO_B-Np* und Klonierung der beiden Gene in pQE-60 zur Überproduktion von His_6-CDO_A-Np und CDO_B-Np-His_6 in *E. coli*

- Amplifikation der einzelnen Sequenzen von *CDO_A-Np* und *CDO_B-Np* und Klonierung der beiden getrennten Gene in einen pQE-60 zur Überproduktion von CDO_A-Np und CDO_B-Np in *E. coli*
- Biotransformation verschiedener cyclischer Dipeptide durch CDO_A-Np/CDO_B-Np in *E. coli*
- Identifizierung der enzymatischen Produkte mittels LC-MS
- Amplifikation der einzelnen Sequenzen von *CDO_A-Np*, *CDO_B-Np*, *ndas_1146* und *ndas_1147* sowie die getrennte Klonierung der vier Gene in pQE-60 und pHis8 zur Expression in *E. coli*
- Überproduktion von CDO_A-Np-His_6, CDO_B-Np-His_6, Ndas_1146-His_6 und Ndas_1147-His_6 in *E. coli*
- Reinigung und Charakterisierung der Proteine

Vergleichende Analysen zu Cyclodipeptidoxidasen aus *N. prasina*, *N. dassonvillei* und *S. noursei*

Anschließend sollte die Biotransformation von CDO_A-Np/CDO_B-Np aus *N. prasina* mit der von Ndas_1146/Ndas_1147 aus *N. dassonvillei* und AlbA/AlbB aus *S. noursei* verglichen werden. Hierfür wurde ein Plasmid mit ndas_1146/ndas_1147 aus *N. dassonvillei* freundlicherweise von Prof. Dr. Marahiel (Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt. Für die vergleichenden Analysen sollten folgende Arbeiten durchgeführt werden:

- Amplifikation der überlappenden Sequenz von *albA* und *albB* aus genomischer DNA von *S. noursei* und Klonierung der Gene in pQE-60 zur Überproduktion von AlbA und AlbB in *E. coli*
- Biotransformation verschiedener cyclischer Dipeptide durch CDO_A-Np/CDO_B-Np aus *N. prasina*, Ndas_1146/Ndas_1147 aus *N. dassonvillei* und AlbA/AlbB aus *S. noursei* in *E. coli*
- Identifizierung der enzymatischen Produktbildung durch CDO_A-Np/CDO_B-Np, Ndas_1146/Ndas_1147 und AlbA/AlbB mittels LC-MS und Vergleich dieser miteinander

Analysen zum putativen Reaktionsmechanismus der Cyclodipeptidoxidasen

Zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus der Cyclodipeptidoxidasen wurde von Rixa Kraut deuteriertes *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

- Biotransformation von deuteriertem *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) durch CDO_A-Np/CDO_B-Np aus *N. prasina*, Ndas_1146/Ndas_1147 aus *N. dassonvillei* und AlbA/AlbB aus *S. noursei* in *E. coli*
- Identifizierung der enzymatischen Produkte mittels LC-MS

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Geräte, Säulenmaterialien und Enzyme

3.1.1 Chemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden hauptsächlich von den Firmen Alfa Aesar (Karlsruhe), Fluka (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich und VWR (Darmstadt) erworben. Bestandteile für Nährmedien stammen hauptsächlich von BD (Heidelberg) und AppliChem (Darmstadt). Fließmittel und Lösungsmittel wurden von Acros Organics (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), Fisher Scientific (Schwerte), Roth und VWR bezogen. Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile sind in Tabelle 3-1 aufgelistet.

Cyclo(L-Tyr-L-Phe) wurde von Frau Lena Ludwig-Radtke, das deuteriertes *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) von Frau Rixa Kraut synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die verwendeten cyclischen Peptide sind in Tabelle 3-2 aufgeführt.

Sämtliche Verbrauchsmaterialen wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und Einmalküvetten wurden von Sarstedt (Nümbrecht) erworben.

Tabelle 3-1: Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile

Bezeichnung	**Hersteller**
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat (BCIP)	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-ß-D-galactopyranosid (X-Gal)	Peqlab, VWR, Darmstadt
Acetonitril, HPLC	VWR, Darmstadt
Adenin	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Carbenicillin	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Coomassie® Brilliant Blue G 250	Serva, Heidelberg
D(+)-Glucose Monohydrat	Roth, Karlsruhe
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
DifcoTMYeast nitrogen base without amino acids	BD, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
D-Sorbit	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid (DMF)	Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Roth, Karlsruhe

Bezeichnung	Hersteller
Ethylacetat	Fisher Chemical, Fisher Scientific, Schwerte
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
2-Propanol	Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl-ß-thiogalactosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
L-Alanin	Merck, Darmstadt
L-Arginin	Merck, Darmstadt
L-Asparaginsäure	Merck, Darmstadt
L-Cystein	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Fluka, Merck, Darmstadt
L-Histidin	Roth, Karlsruhe
L-Isoleucin	Sigma, Merck, Darmstadt
L-Leucin	Merck, Darmstadt
L-Lysin	Aldrich, Merck, Darmstadt
L-Methionin	Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt
L-Phenylalanin	Roth, Karlsruhe
L-Prolin	Roth, Karlsruhe
L-Serin	Roth, Karlsruhe
L-Threonin	Roth, Karlsruhe
L-Tryptophan	Roth, Karlsruhe
L-Tyrosin	Merck, Darmstadt
L-Valin	Roth, Karlsruhe
Malzextrakt	Roth, Karlsruhe
Methanol, HPLC	VWR, Darmstadt
N,N,N‘,N‘-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumsulfat	Acros Organics
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Roth, Karlsruhe
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween® 20)	Roth, Karlsruhe
Potato dextrose broth	Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt
Riboflavin	Roth, Karlsruhe
Roti® -Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) (30 % Acrylamidstammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
Sojamehl	L-Carb-Shop, Offenbach
ß-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt
SYBR® Safe DNA Gel Stain (10000x in DMSO)	Life Technologies, Darmstadt
Tetracyclin	Roth, Karlsruhe
Trifluoressigsäure (TFA)	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Trypto/Pepton aus Casein	Roth, Karlsruhe

Tabelle 3-2: Verwendete cyclische Peptide

cyclische Peptide	**Hersteller**
cyclo(L-Phe-L-Gly)	Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
cyclo(L-Phe-L-Ser)	Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
cyclo(L-Phe-L-Leu)	Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
cyclo(L-Phe-L-Pro)	Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
cyclo(L-Phe-L-Phe)	Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
cyclo(L-Phe-L-Tyr)	synthetisiert von Frau Lena Ludwig-Radtke
cyclo(L-Phe-L-Tyr), deuteriertes	synthetisiert von Frau Rixa Kraut
cyclo(L-Phe-L-Trp)	Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
cyclo(L-Phe-L-His)	Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
cyclo(L-Tyr-L-Gly)	Rudjer Boskovic Institute Zagreb, Croatia
cyclo(L-Tyr-L-Ser)	Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
cyclo(L-Tyr-L-Pro)	Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
cyclo(L-Tyr-L-Tyr)	synthetisiert von Herrn Dr. Hui-Xi Zou
cyclo(L-Tyr-L-Trp)	Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
cyclo(L-Tyr-D-Trp)	Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
cyclo(L-Trp-L-Gly)	Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
cyclo(L-Trp-L-Ala)	synthetisiert von Frau Lena Ludwig-Radtke
cyclo(L-Trp-D-Ala)	synthetisiert von Frau Lena Ludwig-Radtke
cyclo(D-Trp-L-Ala)	synthetisiert von Frau Lena Ludwig-Radtke
cyclo(D-Trp-D-Ala)	synthetisiert von Frau Lena Ludwig-Radtke
cyclo(L-Trp-L-Leu)	Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
cyclo(L-Trp-L-Pro)	synthetisiert von Frau Lena Ludwig-Radtke
cyclo(L-Trp-D-Pro)	synthetisiert von Frau Lena Ludwig-Radtke
cyclo(D-Trp-L-Pro)	synthetisiert von Frau Dr. Beate Plenz
cyclo(D-Trp-D-Pro)	synthetisiert von Frau Lena Ludwig-Radtke
cyclo(L-Trp-L-Trp)	Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
cyclo(L-Trp-L-His)	synthetisiert von Frau Dr. Xia Yu
cyclo(L-His-L-Gly)	Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
cyclo(L-His-L-Ala)	Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
cyclo(L-His-L-Pro)	Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
cyclo(L-Ala-L-Ser)	Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
cyclo(L-Pro-L-Thr)	Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
cyclo(L-Pro-L-Val)	Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
cyclo(L-Pro-L-Leu)	Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
cyclo(L-Glu-L-Glu)	Bachem, Bubendorf BL, Schweiz
(*R*)-Benzodiazepindion / *cyclo*(D-Trp-Ant)	synthetisiert von Frau Lena Ludwig-Radtke
(*S*)-Benzodiazepindion / *cyclo*(L-Trp-Ant)	synthetisiert von Frau Lena Ludwig-Radtke

3.1.2 Geräte

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 3-3 aufgelistet.

Tabelle 3-3: Verwendete Geräte

Bezeichnung	**Hersteller**
AccuBlock™ Digital Dry Bath	Labnet, Edison, NJ, USA
Analysenwaage ABJ 220-4NM	Kern und Sohn, Balingen-Frommern
Autoklav VX-150	Systec, Linden
Biowizard Golden Line Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse II	Kojair, Vilppula, Finnland
Criterion™ Blotter	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Destamat Bi-Destillation Apparat Bi 18E aus Quarzglas	QCS, Maintal
EB 280 Fan Incubator	Jouan, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ECOTRON Inkubationsschüttler	Infors, Bottmingen, Schweiz
Einkanalpipetten Labmate optima	Abimed, Kinesis, Langenfeld
ENDURO 300 Volt Power Supply	Labnet, Edison, NJ, USA
FastGene® FAS Digi Imaging System	Nippon Genetics Europe, Düren
Gasprofi 1 SCS micro	WLD - TEC GmbH, Göttingen
Gelco-System GH303	Biostep, Burkhardtsdorf
HandyStep® S	Brand, Wertheim
Heraeus Fresco 17 Zentrifuge	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Multifuge 1 L-R	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
HPLC Agilent 1200 series	Agilent, Santa Clara, CA, USA
HPLC Agilent 1260 series	Agilent, Santa Clara, CA, USA
ImageQuant 100 Geldokumentationssystem	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
Kamera SP-500 ZU mit aufgesetztem UV-Filter	Olympus, Tokio, Japan
Labcycler compact silver	Biolab*products*, Bebensee
Magnetrührer mit Heizplatte VMS-C7 ADVANCED	VWR, Darmstadt
Massenspektrometer micrOTOF-Q III mit ESI-Source	Bruker, Billerica, MA, USA
Membranpumpe	Vacuubrand, Wertheim
MicroStar 17 Zentrifuge	VWR, Darmstadt
Mikrowelle	Siemens, München
Millipore Milli-RX 20	Merck, Darmstadt
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
MJ Mini 48-Well Personal Thermal Cycler	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
MyCycler™ Thermal Cycler	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
NeoLab-Orbital Shaker	NeoLab, Heidelberg
pH 211 Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments, Vöhringen
PowerPac™ HC Power Supply	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Präzisionswaage 440-35A	Kern und Sohn, Balingen-Frommern
Rotavapor-R Rotationsverdampfer mit angeschlossener Membranpumpe	Büchi, Flawil, Schweiz
Scotsman AF 100 Eisbereiter	Hubbard Systems, Ipswich, Großbritannien
Sonifier 250	Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA
Sonorex RK 100 Ultraschallbad	Bandelin, Berlin
Sorvall RC 6+ Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ThermoMixer® C	Eppendorf, Hamburg
Univapo 100 H Vakuumzentrifuge mit angeschlossener Membranpumpe	UniEquip, Planegg
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA

3.1.3 Materialien zur Chromatographie

Zur Chromatographie verwendete Materialien sind in Tabelle 3-4 aufgelistet.

Tabelle 3-4: Verwendetes Chromatographiematerial

Bezeichnung	Hersteller
Multospher 120 RP 18-5µ (Fertigsäule, 250 x 4 mm)	CS - Chromatographie Service, Langerwehe
Multospher 120 RP 18-5µ (Fertigsäule, 250 x 2 mm)	CS - Chromatographie Service, Langerwehe
Protino Ni-NTA Agarose (Suspension)	Macherey Nagel, Düren
Sephadex G-25 PD-10, NAP-5 (Fertigsäulen)	GE Healthcare, Chicago, IL, USA

3.1.4 Enzyme und Kits

In dieser Arbeit verwendete Enzyme, Größenstandards und Kits sind in Tabelle 3-5 aufgelistet.

Tabelle 3-5: Enzyme, Größenstandards und Kits

Bezeichnung	Hersteller
Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
Anti-Histidine-Tagged Protein Mouse mAb	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Anti-Mouse IgG Alkaline Phosphatase	Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt
DNase I	AppliChem, Darmstadt
Expand™ High Fidelity^{PLUS} PCR System	Roche Applied Science, Mannheim
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Hi Yield® Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit	SLG Südlaborbedarf, Gauting
Lysozym	Fluka, Merck, Darmstadt
pGEM®-T Easy Vector System	Promega, Mannheim
Precision Plus Protein™ All Blue Standards	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Restriktionsendonukleasen	Jena Bioscience, Jena Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RNase A	Roth, Karlsruhe
SYBR® Safe DNA Gel Stain	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
T4-DNA Ligase	Jena Bioscience, Jena

3.2 Nährmedien, Antibiotika und Puffer

Im Folgenden sind alle Nährmedien für die Kultivierung der jeweiligen Mikroorganismen aufgeführt. Die Medien wurden vor der Verwendung autoklaviert (121 °C, 20 min). Bei der Herstellung von Festmedien wurden vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugegeben. Antibiotika zur Selektion wurden mit einem Spritzenfilter (Filtropur S 0,2, Porengröße 0,2 µm, Sarstedt, Nümbrecht) steril filtriert und den Medien nach deren Sterilisation zugesetzt.

3.2.1 Wasser

Leitungswasser wurde durch eine BioQuell Wasserenthärtungsanlage (Judo Wasserenthärtungsanlagen GmbH, Winnenden) und eine Millipore Milli-RX 20 (Merck, Darmstadt) entsalzt und gereinigt. Vollentsalztes Wasser wurde mittels Destamat Bi-Destillation Apparat Bi 18E aus Quarzglas (QCS GmbH, Maintal) zweifach destilliert.

3.2.2 Nährmedien zur Kultivierung von *E. coli*

Tabelle 3-6: Nährmedien zur Kultivierung von E. coli

Bezeichnung	Bestandteile	Volumen / Mengen	Bemerkung
LB-Medium	Trypton	10,0 g	pH 7,0
	NaCl	10,0 g	
	Hefeextrakt	5,0 g	
	Wasser	ad 1000 ml	

3.2.3 Nährmedien zur Kultivierung von Actinobacteria

Tabelle 3-7: Nährmedien zur Kultivierung von Actinobacteria

Bezeichnung	Bestandteile	Volumen / Mengen	Bemerkung
GYM-Medium	Glucose	4,0 g	pH 7,2
	Hefeextrakt	4,0 g	
	Malzextrakt	10,0 g	
	Wasser	ad 1000 ml	
GYM-Festmedium	Glucose	0,4 g	pH 7,2
	Hefeextrakt	0,4 g	
	Malzextrakt	1,0 g	
	$CaCO_3$	0,2 g	
	Agar-Agar	1,2 g	
	Wasser	ad 100 ml	
MS-Medium	Mannitol	0,2 g	
	Sojamehl	0,2 g	
	Agar-Agar	2,0 g	
	Wasser	ad 100 ml	

3.2.4 Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika wurden in entsprechenden Lösungsmitteln (Tabelle 3-8) gelöst. Wässrige Lösungen wurden mit einem Spritzenfilter (Filtropur S 0,2, Porengröße 0,2 µm) steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Die Zugabe der Antibiotika erfolgte nach Sterilisation der Nährmedien. Bei Flüssigmedien fand diese kurz vor Gebrauch, bei Festmedien nach Abkühlen auf etwa 50 °C statt.

Tabelle 3-8: Verwendete Antibiotikalösungen

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung [mg/ml]	Lösungsmittel der Stammlösung	Endkonzentration [µg/ml]
Carbenicillin	50	Wasser	50
Chloramphenicol	50	Ethanol	12,5
Kanamycin	50	Wasser	25
Tetracyclin	12,5	Wasser	12,5

3.2.5 Puffer und Lösungen

3.2.5.1 Puffer und Lösungen zur Isolierung von DNA

Tabelle 3-9: Lösungen zur Isolierung von Plasmid-DNA

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration	Bemerkung
Miniprep-Lösung I	Tris-Base	50 mM	pH 8,0 mit HCl einstellen;
	EDTA	10 mM	vor Gebrauch RNase A frisch
	RNase A	100 µg/ml	zugeben
Miniprep-Lösung II	NaOH	0,2 M	nicht autoklavieren
	SDS	1 % (w/v)	
Miniprep-Lösung III	Kaliumacetat	3 M	pH 5,2 mit HCl einstellen

Tabelle 3-10: Lösungen zur Isolierung von genomischer DNA aus Actinobacteria

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration / Volumen	Bemerkung
TSE-Puffer	Tris	25 mM	pH 8,0
	EDTA	25 mM	Vor Gebrauch 3 mg/ml Lysozym
	Saccharose	10,3 % (w/v)	und 100 µg/ml RNase A zugeben
2 % SDS-Lösung	SDS	2 % (w/v)	
3 M Natriumacetat-Puffer	Natriumacetat	3 M	pH 5,2

3.2.5.2 Puffer und Lösungen zur Transformation von *E. coli*

Tabelle 3-11: Puffer und Lösungen zur $CaCl_2$-vermittelten Transformation von E. coli

Bezeichnung	Bestandteile	Endkonzentration
0,1 M Calciumchlorid-Lösung	$CaCl_2$	0,1 M
0,1 M Calciumchlorid-Lösung mit Glycerin	$CaCl_2$ Glycerin	0,1 M 15 % (w/v)

3.2.5.3 Lösungen zur Gelelektrophorese

Tabelle 3-12: Lösungen zur Agarose-Gelelektrophorese

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration / Volumen	Bemerkung
50x TAE-Puffer	Tris-Base 0,5 M EDTA (pH 8,0) Essigsäure 96 % Wasser	2 M 100 ml 57,1 ml ad 1000 ml	pH 7,8
6x Probenpuffer	Bromphenolblau Glycerin	0,25 % (w/v) 30 % (w/v)	

Tabelle 3-13: Lösungen zur SDS-PAGE

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration / Volumen	Bemerkung
10x Laufpuffer	Tris Base Glycin SDS	250 mM 1,92 M 1 % (w/v)	
Sammelgel (4 %)	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) Rotiphorese® Gel 30 10 % SDS TEMED APS Wasser	2,5 ml 1,3 ml 100 µl 10 µl 200 µl 5,9 ml	Menge für 4 Gele; APS als letzten Bestandteil unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugeben
Trenngel (15 %)	1,5 ml Tris-HCl (pH 8,8) Rotiphorese® Gel 30 SDS APS TEMED Wasser	5 ml 10 ml 200 µl 500 µl 10 µl 4,3 ml	Menge für 4 Gele; APS als letzten Bestandteil unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugeben
2x Probenpuffer	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 10 % SDS Bromphenolblau Glycerin ß-Mercaptoethanol Wasser	1,25 ml 2,0 ml 0,01 % (w/v) 2,5 ml 0,5 ml 3,55 ml	
Färbelösung	Coomassie Brilliant Blau G-250 Methanol Essigsäure Wasser	0,25 % (w/v) 45 % (w/v) 10 % (w/v) 45 % (w/v)	

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration / Volumen	Bemerkung
Entfärbelösung	Ethanol	20 % (w/v)	
	Essigsäure	10 % (w/v)	
	Wasser	70 % (w/v)	

3.2.5.4 Lösungen zur Western Blot-Analyse

Tabelle 3-14: Lösungen zur Western Blot-Analyse

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration / Volumen	Bemerkung
Transferpuffer (Towbin Buffer)	Tris Base	25 mM	Lagerung bei 4 °C
	Glycin	192 mM	
	Methanol	20% (v/v)	
TBS-Puffer	Tris Base	10 mM	pH 7,4
	NaCl	0,9% (w/v)	
TBS-T-Puffer	Tris Base	10 mM	pH 7,4
	NaCl	0,9 % (w/v)	
	Tween® 20	0,05 % (v/v)	
Blockierlösung	Tris Base	10 mM	pH 7,4
	NaCl	0,9 % (w/v)	
	Tween® 20	0,05 % (v/v)	
	Milchpulver	5 % (w/v)	
Substratpuffer	Tris Base	100 mM	pH 9,5
	NaCl	100 mM	
	$MgCl_2$	5 mM	
BCIP-Lösung	BCIP	20 mg	Lagerung bei -20 °C
	DMF	1 ml	
NBT-Lösung	NBT	50 mg	Lagerung bei -20 °C
	70 % DMF	1 ml	
Färbelösung	Substratpuffer	10 ml	Lösung unmittelbar vor
	BCIP-Lösung	80 µl	Gebrauch herstellen
	NBT-Lösung	60 µl	

3.2.5.5 Lösungen zur Proteinreinigung

Tabelle 3-15: Lösungen zur Reinigung von überproduzierten Proteinen mittele Affinitätschromatographie

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration	Bemerkung
Lysepuffer	NaH_2PO_4	50 mM	pH 8,0 mit NaOH einstellen;
	NaCl	300 mM	Lysozym vor Gebrauch frisch
	Imidazol	10 mM	zugeben
	Lysozym	1 mg/ml	
Waschpuffer	NaH_2PO_4	50 mM	pH 8,0 mit NaOH einstellen
	NaCl	300 mM	
	Imidazol	20 mM	
Elutionspuffer	NaH_2PO_4	50 mM	pH 8,0 mit NaOH einstellen
	NaCl	300 mM	
	Imidazol	250 mM	
Aufbewahrungspuffer	Tris	50 mM	pH 7,5 mit HCl einstellen
	Glycerin	15 % (V/V)	

3.2.5.6 Sonstige Lösungen und Puffer

Tabelle 3-16: Sonstige Lösungen

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration	Bemerkung
1 M IPTG-Lösung	IPTG	1 M	Lagerung bei -20 °C
X-Gal-Stammlösung	X-Gal	20 mg	Lagerung bei -20 °C
	DMF	1 ml	
X-Gal/IPTG-Lösung	1 M IPTG-Lösung	7 µl	Vor Gebrauch frisch zubereiten
	X-Gal-Stammlösung	40 µl	
	Wasser	153 µl	
0,1 % Tween®20- Lösung	Tween®20	0,1 % (v/v)	
RNase A-Lösung	RNase A	10 mg	Vor Gebrauch für 15 min bei
	10 mM Tris-HCl (pH 7,5)	1 ml	100 °C erhitzen;
			Lagerung bei -20 °C
TB-Puffer	KH_2PO_4	0,17 M	
	K_2HPO_4	0,72 M	
5x Bradford-Lösung	Serva Blau R-250	70 mg	Lagerung bei 4 °C unter
	Ethanol	50 ml	Lichtausschluss
	85 % Phosphorsäure	100 ml	
	Wasser	ad 200 ml	
1x Bradford-Lösung	5x Bradford-lösung	20 ml	vor Gebrauch filtrieren;
	Wasser	80 ml	Lagerung bei 4 °C unter
			Lichtausschluss
10x BSA-Lösung	BSA	1 mg/ml	Lagerung bei -20 °C

3.3 Plasmide, Primer, Mikroorganismen

3.3.1 Plasmide

Tabelle 3-17: Kommerziell erworbene Klonierungs- und Expressionsvektoren

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
pGEM®-T Easy	Linearisierter Vektor mit T-Überhang am 3'-Ende zum Einbringen von PCR-Produkten mit A-Überhang am 3' Ende.	Promega, Mannheim
pQE-60	Expressionsvektor für *E. coli*, Amp^R, ColE1-Origin, T5-Promotor, Sequenz für C-terminalen His_6-*tag*	Qiagen, Hilden

Tabelle 3-18: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pHis8	Expressionsvektor für *E. coli*, pET28a(+)-Derivat, Kan^R, f1-Origin, pBR322-Origin, T7-Promotor, Sequenz für N-terminalen His_8-*tag* und C-terminalen His_6-*tag*	(Jez *et al.*, 2000)
Ndas_1146-1147-EcoRI-HindIII-pACYC	überlappende Sequenz von *ndas_1146* und *ndas_1147* mit EcoRI und HindIII in pACYCDuet-1	(Giessen *et al.*, 2013b)

Tabelle 3-19: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung
pKB18	Klonierungskonstrukt für ndas_1146 aus N. dassonvillei subsp. dassonvillei DSM 43111; durch PCR amplifiziertes DNA-Fragment (603 bp) mit NcoI und BglII aus Ndas_1146-1147-EcoRI-HindIII-pACYC (Tabelle 3-18) in pGEM®-T Easy kloniert; NC_014210.1: bp 1400900 – bp 1401487 (WP_071621715, Ndas_1146); Primer: Nd001-for und Nd001-rev;
pKB19	Klonierungskonstrukt für *ndas_1147* aus *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43111; durch PCR amplifiziertes DNA-Fragment (330 bp) mit NcoI und BglII aus Ndas_1146-1147-EcoRI-HindIII-pACYC (Tabelle 3-18) in pGEM®-T Easy kloniert; NC_014210.1: bp 1401468 – bp 1401785 (WP_013152195, Ndas_1147); Primer: Nd002-for und Nd002-rev;
pKB20	Klonierungskonstrukt für *CDPS-Np* aus *N. prasina* NRRL B-16235; durch PCR amplifiziertes DNA-Fragment (742 bp) mit NcoI und BglII aus gDNA in pGEM®-T Easy kloniert; NZ_ANAE01000117: bp 32019 – bp 32747 (WP_017544375.1, CDPS-Np); Primer: Np002-for und Np002-rev;
pKB23	Expressionskonstrukt für *ndas_1146* aus *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43111; NcoI-BglII-Fragment (587 bp) aus pKB18 in pQE-60 kloniert; zur Produktion von Ndas_1146-His_6 in *E. coli*
pKB24	Expressionskonstrukt für *ndas_1147* aus *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43111; NcoI-BglII-Fragment (317 bp) aus pKB19 in pQE-60 kloniert; zur Produktion von Ndas_1147-His_6 in *E. coli*
pKB25	Expressionskonstrukt für *CDPS-Np* aus *N. prasina* NRRL B-16235; NcoI-BglII-Fragment (728 bp) aus pKB20 in pQE-60 kloniert; zur Produktion von CDPS-Np-His_6 in *E. coli*
pKB31	Klonierungskonstrukt für *CDO_A-Np* aus *N. prasina* NRRL B-16235; durch PCR amplifiziertes DNA-Fragment (573 bp) mit NcoI und BglII aus gDNA in pGEM®-T Easy kloniert; NZ_ANAE01000117: bp 31180 – bp 31737 (WP_017544373.1, CDO_A-Np); Primer: Np003-for und Np003-rev;
pKB32	Klonierungskonstrukt für *CDO_B-Np* aus *N. prasina* NRRL B-16235; durch PCR amplifiziertes DNA-Fragment (321 bp) mit NcoI und BglII aus gDNA in pGEM®-T Easy kloniert; NZ_ANAE01000117: bp 31730 – bp 32035 (WP_017544374.1, CDO_B-Np); Primer: Np004-for und Np004-rev;
pKB33	Expressionskonstrukt für *CDO_A-Np* aus *N. prasina* NRRL B-16235; NcoI-BglII-Fragment (557 bp) aus pKB31 in pQE-60 kloniert; zur Produktion von CDO_A-Np-His_6 in *E. coli*
pKB34	Expressionskonstrukt für *CDO_B-Np* aus *N. prasina* NRRL B-16235; NcoI-BglII-Fragment (305 bp) aus pKB32 in pQE-60 kloniert; zur Produktion von CDO_B-Np-His_6 in *E. coli*
pKB54	Klonierungskonstrukt für *CDO_A-Np/CDO_B-Np/CDPS-Np* aus *N. prasina* NRRL B-16235; durch PCR amplifiziertes DNA-Fragment mit NcoI und BamHI aus gDNA in pGEM®-T Easy kloniert; NZ_ANAE01000117: bp 31180 – bp 32747 (WP_017544373.1, CDO_A-Np; WP_017544374.1, CDO_B-Np; WP_017544375.1, CDPS-Np); Primer: Np006-for und Np006-rev;

Bezeichnung	Beschreibung
pKB59	Klonierungskonstrukt für *ndas_1146* aus *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43111; durch PCR amplifiziertes DNA-Fragment (604 bp) mit NcoI und BamHI, XhoI aus pKB18 in pGEM®-T Easy kloniert; NC_014210.1: bp 1400900 – bp 1401487 (WP_071621715, Ndas_1146); Primer: Nd001-for und Nd001b-rev;
pKB60	Expressionskonstrukt für *ndas_1146* aus *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43111; NcoI-XhoI-Fragment (593 bp) aus pKB59 in pHis8 kloniert; zur Produktion von Ndas_1146-His_6 in *E. coli*
pKB62	Expressionskonstrukt für *ndas_1147* aus *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43111; NcoI-BglII-Fragment (317 bp) aus pKB19 in pKB60 kloniert; zur Produktion von Ndas_1147-His_6 in *E. coli*
pKB64	Expressionskonstrukt für *CDO_A-Np* aus *N. prasina* NRRL B-16235; NcoI-BglII-Fragment (557 bp) aus pKB31 in pKB60 kloniert; zur Produktion von CDO_A-Np-His_6 in *E. coli*
pKB65	Expressionskonstrukt für *CDO_B-Np* aus *N. prasina* NRRL B-16235; NcoI-BglII-Fragment (305 bp) aus pKB32 in pKB60 kloniert; zur Produktion von CDO_B-Np-His_6 in *E. coli*
pKB78	Klonierungskonstrukt für *CDO_A-Np/CDO_B-Np* aus *N. prasina* NRRL B-16235; durch PCR amplifiziertes DNA-Fragment (870 bp) mit NcoI und BamHI aus pKB54 in pGEM®-T Easy kloniert; NZ_ANAE01000117: bp 31180 – bp 32035 (WP_017544373.1, CDO_A-Np; WP_017544374.1, CDO_B-Np); Primer: Np003-for und Np004b-rev;
pKB79	Klonierungskonstrukt für *CDO_A-Np/CDO_B-Np* aus *N. prasina* NRRL B-16235; durch PCR amplifiziertes DNA-Fragment (887 bp)mit NcoI und BglII aus pKB54 in pGEM®-T Easy kloniert; NZ_ANAE01000117: bp 31180 – bp 32035 (WP_017544373.1, CDO_A-Np; WP_017544374.1, CDO_B-Np); Primer: Np003b-for und Np004-rev;
pKB81	Expressionskonstrukt für *CDO_A-Np/CDO_B-Np* aus *N. prasina* NRRL B-16235; NcoI-BamHI-Fragment (858 bp) aus pKB78 in pQE-60 kloniert; zur Produktion von CDO_A-Np/CDO_B-Np in *E. coli*
pKB83	Expressionskonstrukt für *CDO_A-Np/CDO_B-Np* aus *N. prasina* NRRL B-16235; NcoI-BglII-Fragment (876 bp) aus pKB79 in pQE-60 kloniert; zur Produktion von His_6-CDO_A-Np/CDO_B-Np-His_6 in *E. coli*
pKB89	Klonierungskonstrukt für *albA/albB* aus *S. noursei* ATCC 11455; durch PCR amplifiziertes DNA-Fragment (947 bp) mit NcoI und BamHI aus gDNA in pGEM®-T Easy kloniert; AY129235.1: bp 711 – bp 1647 (AAN07907.1, AlbA; AAN07908.1, AlbB); Primer: Sn001-for und Sn001-rev;
pKB90	Expressionskonstrukt für *albA/albB* aus *S. noursei* ATCC 11455; NcoI-BamHI-Fragment (939 bp) aus pKB89 in pQE-60 kloniert; zur Produktion von AlbA/AlbB in *E. coli*
pKB101	Expressionskonstrukt für *CDPS-Np_T82A*; erhalten durch Mutagenese von pKB25; Primer: Np010-for und Np010b-rev; Mutation: A244G; zur Produktion von CDPS-Np_T82A-His_6 in *E. coli*
pKB102	Expressionskonstrukt für *CDPS-Np_T82V*; erhalten durch Mutagenese von pKB25; Primer: Np010-for und Np010b-rev; Mutationen: A244G, C245T; zur Produktion von CDPS-Np_T82V-His_6 in *E. coli*
pKB106	Expressionskonstrukt für *CDPS-Np_Y196L*; erhalten durch Mutagenese von pKB25; Primer: Np011-for und Np011-rev; Mutationen: T586C, A587T; zur Produktion von CDPS-Np_Y196L-His_6 in *E. coli*
pKB108	Expressionskonstrukt für *CDPS-Np_Y196F*; erhalten durch Mutagenese von pKB25; Primer: Np011-for und Np011-rev; Mutation: A587T; zur Produktion von CDPS-Np_Y196L-His_6 in *E. coli*

Bezeichnung	Beschreibung
pKB113	Expressionskonstrukt für *CDPS-Np_T82A_Y196L*; erhalten durch Mutagenese von pKB101; Primer: Np013-for und Np013-rev; Mutationen: A244G, T586C, A587T; zur Produktion von CDPS-Np_T82A_Y196L-His_6 in *E. coli*
pKB115	Expressionskonstrukt für *CDPS-Np_T82A_Y196F*; erhalten durch Mutagenese von pKB101; Primer: Np011-for und Np011-rev; Mutationen: A244G, A587T; zur Produktion von CDPS-Np_T82A_Y196F-His_6 in *E. coli*
pKB117	Expressionskonstrukt für *CDPS-Np_T82V_Y196L*; erhalten durch Mutagenese von pKB102; Primer: Np013-for und Np013-rev; Mutationen: A244G, C245T, T586C, A587T; zur Produktion von CDPS-Np_T82V_Y196L-His_6 in *E. coli*
pKB119	Expressionskonstrukt für *CDPS-Np_T82V_Y196F*; erhalten durch Mutagenese von pKB102; Primer: Np011-for und Np011-rev; Mutationen: A244G, C245T, A587T; zur Produktion von CDPS-Np_T82V_Y196F-His_6 in *E. coli*
pKB140	Klonierungskonstrukt für *CDO_A-Np* aus *N. prasina* NRRL B-16235; durch PCR amplifiziertes DNA-Fragment mit NcoI und SacI/BamHI aus pKB81 in pGEM®-T Easy kloniert; NZ_ANAE01000117: bp 31180 – bp 31737 (WP_017544373.1, CDO_A-Np); Primer: Np018-for und Np018-rev;
pKB141	Klonierungskonstrukt für *CDO_B-Np* aus *N. prasina* NRRL B-16235; durch PCR amplifiziertes DNA-Fragment mit SacI und BglII aus pKB81 in pGEM®-T Easy kloniert; NZ_ANAE01000117: bp 31718 – bp 32035 (WP_026129216.1, CDO_B-Np); Primer: Np019-for und Np019-rev;
pKB145	Expressionskonstrukt für *CDPS-Np_E215A_L217M*; erhalten durch Mutagenese von pKB25; Primer: Np021-for und Np021-rev; Mutationen: A644C, C649A; zur Produktion von CDPS-Np_E215A_L217M-His_6 in *E. coli*
pKB149	Expressionskonstrukt für *CDPS-Np_T82A_Y196L_E215A_L217M*; erhalten durch Mutagenese von pKB113; Primer: Np021-for und Np021-rev; Mutationen: A244G, T586C, A587T, A644C C649A; zur Produktion von CDPS-Np_T82A_Y196L_E215A_L217M-His_6 in *E. coli*
pKB150	Expressionskonstrukt für *CDPS-Np_Q170H_I171V_G174A_E215A_L217M*; erhalten durch Mutagenese von pKB145; Primer: Np020-for und Np020-rev; Mutationen: G510C, A511G, G521C, T522C, A644C C649A; zur Produktion von CDPS-Np_Q170H_I171V_G174A_E215A_L217M-His_6 in *E. coli*
pKB151	Expressionskonstrukt für *CDPS-Np_T82A_Y196L_Q170H_I171V_G174A_E215A_L217M*; erhalten durch Mutagenese von pKB149; Primer: Np020-for und Np020-rev; Mutationen: A244G, T586C, A587T, G510C, A511G, G521C, T522C, A644C C649A; zur Produktion von CDPS-Np_T82A_Y196L_Q170H_I171V_G174A_E215A_L217M-His_6 in *E. coli*
pKB157	Expressionskonstrukt für *CDO_A-Np* aus *N. prasina* NRRL B-16235; NcoI-BamHI-Fragment (578 bp) aus pKB140 in pQE-60 kloniert; zur Produktion von CDO_A-Np in *E. coli*
pKB158	Expressionskonstrukt für *CDO_A-Np* und *CDO_B-Np* aus *N. prasina* NRRL B-16235; NcoI-SacI-Fragment (576 bp) aus pKB140 und SacI-BglII-Fragment (338 bp) aus pKB141 in pQE-60 kloniert; zur Produktion von CDO_A-Np und CDO_B-Np (jeweils mit eigenen Ribosomalen Bindestellen) in *E. coli*

3.3.2 Primer

Tabelle 3-20: Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5‘-3‘)	Bemerkung / Plasmid
Np002-for	AGCCC**CA**TG**G**CGTTTCAGCCTGAGACAA	zur Klonierung von *CDPS-Np*
Np002-rev	CGTT**AGATCT**CCTCGGCCTCAGGACGAG	mit NcoI und BglII in pBK20
Np003-for	AGTGG**CC**ATGGCTGTGGCGGCCGAAGAA	zur Klonierung von *CDO_A-Np*
Np003-rev	CGCGG**AGA**TC**T**TTCACCCCAGCACTCAT	mit NcoI und BglII in pBK31
Np004-for	TGCTG**CCA**TG**G**ATGACGACCGCGTCGGT	zur Klonierung von *CDO_B-Np*
Np004-rev	GCGTT**AGA**TC**T**GGCTGAAACGGCACCGG	mit NcoI und BglII in pBK32
Np003-for	AGTGG**CC**ATGGCTGTGGCGGCCGAAGAA	zur Klonierung von *CDO_A-Np / CDO_B-Np* mit NcoI und BamHI in pKB78
Np004b-rev	**T**G**GATC**CTCAGGCTGAAACGGCACCGG	
Np003b-for	**CCATGG**C**GCAT**CA**CCATCACCA**T**CAC**GCTGTGGCGGCCGAAGAACC	zur Klonierung von *CDO_A-Np / CDO_B-Np* mit NcoI und BglII in pKB79
Np004-rev	GCGTT**AGA**TC**T**GGCTGAAACGGCACCGG	
Np006-for	**ACC**ATGGCTGTGGCGGCCGAAGAAC	zur Klonierung von *CDO_A-Np / CDO_B-Np/CDPS-Np* mit NcoI und BamHI in pKB54
Np006-rev	**T**G**GATCC**CTACCTCGGCCTCAGGACGAG	
Np010-for	CTCTAC**SY**GGACCTGCACCTCGACACCATG	zur Mutagenese von *CDPS-Np:* A244G/C, C245T/C (T82A/V/L/P)
Np010b-rev	GGTCC**RS**GTAGAGCAGGTCCACTGCGGC	
Np011-for	CTGCCC**YT**CCTGCTCAGCACCCCCGAGG	zur Mutagenese von CDPS-Np: T586C/T, A587T (Y196L/F)
Np011-rev	GCAGG**AY**GGGCAGTTCGGCGCGCAGGTAG	
Np013-for	CTGCCC**CT**CCTGCTCAGCACCCCCGAGG	zur Mutagenese von CDPS-Np: T586C, A587T (Y196L)
Np013-rev	GCAGG**AG**GGGCAGTTCGGCGCGCAGGTAG	
Np018-for	**CC**ATGGCTGTGGCGGCCGAAGAACCG	zur Klonierung von *CDO_A-Np* mit NcoI und SacI/BamHI in pKB140
Np018-rev	**GGATCCGAGCTC**T**C**T**C**C**TG**G**TAC**CTCATTCACCCCAGCACTCAT	
Np019-for	**GAGCT**CATGAGTGCTGGGGTGAATGA	zur Klonierung von *CDO_B-Np* mit SacI und BglII in pKB141
Np019-rev	**AG**A**T**C**TA**C**T**A**GTTCTCCT**G**GATC**CTCAGGCTGAAACGGCACCGG	
Np020-for	CACGTCCGGCA**CG**TCGTCGGCG**CC**GGACCCGGGTCGCCGGAG	zur Mutagenese von *CDPS-Np:* G510C (Q170H), A511G (I171V), G521C, T522C (G174A)
Np020-rev	CCCGGGTCC**GG**CGCCGACGA**CG**TGCCGGACGTGCTCCTCGCA	
Np021-for	TACCACG**C**ACTG**A**TGCCGCTCCTGGTCGAGCTGGAG	zur Mutagenese von *CDPS-Np:* A644C (E215A), C649A (L217M)
Np021-rev	GAGCGGCA**T**CAGT**G**CGTGGTAACAGCACACCGACGA	
Nd001-for	CGAAT**CCA**TGGACACAGGTTCGAGCGAG	zur Klonierung von *ndas_1146* mit NcoI und BglII in pBK18
Nd001-rev	GTCGGA**GA**TC**T**GGTTCCCCAGCGCTCAT	
Nd001-for	CGAAT**CCA**TGGACACAGGTTCGAGCGAG	zur Klonierung von *ndas_1146* mit NcoI und (BamHI), XhoI in pBK59
Nd001b-rev	**CTCGA**G**GGA**TC**C**GGTTCCCCAGCGCTCATGGCTG	
Nd002-for	AG**CCATG****G**GCGCTGGGGAACCTGA	zur Klonierung von *ndas_1147* mit NcoI und BglII in pBK19
Nd002-rev	GCAAG**AGA**TC**T**GTCGGAGATGACATCGG	
Sn001-for	**A**C**CA**TG**G**GGCGCCACCCATCGCATT	zur Klonierung von *albA/albB* mit NcoI und BamHI in pKB89
Sn001-rev	**TGGA**TC**C**TCAGGGGGTTTCAATTTC	

3.3.3 Mikroorganismen

3.3.3.1 Bakterienstämme

Tabelle 3-21: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
E. coli DH5α	F^- ϕ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F) U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17 (r_K^-, m_K^+) *pho*A *sup*E44 λ^- *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
E. coli XL1-Blue MRF‘	Δ(*mcrA*)*183* Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)*173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* [F’ *proAB lac*IqZΔ*M15* Tn*10* (Tetr)]	Stratagene, Agilent, Santa Clara, CA, USA
E. coli XL10-Gold	Tet^rΔ (*mcrA*)*183* Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)*173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F’ *proAB lacI*^{q}ZΔ*M15* Tn*10* (Tet^r) Amy Camr]	Stratagene, Agilent, Santa Clara, CA, USA
E. coli JM109	e14-(McrA-) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17*(rK- mK+) *supE44 relA1* Δ(*lac-proAB*) [F’ *traD36 proAB lacIqZΔM15*]	Stratagene, Agilent, Santa Clara, CA, USA
E. coli M15 [pREP4]	Nal^S, Str^S, Rif^S, Thi^-, Lac^-, Ara^+, Gal^+, Mtl^-, F^-, $RecA^+$, Uvr^+, Lon^+	Qiagen, Hilden
E. coli SG13009 [pREP4]	Nal^S, Str^S, Rif^S, Thi^-, Lac^-, Ara^+, Gal^+, Mtl^-, F^-, $RecA^+$, Uvr^+, Lon^+	Qiagen, Hilden
E. coli SoluBL21™	F^-*ompT hsd*S_B($r_B^-m_B^-$) *gal dcm* $(DE3)^+$	AMS Biotechnology, Abingdon, Großbritannien
E. coli Rosetta 2 (DE3) pLysS	F^- *ompT hsd*S_B(r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3) pLysSRARE2 (Cam^R)	Novagen, Merck, Darmstadt

3.3.3.2 Actinobacteria

Tabelle 3-22: Übersicht über die verwendeten Actinobakterienstämme

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
Nocardiopsis prasina NRRL B-16235	Wildtypstamm Synonyme: *Nocardiopsis prasina* (Miyashita *et al.*, 1984; Yassin *et al.*, 1997); *Nocardiopsis alba* subsp. *prasina (Grund & Kroppenstedt, 1990; Miyashita et al., 1984)*; *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *prasina (Miyashita et al., 1984)*; = ATCC 35940 = DSM 43845 = IFO 14423 = JCM 3336 = NIAES (K. Miyashita, 208)	ARS Culture Collection (NRRL), Peoria, IL, USA

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
Streptomyces noursei ATCC 11455	Wildtypstamm Synonyme: *Streptomyces noursei* Brown et al. 1953 = DSM 40636 = NRRL B-1714	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA

3.4 Bioinformatische Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Sequenzen stammen aus den Daten des National Center for Biotechnology Information (NCBI; https://www.ncbi.nlm.nih.gov). Nukleotid- bzw. Aminosäure-sequenzen wurden durch das Programm Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) mit Sequenzen der NCBI-Datenbank verglichen. Zur Bestimmung der Sequenzidentitäten von Proteinen wurde das Programm EMBOSS Needle (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle) verwendet. Alignments mit mehreren Sequenzen wurden mit MUSCLE (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle), ESPript 3.0 (http://espript.ibcp.fr) oder dem CLC Sequence Viewer (CLC bio, Qiagen) visualisiert. Phylogenetische Analysen wurden mit Hilfe des „one click“ Modus des Programmes Phylogeny.fr (http://www.phylogeny.fr) erstellt. Die Codon Usage der Gene im entsprechenden Organismus wurde mit Hilfe der Codon Usage Database (http://www.kazusa.or.jp/codon) und dem CAIcal SERVER (http://genomes.urv.es/CAIcal) analysiert. Zur Darstellung von Genclustern wurde das Programm EasyFig verwendet. Die Illustration von Plasmidkarten erfolgte mit Hilfe des SnapGene Viewer von GSL Biotech LLC.

3.5 Methoden der Mikrobiologie

3.5.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in der Regel in LB-Medium (Tabelle 3-6) bei 37 °C unter Lichtausschluss. Die Anzucht von *E. coli* auf Festmedien erfolgte hierbei über Nacht (16 - 18 h) im Brutschrank. Die Anzucht von Vorkulturen in Flüssigmedien erfolgte über Nacht (16 - 18 h) bei 230 rpm im Schüttelinkubator. Hauptkulturen wurden mit jeweils 1 % (v/v) der entsprechenden Vorkultur inokuliert. Die Nährmedien wurden zur Selektion mit Antibiotika (Tabelle 3-8) entsprechend der jeweiligen plasmid-vermittelten Resistenz versetzt.

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierfür wurden jeweils 600 µl Übernachtkultur mit 400 µl sterilem Glycerin gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.5.2 Kultivierung von Actinobacteria

3.5.2.1 Kultivierung von *S. noursei*

Die Anzucht von *S. noursei* (Tabelle 3-22) erfolgte für drei Tage auf MS-Festmedium (Tabelle 3-7) bei 28 °C unter Lichtausschluss im Brutschrank. Die Kultivierung erfolgte für drei Tage in GYM-Flüssigmedium (Tabelle 3-7) bei 28 °C unter Lichtausschluss im Schüttelinkubator bei 180 rpm.

3.5.2.2 Kultivierung von *N. prasina*

Die Anzucht von *N. prasina* (Tabelle 3-22) erfolgte für sieben Tage auf GYM-Festmedium (Tabelle 3-7) bei 28 °C unter Lichtausschluss im Brutschrank. In Abbildung 3-1 ist *N. prasina* nach einer Inkubation von zehn Tagen bei 28 °C auf GYM-Medium dargestellt. Die Kultivierung in GYM-Flüssigmedium (Tabelle 3-7) erfolgte für sieben Tage bei 28 °C und 180 rpm im Schüttelinkubator unter Lichtausschluss.

Zur dauerhaften Lagerung wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierfür wurde jeweils 1 ml Flüssigkultur für 10 Minuten bei 4 °C und 4300 *x g* zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml 20 % Glycerin-Lösung gewaschen und anschließend in 0,5 ml 20 % Glycerin-Lösung resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

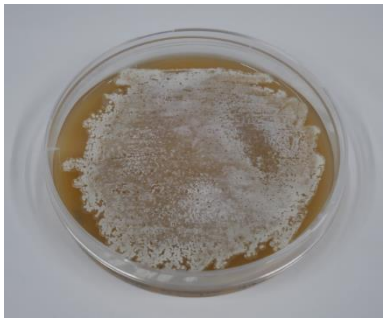


Abbildung 3-1: Kultivierung von Nocardiopsis prasina für 10 Tage bei 28 °C auf GYM-Festmedium.

3.6 Methoden der Molekularbiologie

3.6.1 Isolierung von genomischer DNA aus Actinobacteria

Zur Isolierung von genomischer DNA von *S. noursei* bzw. *N. prasina* wurden 30 ml einer drei bzw. sieben Tage alten Flüssigkultur in einem 50 ml Reaktionsgefäß für 10 Minuten bei 4 °C und 3000 *x g* zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde anschließend 2-mal mit jeweils 15 ml TSE-Puffer (Tabelle 3-10) gewaschen. In einem 2 ml Reaktionsgefäß wurden etwa 2 mg Zellen in 500 µl TSE-Puffer mit

Zusatz von 3 mg/ml Lysozym und 100 µg/ml RNase A resuspendiert und anschließend für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 250 µl 2 % SDS-Lösung (Tabelle 3-10) wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 60 °C, 10 Minuten bei Raumtemperatur und wiederum 10 Minuten bei 60 °C inkubiert und anschließend für 20 Minuten bei 4 °C und 17000 *x g* zentrifugiert. Der Überstand mit einem Volumenteil Roti® -Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Tabelle 3-1) gründlich gemischt und erneut für 10 Minuten bei 4 °C und 17000 *x g* zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 2-mal wiederholt, wobei bei der letzten Wiederholung 70 µl 3 M Natriumacetat-Puffer (Tabelle 3-10) zugesetzt wurde. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und durch gründliches Invertieren mit einem Volumenteil Isopropanol gemischt. Die DNA wurde für 30 Minuten bei 4 °C und 17000 *x g* gefällt, mit 500 µl einer 70 % Ethanol-Lösung gewaschen, getrocknet und in 50 µl Aqua bidest. wieder aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.6.2 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* (Alkalische Lyse)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Plasmid-Isolierungen nach diesem Protokoll durchgeführt. Hierfür wurden einzelne plasmidtragende *E. coli* XL1-Blue MRF‘- oder XL10-Gold-Kolonien (Tabelle 3-21) in jeweils 4 ml LB-Medium (Tabelle 3-6) mit Zusatz eines entsprechenden Antibiotikums (Tabelle 3-8) für 16 h bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Jeweils 2 ml dieser Kulturen wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei 4 °C und 9600 *x g* zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 250 µl Miniprep-Lösung I (Tabelle 3-9) resuspendiert, mit 250 µl Miniprep-Lösung II (Tabelle 3-9) durch Invertieren gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 250 µl Miniprep-Lösung III (Tabelle 3-9) wurde der Ansatz durch Invertieren gemischt und anschließend für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss an eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 4 °C und 17000 *x g* wurden jeweils 750 µl des Überstandes in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 750 µl eiskaltem Isopropanol durch gründliches Invertieren gemischt. Die DNA wurde für 30 Minuten bei 4 °C und 17000 *x g* pelletiert und durch Zugabe von 500 µl eiskalter 70 % Ethanol-Lösung gewaschen. Nach Zentrifugation für 15 Minuten bei 4 °C und 17000 *x g* wurde das Pellet für 10 Minuten bei 60 °C getrocknet und anschließend in 50 µl Aqua bidest. resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.6.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Alle Polymerase-Kettenreaktionen wurden in einem Labcycler oder einem MyCycler™ Thermal Cycler (Tabelle 3-3) durchgeführt. Die Synthese der hierfür erforderlichen Oligonukleotide (Tabelle 3-20) wurde entweder bei Eurofins MWG (Ebersberg) oder bei Seqlab (Göttingen) in Auftrag gegeben.

Um die optimale Anlagerungstemperatur für die entsprechenden Oligonukleotide zu ermitteln, wurde gegebenenfalls eine Gradienten-PCR mit der Taq-Polymerase durchgeführt. Hierfür wurde der in Tabelle 3-23 aufgeführte PCR-Ansatz mit den entsprechenden PCR-Bedingungen aus Tabelle 3-25 verwendet. Anschließend wurde zur Amplifikation von Gensequenzen zu Klonierungszwecken eine PCR mit dem Expand High Fidelity^{Plus} System durchgeführt. Für die PCR wurde hierbei der in Tabelle 3-24 aufgeführte PCR-Ansatz mit den entsprechenden PCR-Bedingungen aus Tabelle 3-25 und den ermittelten Anlagerungstemperaturen (Tabelle 3-26) verwendet.

Tabelle 3-23: PCR-Ansatz für die Taq-Polymerase

Bestandteil	**Konzentration**
gDNA	5 - 500 ng
Primer	je 0,2 µM
dNTP Mix	je 200 µM
10x Taq-Puffer	1x
Taq-Polymerase	2,5 U

Tabelle 3-24: PCR-Ansatz für das Expand High Fidelity^{Plus} PCR System

Bestandteil	**Konzentration**
gDNA / Plasmid-DNA	5 - 500 ng / 100 pg -10 ng
Primer	je 0,4 µM
dNTP Mix	je 200 µM
DMSO	2,5 % (v/v) *optional*
5x High Fidelity-Puffer	1x
High Fidelity Polymerase	2,5 U

Tabelle 3-25: PCR-Programm mit Taq-Polymerase (links) bzw. Expand High Fidelity^{Plus} PCR System (rechts)

Temperatur	**Dauer**	**Zyklen**
95 °C	5 min	1
95 °C	1 min	30
48 - 64 °C	1 min	
72 °C	1 min / 1000 bp	
72 °C	10 min	1
4 °C	∞	

Temperatur	**Dauer**	**Zyklen**
94 °C	2 min	1
94 °C	15 sec	16/30*
T_a	1 min	
72 °C	1 min / 1000 bp	
72 °C	7 min	1
4 °C	∞	

*16 Zyklen bei Plasmid-DNA; 30 Zyklen bei gDNA

Tabelle 3-26: Übersicht über genspezifische Anlagerungstemperaturen (T_a) und Elongationszeiten

Gen	Anlagerungs-temperatur	Elongationszeit
CDPS-Np (pKB20)	55 °C	1 min
CDO_A-Np + CDO_B-Np (pKB78)	60 °C	1 min
CDO_A-Np + CDO_B-Np (pKB79)	60 °C	1 min
CDO_A-Np + CDO_B-Np + CDPS-Np (pKB54)	55 °C	2 min
CDO_A-Np (pKB140)	60 °C	30 sec
CDO_B-Np (pKB141)	60 °C	30 sec
CDO_A-Np (pKB31)	55 °C	30 sec
CDO_B-Np (pKB32)	55 °C	30 sec
ndas_1146 (pKB18)	55 °C	30 sec
ndas_1146 (pKB59)	55 °C	30 sec
ndas_1147 (pKB19)	55 °C	30 sec
albA + albB (pKB89)	55 °C	1 min

3.6.4 PCR zur zielgerichteten Mutagenese

Im Rahmen von Experimenten zur zielgerichteten Mutagenese wurde die Aminosäuresequenz der Enzyme durch eine gezielte Änderung der Nukleotidsequenz mittels PCR erreicht. Hierfür wurde ein Protokoll zum Design der Oligonukleotide (Zheng *et al.*, 2004) mit einem zur Restriktion mit *Dpn*I (Shenoy & Visweswariah, 2003) kombiniert. Um eine Aminosäure zu verändern wurden jeweils zwei Oligonukleotide entworfen, welche eine Größe von etwa 29 bp aufwiesen. Das veränderte Basentriplet befand sich hierbei jeweils etwa 6 bp vom 5‘-Ende und etwa 20 bp vom 3‘-Ende entfernt. Hieraus ergab sich ein homologer Bereich zwischen den beiden Oligonukleotiden von etwa 15 bp und ein homologer Bereich des jeweiligen Oligonukleotids mit dem jeweiligen Template von etwa 15 bp, wodurch das Verschmelzen der beiden Oligonukleotide miteinander verhindert wurde. Als Template wurde das entsprechende Expressionskonstrukt für *E. coli* verwendet. Die PCR wurde mit dem Expand High Fidelity^{Plus} System (Tabelle 3-5) unter den in Tabelle 3-27 aufgelisteten Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 3-27: PCR-Programm zur zielgerichteten Mutagenese

Temperatur	Dauer	Zyklen
94 °C	2 min	1
94 °C	15 sec	16
60 °C	1 min	
68 °C	4 min	
68 °C	7 min	1
4 °C	∞	

Im Anschluss an die PCR wurde der Ansatz für 4 Stunden bei 37 °C mit 20 Units DpnI inkubiert. Hierbei wurde lediglich die unmutierte methylierte Template-DNA restringiert. Dieser Ansatz wurde mit Hilfe des Hi Yield® Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Tabelle 3-5) nach Herstellerangaben gereinigt und anschließend zur Transformation von *E. coli* eingesetzt (Kapitel 3.6.9).

3.6.5 Agarose-Gelelektrophorese

Eine Agarose-Gelelektrophorese wurde durchgeführt, um Nukleinsäuren der Größe nach horizontal auftrennen und detektieren zu können. Hierfür wurde zunächst ein Gel aus Agarose und 1x TAE-Puffer (Tabelle 3-12) hergestellt. Die Agarosekonzentrationen richten sich hierbei nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente und bewegen sich zwischen 0,8 und 2 %. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer zunächst mit Hilfe einer Mikrowelle gelöst und anschließend nach Abkühlung mit SYBR® Safe DNA Gel Stain (Tabelle 3-5) versetzt. Das flüssige Gel wurde in eine mit einem entsprechenden Kamm versehene Gelgießschale des Gelco-Systems (Tabelle 3-3) gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde die Gelgießschale in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Puffer überschichtet. Anschließend wurde der Kamm entfernt, so dass die Probentaschen zum Beladen frei wurden. Jeweils 10 µl der DNA-Lösungen wurden mit 2 µl 6x DNA Ladepuffer (Tabelle 3-12) gemischt und in die Probentaschen pipettiert. Als Größen- und Konzentrationsstandard wurde der GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Tabelle 3-5) verwendet. Die DNA-Fragmente wurden bei einer Spannung von 125 V aufgetrennt und anschließend zur Detektion und Dokumentation mit Hilfe des ImageQuant 100 (Tabelle 3-3) unter einer UV-Lampe (Wellenlänge 312 nm) bzw. mit Hilfe des FastGene® FAS Digi Imaging System (Tabelle 3-3) fotografiert.

3.6.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Hi Yield® Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Tabelle 3-5) verwendet. Hierfür wurden die DNA-Fragmente zunächst mittels Elektrophorese (Kapitel 3.6.5) aufgetrennt, detektiert und das gewünschte DNA-Fragment mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus dem Agarosegel erfolgte nach Herstellerangaben. Das gereinigte DNA-Fragment wurde in Aqua bidest. gelöst und anschließend bei -20 °C gelagert.

3.6.7 Restriktion von DNA

Zur Restriktion von DNA wurden Restriktionsendonukleasen der beiden Firmen Jena Bioscience und Fermentas (Tabelle 3-5) verwendet. Zu analytischen Zwecken wurden Reaktionen mit einem Endvolumen von 10 µl nach Tabelle 3-28 angesetzt und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Hierbei wurde die zu untersuchende DNA-Lösung mit einer Restriktionsendonuklease (0,5 U/µl) bzw. bei Bedarf mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen (jeweils 0,25 U/µl) und dem zugehörigen Puffer gemischt und mit zweifach destillierten Wasser zu einem Endvolumen von 10 µl aufgefüllt. Im

Anschluss wurden die DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.6.5) aufgetrennt und detektiert. Zur anschließenden Isolierung von DNA-Fragmenten wurden entsprechende Reaktionen mit Endvolumen von 60 µl durchgeführt. Wenn eine Gensequenz über eine zusätzlich zu der zum Klonieren eingefügte Erkennungssequenz für Restriktionsendonukleasen innerhalb der kodierenden Gensequenz verfügt, wurde eine partielle Restriktion durchgeführt. Hierfür wurde eine Reaktion nach Tabelle 3-28 durchgeführt, bei der die Konzentration der betreffenden Restriktionsendonuklease auf 0,0125 U/µl reduziert wurde.

Tabelle 3-28: Ansatz für die Restriktion von DNA

Bestandteile	Volumen
Plasmid-DNA (3.6.2)	0,5 µl
Restriktionsendonuklease (10 U/µl)	0,5 µl
10x Puffer	1 µl
Aqua bidest.	8 µl
Endvolumen	10 µl

3.6.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von PCR-Produkten in einen Klonierungsvektor wurde das pGEM®-T Easy Vector System (Tabelle 3-5) verwendet. Hierfür wurde das PCR-Produkt entweder direkt nach der PCR (Kapitel 3.6.3) oder nach einer Auftrennung mittel Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.6.3) und anschließender Isolierung aus dem Agarosegel (Kapitel 3.6.6) eingesetzt. Die Ligation von einem Insert in einen Expressionsvektor (Tabelle 3-17 und Tabelle 3-18) erfolgte mit der T4 DNA Ligase von Jena Bioscience (Tabelle 3-5). Hierbei wurde nach Möglichkeit ein molares Verhältniss von Insert zu linearisiertem Vektor von 5:1 nach folgender Formel verwendet:

$$Masse\ (Insert)\ [ng] = \frac{5}{1} \times \frac{Masse\ (Vektor)\ [ng]\ \times\ Länge\ (Fragment)\ [bp]}{Länge\ (Vektor)\ [bp]}$$

Reaktionen zur Ligation von DNA-Fragmenten wurden in einem Endvolumen von 10 µl bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Die entsprechenden Ligationsansätze sind in Tabelle 3-29 aufgeführt.

Tabelle 3-29: Ligationsansatz für pGEM®-T Easy (links) bzw. für Expressionsvektoren (rechts)

Bestandteile	Volumen
PCR-Produkt	3,5 µl
pGEM®-T Easy Vector (25 ng)	0,5 µl
T4 DNA Ligase (3 Weiss units)	1 µl
2x Rapid Ligation Buffer	5 µl
Endvolumen	10 µl

Bestandteile	Volumen
Insert	variabel
Vektor	variabel
T4 DNA Ligase (2,5 Weiss units)	1 µl
10x Ligation Buffer	1 µl
Endvolumen	10 µl

Diese Ligationsansätze wurden anschließend zur Transformation von *E. coli* DH5α, XL1-Blue MRF‘ oder XL10-Gold verwendet.

3.6.9 Transformation von *E. coli*

3.6.9.1 Herstellung Ca^{2+}-kompetenter Zellen

Zur Herstellung Ca^{2+}-kompetenter Zellen wurden 4 ml LB-Medium mit Zusatz eines entsprechenden Antibiotikums mit einer *E. coli*-Einzelkolonie inokuliert und bei 37 °C und 220 rpm über Nacht kultiviert. Anschließend wurden wiederum 100 ml LB-Medium mit Zusatz eines entsprechenden Antibiotikums mit 1 % (v/v) inokuliert und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer Absorption von 0,6 kultiviert. Die Kultur wurde dann in einem 50 ml Reaktionsgefäß für 7 Minuten bei 4 °C und 6000 *x g* zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 50 ml eiskalter 0,1 M Calciumchlorid-Lösung (Tabelle 3-11) resuspendiert und anschließend erneut für 7 Minuten bei 4 °C und 6000 *x g* zentrifugiert. Das Pellet wurde wiederum in 50 ml 0,1 M Calciumchlorid-Lösung resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 7 Minuten bei 4 °C und 6000 *x g* wurden die Zellen in 3 ml 0,1 M Calciumchlorid-Lösung mit 15 % Glycerin (Tabelle 3-11) resuspendiert und zu 100 µl und 200 µl aliquotiert. Diese Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.6.9.2 Transformation Ca^{2+}-kompetenter Zellen

Zur Transformation von *E. coli* (Tabelle 3-21) wurden jeweils 100 µl Ca^{2+}-kompetenter Zellen (Kapitel 3.6.9.1) entweder mit 10 µl eines Ligationsansatzes (Kapitel 3.6.8) oder 0,5 µl Plasmid-DNA (Kapitel 3.6.2) vorsichtig gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock für 50 Sekunden bei 42 °C, gefolgt von einer Inkubation für 50 Sekunden auf Eis. Nach Zugabe von 400 µl eiskaltem LB-Medium (Tabelle 3-6) ohne Antibiotikazusatz erfolgte eine Regeneration für 1 Stunde bei 37 °C und 220 rpm. Nach der Zentrifugation der Zellsuspension für 2 Minuten bei 4 °C und 1600 *x g* wurde der größte Teil des Überstandes verworfen und die Zellen vorsichtig im restlichen Überstand resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf ein LB-Festmedium mit Zusatz eines entsprechenden Antibiotikums ausplattiert und bei 37 °C über Nacht kultiviert.

3.6.9.3 Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß-Selektion ermöglichte eine Vorselektion von *E. coli*-Kolonien nach deren Transformation mit pGEM®-T Easy-Ligationsansätzen anhand deren Farbe. Hierfür werden *E. coli* Stämme (z.B. *E. coli* XL1-Blue) verwendet, welche über eine Mutation im *lacZ*-Gen verfügen und so zur Produktion einer funktionsunfähigen ß-Galaktosidase führen. Werden solche *E. coli* Stämme mit Plasmiden transformiert, welche ein *lacZ*-Gen enthalten, führt dies in Anwesenheit von IPTG als künstlicher Induktor des *lac*-Operons zur Komplementierung der ß-Galaktosidase. Diese wiederum

spaltet das farblose X-Gal in Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl, welches anschließend durch Luftsauerstoff zu dem blauen 5,5‘-Dibrom-4,4‘-dichlor-indigo oxidiert wird. Die Multiple Cloning Site des Vektors pGEM®-T Easy befindet sich innerhalb des *lacZ*-Gens. Dies bedeutet, dass die Ligation eines Inserts die Komplementierung der ß-Galaktosidase unterbindet und keine Färbung der Kolonien stattfindet.

Für die Blau-Weiß-Selektion wurde ein LB-Festmedium, mit Zusatz des entsprechenden Antibiotikums, mit 100 µl X-Gal/IPTG-Lösung (Tabelle 3-16) bestrichen und zum Entfernen des DMF für etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur ausgedampft. Die Zellsuspension wurde im Anschluss an die Transformation nach Kapitel 3.6.9.2 auf diesem LB-Festmedium ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Es folgte eine Inkubation bei 4 °C für 2 - 3 Stunden zur Verstärkung der blauen Färbung. Im Anschluss daran wurde aus farblosen Kolonien die Plasmid-DNA isoliert (Kapitel 3.6.2).

3.6.10 DNA-Sequenzierung

Zur Bestätigung der Nukleotidsequenzen wurde die Sequenzierung der Plasmid-DNA bei den beiden Firmen Eurofins MWG (Ebersberg) oder Seqlab (Göttingen) in Auftrag gegeben.

3.6.11 Heterologe Genexpression in *E. coli*

3.6.11.1 Expression der Cyclodipeptidsynthase-Gene

Die Überproduktion von CDPS-Np bzw. deren Mutanten erfolgte in *E. coli* M15-Zellen (Tabelle 3-21), welche das entsprechende Plasmid (Tabelle 3-19) trugen. 50 ml LB-Flüssigmedium wurden mit 1 % (v/v) einer entsprechenden Vorkultur inokuliert und bei 37 °C und 230 rpm im Schüttelinkubator unter Lichtausschluss kultiviert. Die Induktion erfolgte durch die Zugabe von 1 mM IPTG bei einer Absorption der Wellenlänge 600 nm von 0,6 für 16 Stunden.

3.6.11.2 Expression der Cyclodipeptidoxidase-Gene

Die Überproduktion von CDO_A-Np/CDO_B-Np bzw. AlbA/AlbB erfolgte in *E. coli* M15-Zellen (Tabelle 3-21), welche die entsprechenden Plasmide (Tabelle 3-19) trugen. 50 ml LB-Flüssigmedium wurden mit 1 % (v/v) einer entsprechenden Vorkultur inokuliert und bei 37 °C und 230 rpm im Schüttelinkubator unter Lichtausschluss kultiviert. Die Induktion erfolgte durch die Zugabe von 1 mM IPTG bei einer Absorption der Wellenlänge 600 nm von 0,6 für 16 Stunden.

Zur Überproduktion von Ndas_1146/Ndas_1147 wurden *E. coli* SoluBL21-Zellen (Tabelle 3-21) verwendet, welche das entsprechende Plasmid (Tabelle 3-18) trugen. 50 ml LB-Flüssigmedium wurden

mit 1 % (v/v) einer entsprechenden Vorkultur inokuliert und bei 37 °C und 230 rpm im Schüttelinkubator unter Lichtausschluss kultiviert. Die Induktion erfolgte durch die Zugabe von 1 mM IPTG bei einer Absorption der Wellenlänge 600 nm von 0,6 für 16 Stunden.

3.7 Methoden der Biochemie

3.7.1 Gewinnung von Proteinrohextrakten aus *E. coli*

Im Anschluss an die Überproduktion der entsprechenden Proteine in *E. coli* wurden 100 ml der Kulturen bei 4 °C und 6800 *x g* zentrifugiert. Die Zellen wurden in Lysepuffer (1 ml je g Feuchtmasse, Tabelle 3-15) resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C zusätzlich mittels Ultraschall durch den Sonifier 250 (Tabelle 3-3) 6-mal für jeweils 10 Sekunden bei 200-300 W aufgeschlossen. Nach der Zentrifugation für 30 Minuten bei 4 °C und 17000 *x g* wurde der Überstand (lösliche Proteine) von dem Pellet (unlösliche Proteine) abgetrennt und anschließend mittels Nickel-Affinitätschromatographie (Kapitel 3.7.2) aufgearbeitet.

3.7.2 Reinigung von Hexahistidin-Fusionsproteinen mittels Nickel-Affinitätschromatographie

Die Reinigung von His_6-Fusionsproteinen erfolgte mittels Nickel-Affinitätschromatographie nach folgender Methode. Die hierfür verwendeten Lösungen sind in Tabelle 3-15 zu finden. Der in Kapitel 3.7.1 beschriebene Proteinrohextrakt aus 100 ml bzw. 1000 ml Flüssigkultur wurde mit 25 µl bzw. 800 µl Ni-NTA-Agarose (Tabelle 3-4) versetzt und bei 4 °C für mindestens 1 Stunde gerührt. Anschließend wurde das Gemisch auf einen leeren Säulenkörper überführt und der Durchfluss (Durchflussfraktion) verworfen. Es folgten zwei Waschschritte mit jeweils 4 ml bzw. 8 ml Waschpuffer (Waschfraktion). Anschließend wurde das His_6-Fusionsprotein mit 0,5 ml bzw. 2,5 ml Elutionspuffer (Elutionsfraktion) eluiert. Die Elutionsfraktion wurde mittels Sephadex G-25 NAP-5 bzw. PD-10 Säule (Tabelle 3-4) in Lagerungspuffer umgepuffert und anschließend aliquotiert bei -80 °C gelagert.

3.7.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassie-Färbung

Zur Auftrennung und Detektion von Proteinen wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE mit Sammel- und Trenngel unter denaturierenden Bedingungen nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Die hierfür verwendeten Lösungen sind in Tabelle 3-13 aufgeführt. Während als Sammelgel stets ein 4 % Polyacrylamidgel verwendet wurde, variierte das Trenngel zwischen 12 % und 15 %. Zur Vorbereitung der Proben wurden diese mit entsprechenden Mengen des 2x Probenpuffers

versetzt und für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert. Als Größenstandard wurde das Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis oder der Precision Plus Protein™ All Blue Standards (Tabelle 3-5) verwendet. Die SDS-PAGE wurde in einer Mini-PROTEAN® Tetra Cell der Firma Bio-Rad (Tabelle 3-3) bei 180 V durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 16 Stunden in der Färbelösung geschwenkt und anschließend in Entfärbelösung bis zum gewünschten Entfärbungsgrad entfärbt.

3.7.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung des Gesamtproteins wurde nach der Methode von Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 3-16 aufgelistet.

Hierfür wurde die Probe mit Wasser auf 100 µl ergänzt und mit 1 ml 1x Bradford-Lösung gemischt. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Probe mit Hilfe eines UV-Spektrometers bei 595 nm gemessen. Zur Berechnung der Konzentration wurde eine Kalibriergerade mit bovinem Serumalbumin (BSA) erstellt. Hierfür wurden Mengen zwischen 0 µg und 10 µg BSA nach derselben Methode vorbereitet und vermessen.

3.7.5 Western Blot-Analyse

Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE (Kapitel 3.7.3) aufgetrennt und anschließend mit Hilfe eines Criterion™ Blotter (Tabelle 3-3) der Firma Bio-Rad auf eine PVDF-Membran transferiert. Hierfür wurden die in Tabelle 3-14 aufgeführten Lösungen und Puffer verwendet. Das Gel wurde zunächst für 15 Minuten in Towbin-Puffer equilibriert. Die PVDF-Membran wurde für 15 Sekunden mit Methanol benetzt, mit Wasser für 2 Minuten gewaschen und anschließend für mindestens 5 Minuten in Towbin-Puffer equilibriert. Das Gel/Membran Sandwich wurde anschließend von der schwarzen Seite (Kathode) zur roten Seite (Anode) mit einem Fiberpad, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier und einem zweiten Fiberpad gepackt und in die Kammer eingesetzt. Der Transfer erfolgte innerhalb von 45 Minuten bei einer angelegten Spannung von 100 V. Im Anschluss wurde das Gel zur Überprüfung des Transfers mit Coomassie Färbelösung (Kapitel 3.7.3) gefärbt, während die Membran zunächst 3-mal mit je 15 ml TBS-Puffer für 5 Minuten gewaschen wurde. Die Membran wurde für 3 Stunden bei 4 °C in 15 ml Blockierlösung inkubiert. Nach 2-maligem Waschen der Membran mit je 15 ml TBS-T Puffer erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Monoklonaler Maus Anti-His-tag Antikörper, Tabelle 3-5) bei 4 °C für 16 Stunden. Die Membran wurde 8-mal mit je 15 ml TBS-T Puffer gewaschen und anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (Anti-Maus-IgG Alkaline Phosphatase, Tabelle 3-5) inkubiert. Die Membran wurde 5-mal mit je 15 ml TBS-Puffer

gewaschen und im Anschluss für 15 Minuten in Substrat-Puffer equilibriert. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels BCIP und NBT. Hierfür wurde die Membran mit Färbelösung überschichtet und bis zur gewünschten Färbung unter Lichtausschluss inkubiert. Die Reaktion wurde durch Waschen der Membran in Wasser gestoppt und anschließend dokumentiert.

3.7.6 Enzymatische Reaktionsansätze

3.7.6.1 Biotransformation mit Cyclodipeptidoxidasen

Die Biotransformation von cyclischen Dipeptiden durch die Cyclodipeptidoxidasen CDO_A-Np/CDO_B-Np bzw. AlbA/AlbB erfolgte in *E. coli* M15-Zellen (Tabelle 3-21), welche die Plasmide pKB81 bzw. pKB90 (Tabelle 3-19) trugen. Zur Biotransformation durch Ndas_1146/Ndas_1147 wurden *E. coli* SoluBL21-Zellen (Tabelle 3-21) verwendet, welche das Plasmid Ndas_1146-1147-EcoRI-HindIII-pACYC (Tabelle 3-18) trugen.

Zunächst wurden jeweils 100 ml LB-Flüssigmedium mit 1 % (v/v) einer entsprechenden Vorkultur inokuliert und bei 37 °C und 230 rpm im Schüttelinkubator unter Lichtausschluss kultiviert. Die Induktion erfolgte durch die Zugabe von 1 mM IPTG bei einer Absorption der Wellenlänge 600 nm von 0,6. Nach einer Kultivierung von 2 Stunden wurde die Kultur zu jeweils 3 ml aliquotiert und jeweils mit 0,1 mM Substrat versetzt. Die Biotransformation erfolgte anschließend für weitere 15 Stunden bei 37 °C und 230 rpm im Schüttelinkubator unter Lichtausschluss. Zur Untersuchung der Biotransformation wurden im Anschluss jeweils 1 ml der Kulturen mit Ethylacetat extrahiert, zur Trockene einrotiert und in 40 µl Methanol wiederaufgenommen.

Um die Produkte der Biotransformation untersuchen zu können, ohne eine anschließende Extraktion zu erfordern, wurden die Cyclodipeptidoxidasen zunächst nach Kapitel 3.6.11.2 überproduziert. Im Anschluss daran wurden jeweils 100 µl der Kulturen mit 1 mM Substrat versetzt und im Schüttelinkubator (Thermomixer C von Eppendorf) bei 37 °C und 1000 rpm unter Lichtausschluss für 6 Stunden inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 Volumenteil Methanol abgestoppt und anschließend mittels LC-MS analysiert.

3.8 Isolierung von Sekundärstoffen

3.8.1 Extraktion der Kulturen von *E. coli*

Jeweils 1 ml Flüssigkultur von *E. coli* wurde 3-mal mit jeweils einem Volumenanteil Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde jeweils abgenommen, vereinigt und mittels SpeedVac zur Trockene eingeengt. Anschließend wurde der Rückstand gegebenenfalls in 1 ml einer 50 % Methanol-Lösung wiederaufgenommen und erneut mittels SpeedVac zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde in jeweils 40 µl Methanol rückgelöst.

3.9 Instrumentelle Analytik niedermolekularer Substanzen

3.9.1 Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS)

Zur Analyse der Extrakte bzw. der enzymatischen Produkte wurden diese zunächst mittels HPLC aufgetrennt. Hierfür wurde eine Agilent 1260 series (Tabelle 3-3) verwendet. Die Proben wurden zuvor für 20 Minuten bei 17000 *x g* zentrifugiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte durch eine Multospher 120 RP 18 - 5 µm (250 x 2 mm) (Tabelle 3-3) bei einer Flussrate von 0,25 ml/min. Als Elutionsmittel wurden Aqua bidest. (A) und Acetonitril (B) jeweils mit Zusatz von 0,1 % Ameisensäure verwendet. Es wurde ein Gradient von 5 % B auf 100 % B in 40 min bei 20 °C erzeugt. Die Detektion erfolgte mit einem Photodioden-Array-Detektor in einem Wellenlängenbereich von 190 bis 400 nm. Diese Anlage war mit dem Massenspektrometer micrOTOF-Q III mit ESI-Source (Tabelle 3-3) der Firma Bruker Daltonics gekoppelt. Die Moleküle in den Proben wurden bei einer Spannung von 4,5 kV positiv ionisiert und bei einer Kollisionsenergie von 8.0 eV fragmentiert. Zur Kalibrierung mit internem Standard wurde Natriumformiat verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Cyclodipeptidsynthase CDPS-Np aus *Nocardiopsis prasina NRRL B-16235*

4.1.1 Einleitung

Die putative tRNA-abhängige Cyclodipeptidsynthase WP_017544375.1 (CDPS-Np) aus *Nocardiopsis prasina* NRRL B-1623 wurde zu Beginn dieser Arbeit durch eine BLAST-Analyse entdeckt. Die zu dieser Zeit in der NCBI Datenbank als hypothetisches Protein annotierte CDPS-Np zeigt eine Identität von 54 % auf Aminosäuren-Ebene zu der bereits charakterisierten Cyclodipeptidsynthase Ndas_1148 (WP_013152196.1) aus *Nocardiopsis dassonvillei subsp. dassonvillei* DSM 43111 (Giessen *et al.*, 2013b). Das Gen *CDPS-Np* besteht aus 729 bp und das daraus resultierende Protein umfasst 242 Aminosäuren mit einer berechneten Masse von 26,8 kDa. In unmittelbarer Nähe zu diesem Gen befinden sich vier weitere Gene, welche über vergleichsweise hohe Sequenzidentitäten gegenüber den entsprechenden Homologen aus *N. dassonvillei subsp. dassonvillei* DSM 43111 verfügen (Abbildung 4-1).

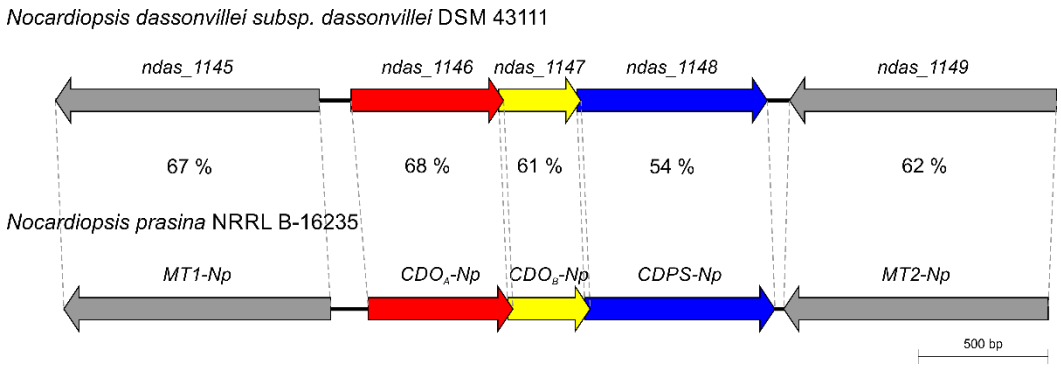


Abbildung 4-1: Struktureller Vergleich der biosynthetischen Gencluster in N. dassonvillei subsp. dassonvillei DSM 43111 und N. prasina NRRL B-16235.

Die putativen Methyltransferasen WP_017544372.1 (MT1-Np) und WP_017544376.1 (MT2-Np) besitzen Identitäten von 67 % und 62 % zu den beiden Methyltransferasen Ndas_1145 und Ndas_1149. Die beiden Proteine Ndas_1146 und Ndas_1147 fungieren zusammen als eine Cyclodipeptidoxidase. WP_017544373.1 (CDO_A-Np) verfügt über eine Identität auf Aminosäuren-Ebene von 68 % zu Ndas_1146, während die Identität von WP_017544374.1 (CDO_B-Np) und Ndas_1147 61 % beträgt. Dieses Gencluster aus *N. prasina* NRRL B-1623 ist auf dem Contig NZ_ANAE01000117 im Bereich von bp 30006 und bp 33839 lokalisiert (Tabelle 4-1).

.

Tabelle 4-1: Lokalisation des CDPS-Gens und angrenzende Gene auf dem Contig NZ_ANAE01000117 von N. prasina NRRL B-16235 (Stand: Januar 2014)

NCBI accession number	Protein	Lokalisation [bp]	Größe [aa]	putative Funktion
WP_017544372.1	MT1-Np	30006-31055	349	S-adenosylmethionin-abhängige Methyltransferase
WP_017544373.1	CDO_A-Np	31180-31737	185	CDO, Untereinheit A
WP_017544374.1	CDO_B-Np	31730-32035	101	CDO, Untereinheit B
WP_017544375.1	CDPS-Np	32019-32747	242	CDPS
WP_017544376.1	MT2-Np	32781-33839	352	S-adenosylmethionin-abhängige Methyltransferase

Analysen zu den Motiven der Bindetaschen P1 und P2 der CDPSs waren zu Beginn dieser Arbeit noch nicht bekannt. Daher wurde zunächst lediglich die gesamte Sequenzidentität zwischen verschiedenen CDPSs betrachtet (Jacques *et al.*, 2015). Die Sequenzidentitäten der unterschiedlichen Cyclodipeptidsynthasen untereinander lassen nicht unbedingt einen Rückschluss auf deren Produkte zu. WP_014141671.1 und WP_014140974.1 aus *Streptomyces cattleya* teilen lediglich eine Identität von 35 % auf Aminosäureebene, obwohl beide das cyclische Dipeptid *cyclo*(Trp-Trp) synthetisieren (Jacques *et al.*, 2015). Zwischen WP_014140974.1 aus *S. cattleya* und WP_015033069.1 aus *S. venezuelae* (Jacques *et al.*, 2015) besteht eine Identität von 32 %, obwohl WP_015033069.1 kein *cyclo*(Trp-Trp) sondern *cyclo*(Tyr-Tyr) produziert. Die Identität zwischen AlbC aus *S. noursei*, welche insbesondere phenylalanin-haltige cyclische Dipeptide unter anderem *cyclo*(Phe-Leu), *cyclo*(Phe-Phe), *cyclo*(Phe-Tyr) und *cyclo*(Phe-Met) bildet (Belin *et al.*, 2012), und WP_014140974.1 aus *S. cattleya* beträgt 27 %.

Betrachtet man hingegen Cyclodipeptidsynthasen, welche insbesondere phenylalanin-haltige cyclische Dipeptide produzieren, ergeben sich etwas höhere Übereinstimmungen. Die Aminosäuresequenz von AlbC aus *S. noursei* ist zu 71 % identisch mit WP_016572571.1 aus *S. albulus* CCRC 11814 (Jacques *et al.*, 2015), wobei WP_016572571.1 mit *cyclo*(Phe-Leu), *cyclo*(Phe-Phe), *cyclo*(Phe-Tyr) und *cyclo*(Phe-Met) dieselben Produkte wie AlbC bildet. Die Sequenzidentität von 54 % zwischen CDPS-Np und Ndas_1148, welche die Hauptprodukte *cyclo*(Phe-Tyr), *cyclo*(Phe-Phe) und *cyclo*(Phe-Leu), sowie die Nebenprodukte *cyclo*(Phe-Met), *cyclo*(Phe-Ala), *cyclo*(Tyr-Tyr) und *cyclo*(Tyr-Leu) bildet (Giessen *et al.*, 2013b), erscheint in diesem Zusammenhang wiederum relativ niedrig. Aufgrund der Sequenzidentitäten zu bereits charakterisierten CDPSs (Tabelle 4-2) liegt es nahe, dass CDPS-Np phenylalanin-haltige cyclische Dipeptide bilden könnte. Da aus der Identität in der Aminosäuresequenz der CDPSs untereinander jedoch keine zuverlässigen Schlüsse auf deren Produktbildung gezogen werden können, sollte die Funktion der CDPS-Np experimentell bewiesen werden.

Tabelle 4-2: Übersicht über Identitäten auf Aminosäureebene zwischen unterschiedlichen CDPSs und CDPS-Np aus N. prasina.

Organismus	Protein	produzierte cyclische Dipeptide	Identität [%]	Referenz
***N. alba* ATCC BAA-2165**	WP_014911318.1	cFL, cYL	55	(Li *et al.*, 2014)
N. dassonvillei subsp. dassonvillei DSM 43111	Ndas_1148	cFY, cFF, cFL, cFM, cFA, cYY, cYL	54	(Giessen *et al.*, 2013b)
S. noursei	AlbC	cFL, cFF, cFY, cFM	37	(Belin *et al.*, 2012)
S. venezuelae	WP_015033069.1	cYY	34	(Jacques *et al.*, 2015)
A. mirum	Amir_4627	cWW	30	(Giessen *et al.*, 2013a)
S. cattleya	WP_014141671.1	cWW	29	(Jacques *et al.*, 2015)
***S. albulus* CCRC 11814**	WP_016572571.1	cFL, cFF, cFY, cFM	28	(Jacques *et al.*, 2015)
M. tuberculosis	WP_003411681.1	cYY, cYF	28	(Belin *et al.*, 2012)
S. cattleya	WP_014140974.1	cWW	26	(Jacques *et al.*, 2015)
B. subtilis subsp. subtilis	WP_003242712.1	cLL, cLF, cLM	22	(Belin *et al.*, 2012)

4.1.2 Amplifikation und Klonierung von *CDPS-Np* aus genomischer DNA von *N. prasina* B-16235 zur Expression in *E. coli*

Das Gen, welches das Protein CDPS-Np kodiert (NCBI accession number WP_017544375.1), wurde mit Hilfe der Oligonukleotide Np002-for und Np002-rev mittels PCR aus genomischer DNA von *N. prasina* NRRL B-16235 amplifiziert. Die PCR erfolgte mit der High Fidelity Polymerase mit einer Anlagerungstemperatur von 55 °C und einer Elongationszeit von 1 Minute (Kapitel 3.6.3). In Abbildung 4-2 ist das entsprechende PCR-Produkt dargestellt.

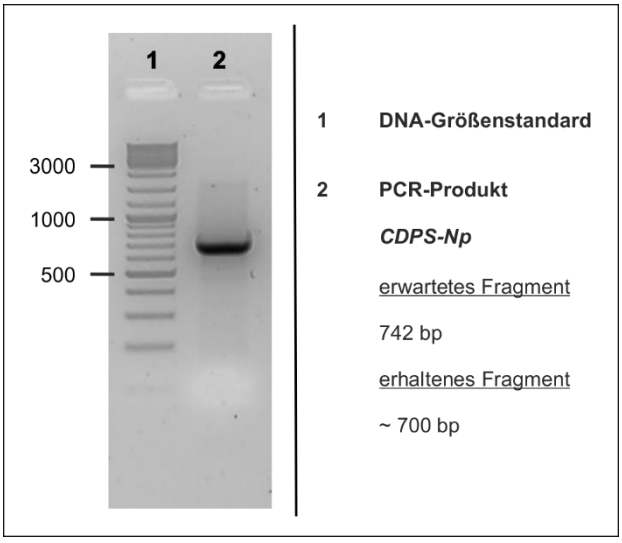


Abbildung 4-2: 1 %iges Agarosegele der Amplifikation von CDPS-Np mittels PCR aus gDNA von N. prasina NRRL B-16235.

Das PCR-Produkt wurde mittels TA-Klonierung in den Klonierungsvektor pGEM®-T Easy ligiert und anschließend mittels Hitzeschock in *E. coli* XL10-Gold eingebracht. Auf Grund der Blau-Weiß-Selektion wurden einige Kolonien kultiviert und im Anschluss deren Plasmide isoliert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Ligation des Inserts in den Vektor erfolgte eine Restriktion mit EcoRI. Nach der

Auftrennung der erhaltenen DNA-Fragmente mittels Elektrophorese entsprachen die Fragmente des Plasmides pKB20 (Abbildung 4-3, A) den erwarteten Fragmentgrößen von 762 und 2997 bp (Abbildung 4-3, B). Zur Bestätigung der gewünschten Sequenz wurde die Sequenzierung von pKB20 in Auftrag gegeben. In der anschließenden Überprüfung der Sequenzierungsergebnisse zeigte sich im Vergleich zu der bei NCBI hinterlegten Sequenz eine vermeintliche Mutation (G221T). Diese bewirkt in der entsprechenden Aminosäuresequenz eine Mutation in Position 74 von Cystein zu Phenylalanin. Da in weiteren sieben Plasmiden dieselbe vermeintliche Mutation auftrat und zusätzlich unterschiedliche CDPSs in der entsprechenden Position ein Phenylalanin besitzen (Abbildung 4-8, A), ist von keiner tatsächlichen Mutation auszugehen.

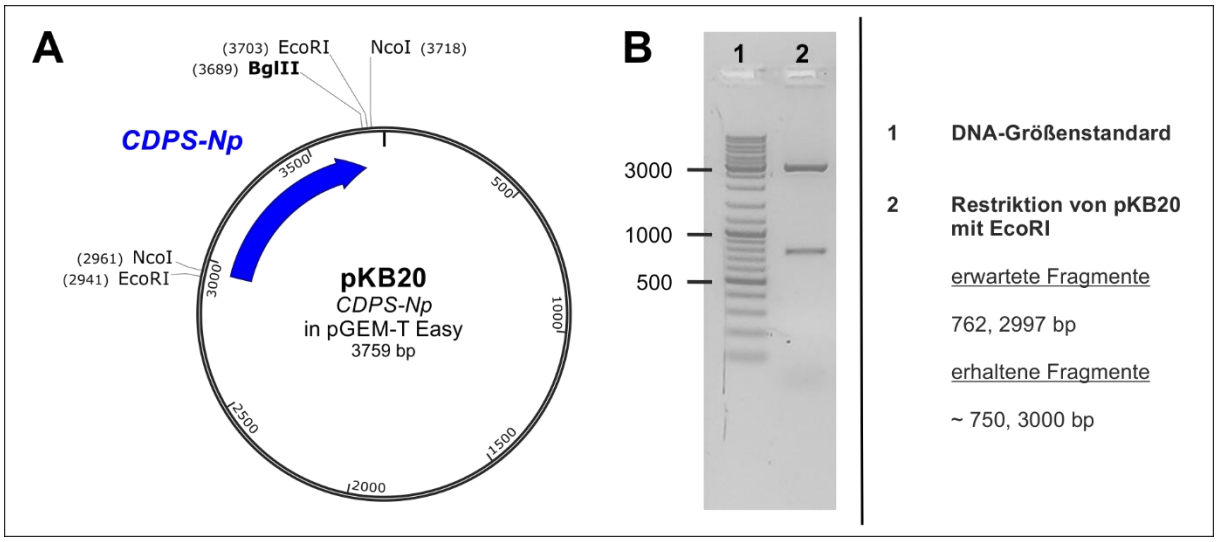


Abbildung 4-3: A: Plasmidkarte von pKB20 (CDPS-Np in pGEM®-T Easy). B: 1,5 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB20 mit EcoRI.

Anschließend wurden pKB20 und pQE-60 mit NcoI und BglII geschnitten. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden mittels Elektrophorese aufgetrennt und die jeweils gewünschten DNA-Fragmente aus den Agarosegelen isoliert und anschließend ligiert. Nach der Transformation von *E. coli* XL10-Gold wurden mehrere Kolonien kultiviert und deren Plasmide isoliert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Ligation wurden eine Restriktion mit NcoI und BglII sowie eine Elektrophorese zur Trennung der erhaltenen DNA-Fragmente durchgeführt. Die DNA-Fragmente des Plasmides pKB25 (Abbildung 4-4, A) entsprachen den erwarteten Fragment-Größen von 728 und 3417 bp (Abbildung 4-4, B). Die erwartete Sequenz des Inserts konnte anschließend durch eine Sequenzierung bestätigt werden.

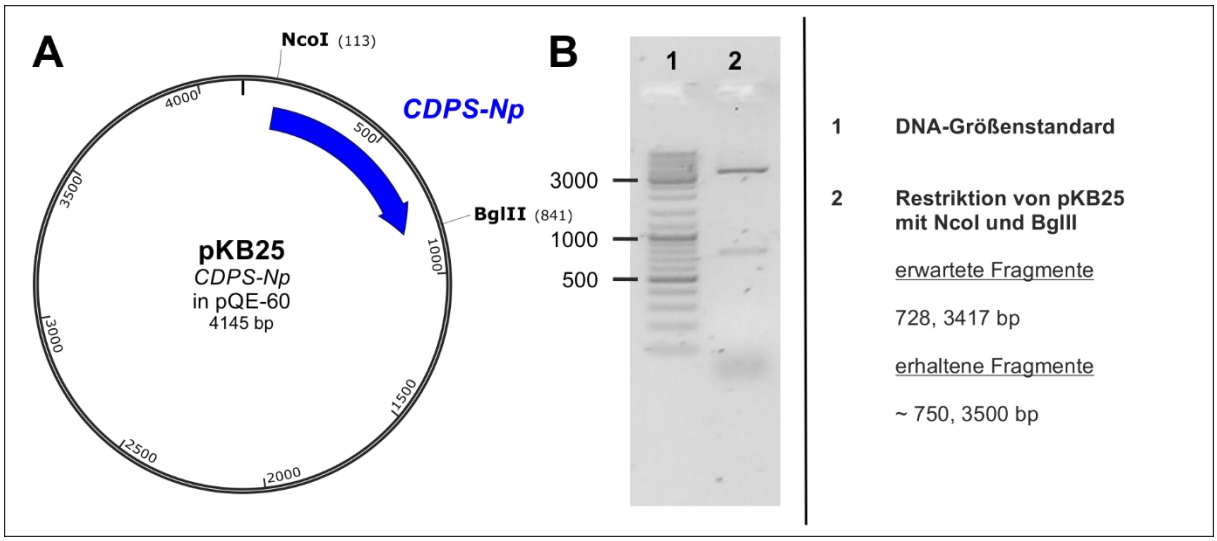


Abbildung 4-4: A: Plasmidkarte von pKB25 (CDPS-Np in pQE-60). B: 1,5 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB25 mit NcoI und BglII.

4.1.3 Identifizierung der enzymatischen Produkte von CDPS-Np-His_6

Um die Produktbildung von CDPS-Np zu untersuchen, wurde das Plasmid pKB25 in *E. coli* M15 [pREP4] eingebracht. Die Überproduktion von CDPS-Np-His_6 wurde in LB-Medium bei 37 °C mit 1 mM IPTG für 16 Stunden induziert (Kapitel 3.6.11.1). Die Kultur wurde mit Ethylacetat extrahiert (Kapitel 3.8.1) und anschließend mittels LC-MS analysiert (Kapitel 3.9.1). Als Kontrolle wurden *E. coli* M15 [pREP4]-Zellen, welche den leeren Vektor pQE-60 enthielten, analog kultiviert und entsprechend behandelt.

Im Vergleich zur Kontrolle, konnten im HPLC-Chromatogramm des Extraktes von CDPS-Np zwei zusätzliche Peaks identifiziert werden (Abbildung 4-5). Peak **1** mit einer Retentionszeit von 9,7 min weißt ein $[M+H]^+$-Ion von m/z = 327,1321 auf, welches mit einer Abweichung von 5,5 ppm gut mit dem berechneten $[M+H]^+$-Ion von *cyclo*(L-Tyr-L-Tyr) von m/z = 327,1339 übereinstimmt. Der zweite Peak wurde bei einer Retentionszeit von 15,5 min eluiert und deutet mit einem $[M+H]^+$-Ion von m/z = 311,1399 mit einer Abweichung von -2,8 ppm auf die Präsenz von *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) mit einem berechneten $[M+H]^+$-Ion von m/z = 311,1390 hin (Abbildung 4-5).

Bei der Analyse der Fragmentierung des protonierten Produktes **1** (Abbildung 4-6, A und B) konnten Fragmente mit m/z = 327,1317 ($[M+H]^+$), 299,1370 ($[M+H-CO]^+$), 282,1116 ($[M+H-HCONH_2]^+$) 254,1168 ($[M+H-CO-HCONH_2]^+$) 221,0904 ($[M+H-Substituent]^+$) und 136,0748 ($[M+H-CO-Rest]^+$) im Vergleich zu einem Standard zugeordnet werden (Guo *et al.*, 2009). Das Produkt **1** konnte so als *cyclo*(L-Tyr-L-Tyr) identifiziert werden. Die Fragmentierung des Produktes **2** (Abbildung 4-7, C und D) ergaben Fragmente mit m/z = 311,1378 ($[M+H]^+$), 283,1430 ($[M+H-CO]^+$), 238,1216 ($[M+H-CO-HCONH_2]^+$), 205,0967 ($[M+H-Substituent]^+$), 136,0745 ($[M+H-CO-Rest]^+$) und 120,0790 ($[M+H-CO-Rest]^+$). Im Vergleich zu einem

Standard konnte Produkt **2** als *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) identifiziert werden. CDPS-Np produziert in *E. coli* 0,19 mg/l **1** und 1,29 mg/l **2** im Verhältnis 1:6,8.

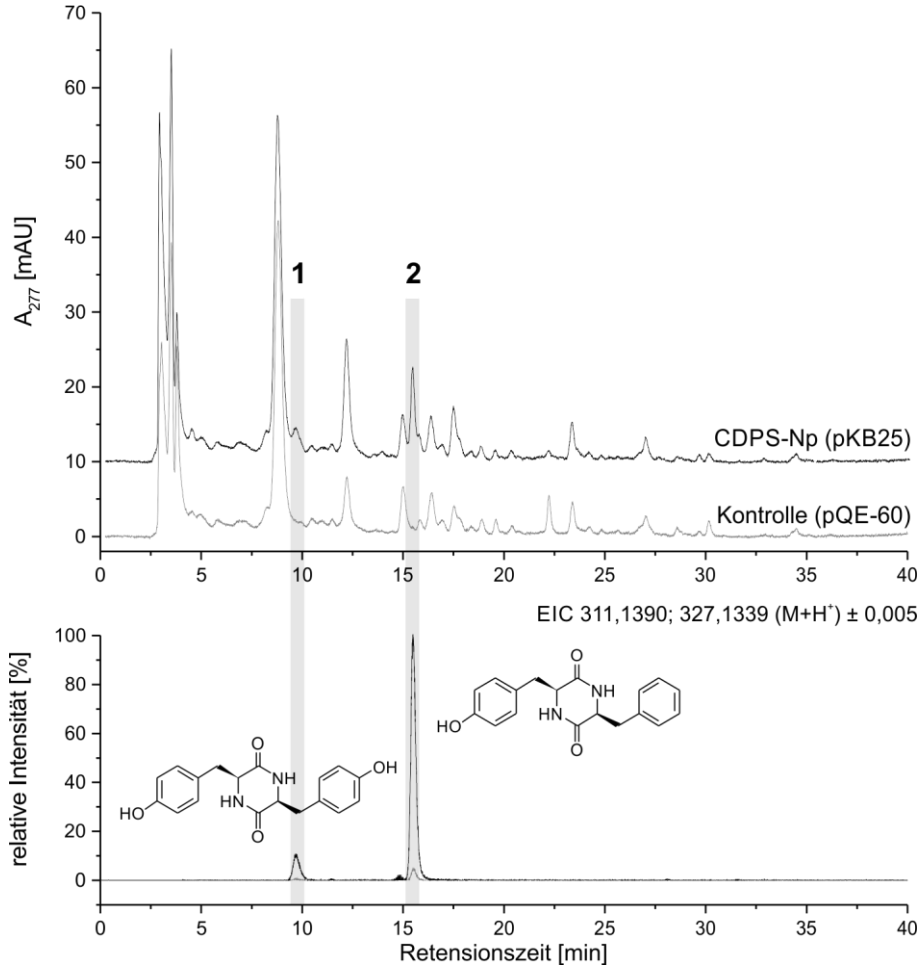


Abbildung 4-5: LC-MS Analyse. Bildung von cyclo*(L-Tyr-L-Tyr) (1) und* cyclo*(L-Tyr-L-Phe) (2) durch CDPS-Np. Dargestellt sind die HPLC-Chromatogramme und die positiven extracted ion chromatograms (EICs) von m/z = 327,1339 ± 0,005 ($[M+H]^+$ von 1) und 311,1390 ±0,005 ($[M+H]^+$ von 2) im Vergleich zur Kontrolle mit pQE-60.*

Zusätzlich zu diesen beiden Produkten konnten in den extrahierten Ionenchromatogrammen (EICs) zwei weitere Produkte **3** und **4** beobachtet werden (Abbildung 4-11). Das Produkt **3** besitzt ein $[M+H]^+$-Ion von m/z = 295,1082, welches mit einer Abweichung von 9,7 ppm zu dem berechneten $[M+H]^+$-Ion von *cyclo*(L-Tyr-L-Met) von m/z = 295,1111 hinweist. Das Produkt **4** deutet mit einem $[M+H]^+$-Ion von m/z = 277.1535 und einer Abweichung von 4,1 ppm zu dem berechneten $[M+H]^+$-Ion von m/z = 277,1547 auf die Bildung von *cyclo*(L-Tyr-L-Leu) oder *cyclo*(L-Tyr-L-Ile) hin. Da die beiden Produkte **3** und **4** im HPLC-Chromatogramm nicht zu erkennen sind und keine Standards zur Verfügung stehen, ist hier keine Quantifizierung dieser Produkte möglich.

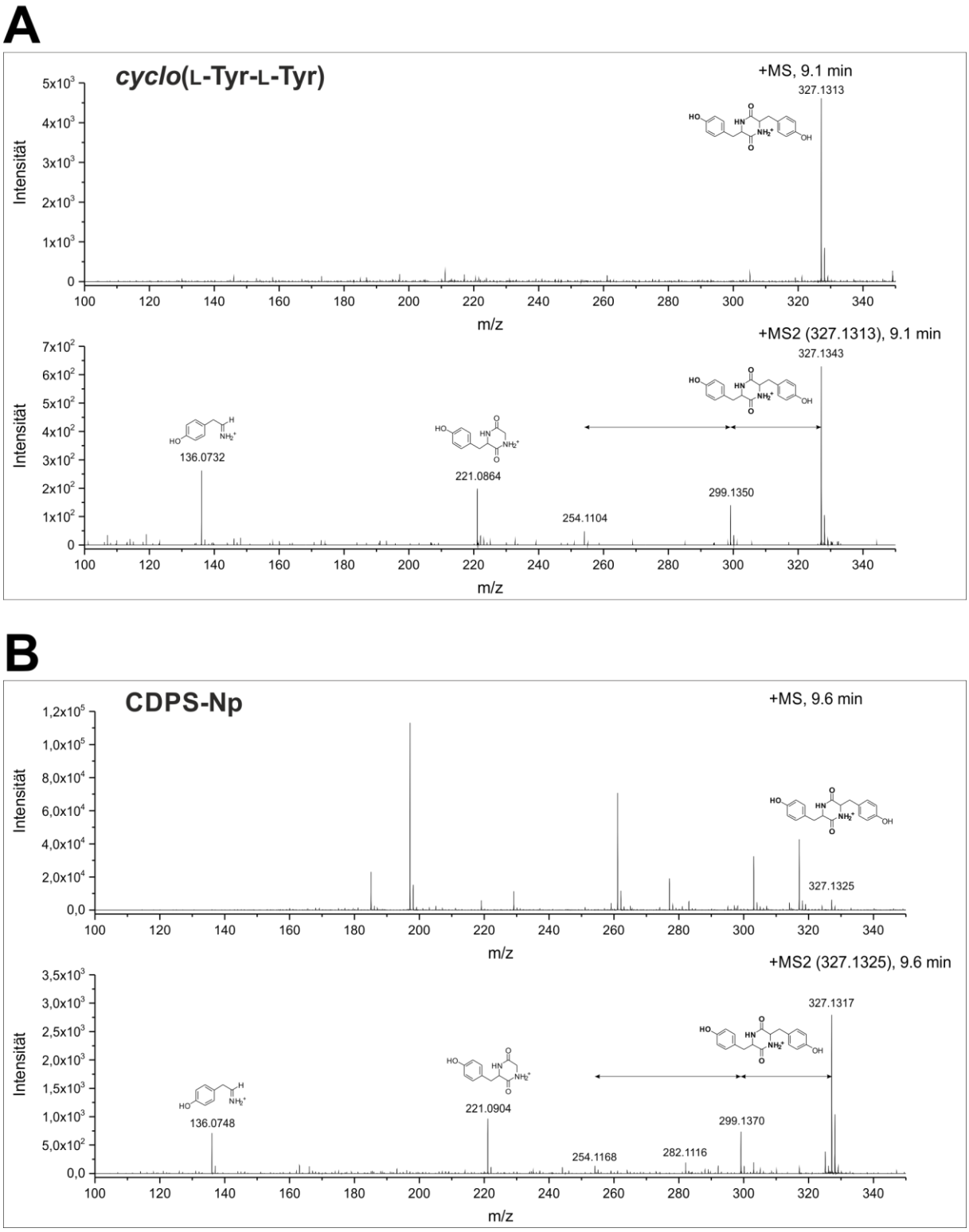
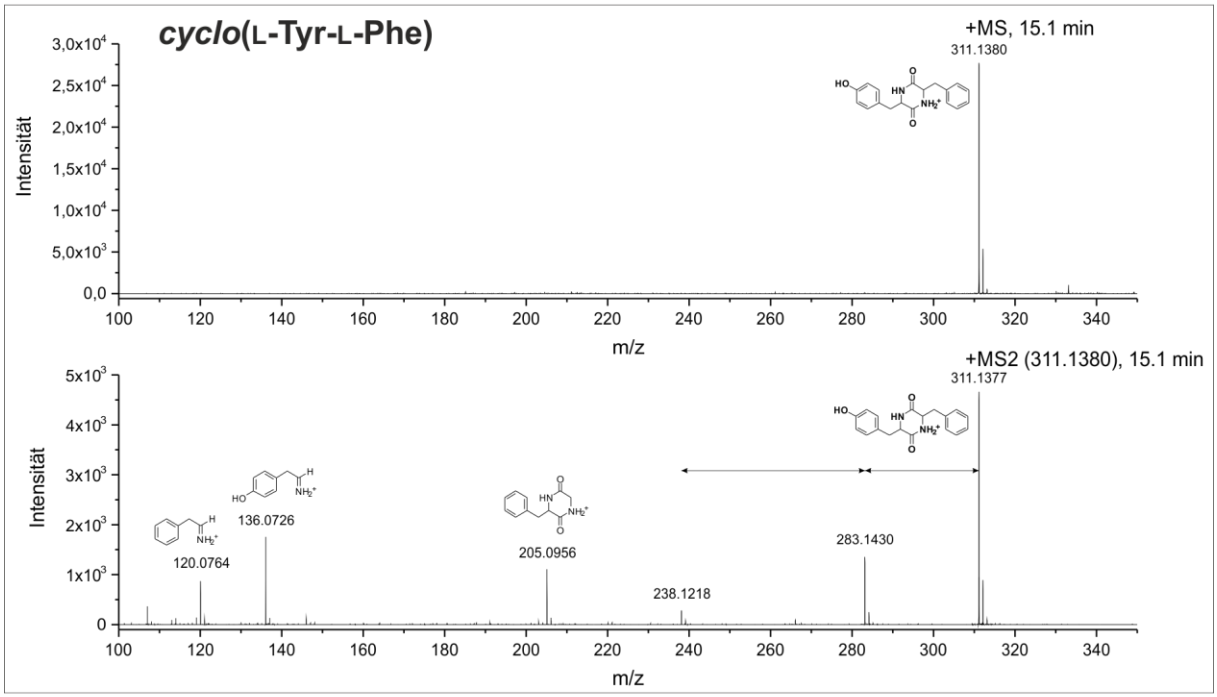


Abbildung 4-6: MS² Analyse von cyclo(L-Tyr-L-Tyr). A: Standard von cyclo(L-Tyr-L-Tyr). B: cyclo(L-Tyr-L-Tyr) aus der Kultur mit CDPS-Np.

C



D

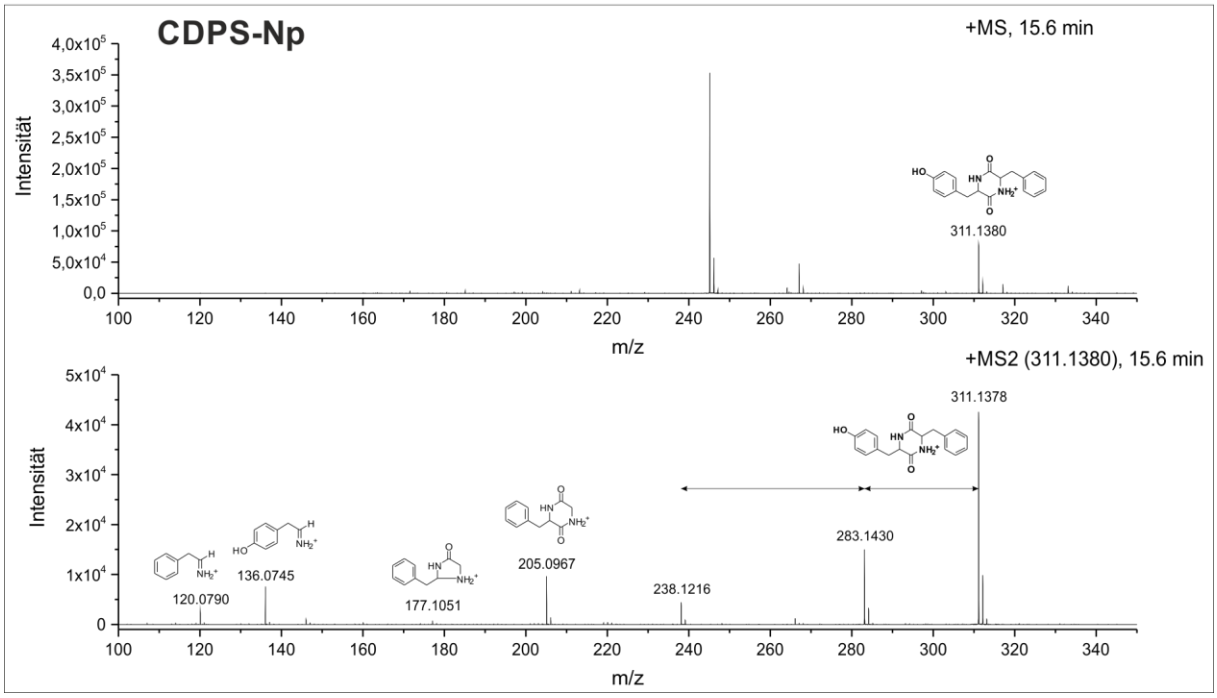


Abbildung 4-7: MS² Analyse von cyclo(L-Tyr-L-Phe). C: Standard von cyclo(L-Tyr-L-Phe). D: cyclo(L-Tyr-L-Phe) aus der Kultur mit CDPS-Np.

4.1.4 Vergleich der aktiven Zentren von ausgewählten Cyclodipeptidsynthasen

Die Cyclodipeptidsynthase CDPS-Np aus *N. prasina* NRRL B-16235 produziert *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) als Hauptprodukt sowie *cyclo*(L-Tyr-L-Tyr), *cyclo*(L-Tyr-L-Met) und *cyclo*(L-Tyr-L-Leu) oder *cyclo*(L-Tyr-L-Ile) als Nebenprodukte. Trotz der relativ hohen Identität auf Aminosäureebene von 54 und 37 % zu Ndas_1148 und AlbC (Kapitel 4.1.1) konnte CDPS-Np entgegen der vorherigen Vermutung als tyrosin-spezifische Cyclodipeptidsynthase identifiziert werden. Die Aminosäuresequenz von CDPS-Np ist jedoch lediglich zu 34 % identisch zu der CDPS WP_015033069.1 aus *S. venezuelae*, welche ebenso *cyclo*(L-Tyr-L-Tyr) synthetisiert (Jacques *et al.*, 2015). Die Identität zu WP_003411681.1 aus *M. tuberculosis*, welche *cyclo*(L-Tyr-L-Tyr) und *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) bildet (Belin *et al.*, 2012), beträgt sogar nur 28 %. Es stellt sich jedoch die Frage, ob diese geringe Übereinstimmung an den unterschiedlichen Organismen liegt. Leider ist bisher, außer CDPS-Np, keine weitere tyrosin-spezifische CDPS aus *Nocardiopsis* bekannt.

Im Jahre 2015 wurden 51 CDPSs systematisch von der Gruppe um Muriel Gondry und Pascal Belin untersucht (Jacques *et al.*, 2015). Demnach können Cyclodipeptidsynthasen nun in die zwei Subfamilien NYH und XYP unterteilt werden (Jacques *et al.*, 2015). Die Unterteilung in diese beiden Subfamilien erfolgt maßgeblich anhand des Auftretens von den Aminosäuren X_{40}, Y_{202} und X_{203} (AlbC Nummerierung). Aus der Untersuchung der Aminosäuresequenz von CDPS-Np im Vergleich zu AlbC ergeben sich die Aminosäuren N_{55}, Y_{213} und H_{214} (CDPS-Np Nummerierung). CDPS-Np gehört somit, wie AlbC und Ndas_1148, zu der NYH Subfamilie (Abbildung 4-8).

Basierend auf Kristallstrukturen und Mutagenese-Experimenten wurde weitergehend postuliert, dass CDPSs in ihrem aktiven Zentrum aus zwei Bindetaschen P1 und P2 bestehen, welche jeweils durch ihre definierten Aminosäure-Motive für die Bindung der beiden Aminoacyl-tRNAs verantwortlich sind (Jacques *et al.*, 2015; Moutiez *et al.*, 2014a; Moutiez *et al.*, 2014b). Es wurde postuliert, dass die Bindetasche P1 spezifisch für die Bindung der ersten Aminoacyl-tRNA zuständig ist und dass diese sozusagen die Spezifität der CDPS bestimmt (Moutiez *et al.*, 2014b). Die etwas weitere Bindetasche P2 dagegen soll weniger spezifisch und die oft variablere zweite Aminoacyl-tRNA binden (Moutiez *et al.*, 2014a). Es konnte bereits gezeigt werden, dass sogar kleine Unterschiede innerhalb der Bindetasche P1 zur Bindung von unterschiedlichen Substraten führen kann (Jacques *et al.*, 2015). Die Aminosäure-Motive der Bindetasche P1 von Rv2275 aus *M. tuberculosis* und Amir_4627 aus *A. mirum* unterscheiden sich lediglich in zwei Aminosäuren, synthetisieren jedoch mit *cyclo*(Tyr-Tyr) und *cyclo*(Trp-Trp) unterschiedliche Produkte (Belin *et al.*, 2012; Giessen *et al.*, 2013a). In einer vorherigen Studie konnte gezeigt werden, dass durch die zielgerichtete Mutation L200N innerhalb von P1 von AlbC ein Shift von *cyclo*(Phe-Leu) zu *cyclo*(Tyr-Leu) erreicht werden kann (Sauguet *et al.*, 2011).

Die entsprechenden Aminosäuren von CDPS-Np innerhalb der Bindetaschen P1 (L_{48} G_{50} L_{80} T_{82} L_{134} Y_{196} L_{197} C_{211}) und P2 (H_{167} Q_{170} I_{171} G_{174} E_{215} L_{217} P_{218}) wurden im Vergleich zu AlbC analysiert (Anhang, Tabelle 7-3). In Anlehnung an das Aminosäure-Motiv in P1 wurde CDPS-Np als phenylalanin-spezifische CDPS vorhergesagt (Jacques *et al.*, 2015). Da diese CDPS im Rahmen dieser Arbeit jedoch als tyrosin-spezifische CDPS identifiziert werden konnte, wurde die Bindetasche P1 etwas genauer betrachtet.

Im Vergleich der aktiven Zentren von verschiedenen Cyclodipeptidsynthasen zog zunächst die Position Y_{196} in der Bindetasche P1 seine Aufmerksamkeit auf sich. Diese Position schien verdächtig an der Bindung von tyrosyl-tRNA involviert zu sein. Während AlbC und Ndas_1148 in ihren korrespondierenden Positionen ein Leucin besitzen (Anhang, Tabelle 7-3), ist in weiteren CDPSs aus unterschiedlichen *Nocardiopsis* Stämmen mit teilweise unbekannter Produktbildung in dieser Position ein Phenylalanin zu finden (Abbildung 4-8). CDPS-Np ist die einzige analysierte CDPS, welche in dieser Position ein Tyrosin enthält.

Eine weitere interessante Position stellt T_{82} dar. In der korrespondierenden Position von AlbC (V_{67}) und Ndas_1148 (L_{71}) befindet sich im Gegensatz zu CDPS-Np jeweils eine hydrophobe Aminosäure (Anhang, Tabelle 7-3). In weiteren putativen CDPSs aus *Nocardiopsis*-Stämmen mit teilweise unbekannter Produktbildung ist in dieser Position entweder ein Threonin oder ein Alanin zu finden.

Es stellte sich so die Frage, welchen Einfluss diese Aminosäuren auf die Substratbindung besitzen und ob die Substratspezifität von CDPS-Np wirklich durch zielgerichtete Mutationen verändert werden kann.

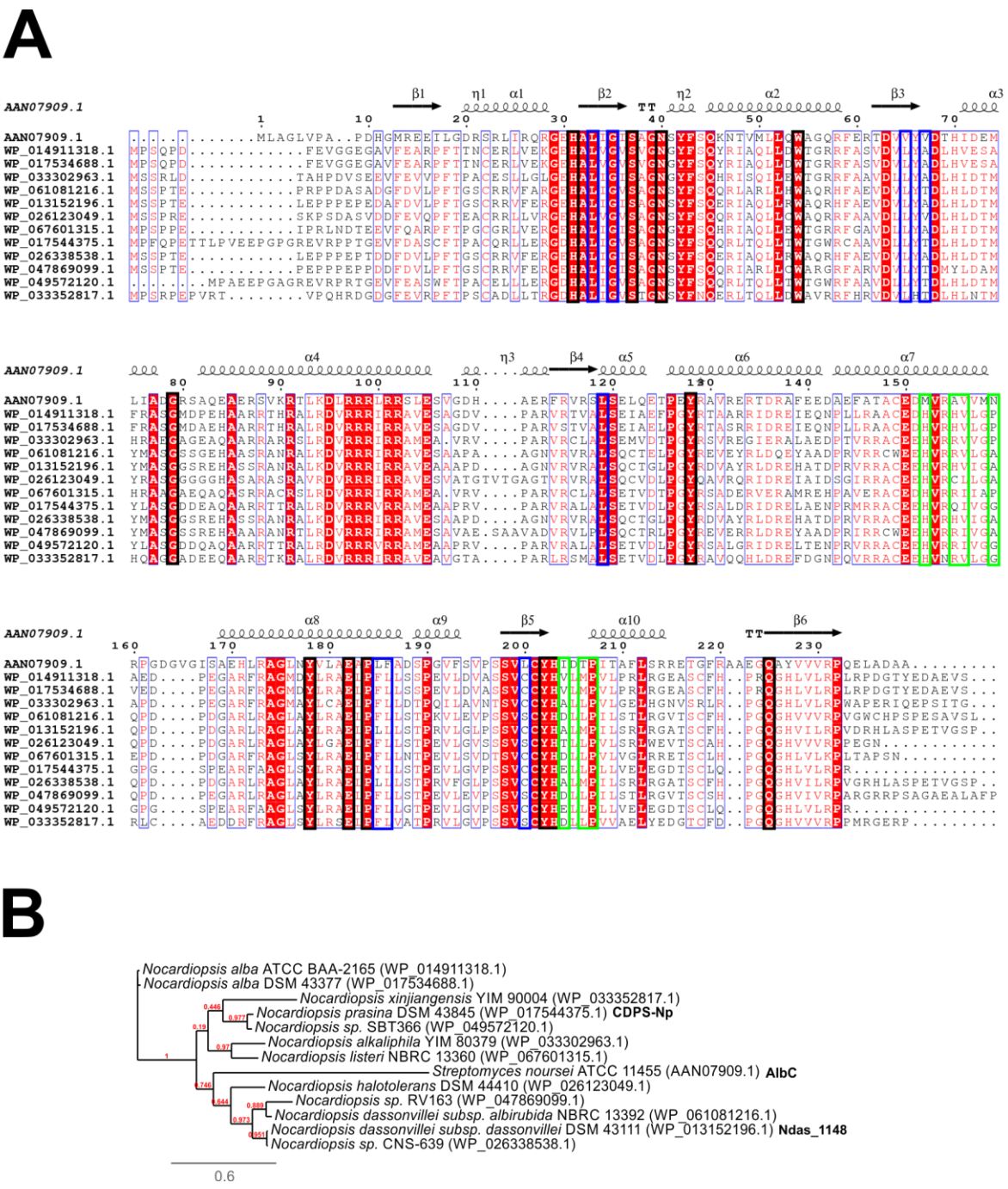


Abbildung 4-8: Analyse von ausgewählten CDPSs aus der NYH Superfamilie. Die dargestellten CDPSs kommen aus Streptomyces noursei ATCC 11455 (AAN07909.1) und unterschiedlichen Nocardiopsis Stämmen: WP_014911318.1: N. alba ATCC BAA-2165; WP_017534688.1: N. alba DSM 43377; WP_033302963.1: N. alkaliphila YIM 80379; WP_061081216.1: N. dassonvillei subsp. albirubida NBRC 13392; WP_013152196.1: N. dassonvillei subsp. dassonvillei DSM 43111; WP_026123049.1: N. halotolerans DSM 44410; WP_067601315.1: N. listeri NBRC 13360; WP_017544375.1: N. prasina DSM 43845; WP_026338538.1: N. sp. CNS-639; WP_047869099.1: N. sp. RV163, WP_049572120.1: N. sp. SBT366; WP_033352817.1: N. xinjiangensis YIM 90004. A: Multiple Sequence Alignment. Aminosäuren, welche auf die Zugehörigkeit zu der NYH Superfamilie hindeuten, sind in schwarz eingerahmt. Aminosäuren, welche zu der Bindetasche P1 bzw. P2 gehören, sind in blau bzw. grün eingerahmt. B: Phylogenetische Analyse.

4.1.5 Analysen zur zielgerichteten Mutagenese der Bindetasche P1 von CDPS-Np

Um die Substratspezifität von CDPS-Np zu ändern, wurden einzelne Aminosäuren innerhalb der Bindetasche P1 von CDPS-Np (L_{48} G_{50} L_{80} T_{82} L_{134} Y_{196} L_{197} C_{211}) zielgerichtet mutiert. Hierfür wurde ein bereits beschriebenes Protokoll zur zielgerichteten Mutagenese (Zheng *et al.*, 2004) verwendet, welches in Kapitel 3.6.4 beschrieben wurde.

Zunächst wurde die Position Y_{196} mutiert. Mit Hilfe der beiden Primer Np011-for und Np011-rev wurden in einer PCR die Mutationen T586C und A587T (Y196L) bzw. A587T (Y196F) in pKB25 eingeführt und so die beiden Konstrukte pKB106 (CDPS-Np_Y196L) und pKB108 (CDPS-Np_Y196F) erstellt. Entsprechende Kulturen, welche pKB25, pKB106 bzw. pKB108 trugen, wurden wie zuvor beschrieben (Kapitel 4.1.3) behandelt und die erhalten Extrakte anschließend mittels LC-MS analysiert (Anhang, Tabelle 7-1). Im Falle der Mutante CDPS-Np_Y196L reduzierte sich die Produktbildung von **1** und **2** auf jeweils 84 % der Produktbildung durch CDPS-Np (Abbildung 4-9). Die Ausbeuten von **1** und **2** durch CDPS-Np_Y196F erhöhten sich dagegen um das 3,1- bzw. 2,4-fache der Produktbildung durch CDPS-Np (Abbildung 4-9). In beiden Fällen konnte also eine Änderung der Ausbeuten durch Mutation der Bindungstasche P1 beobachtet werden, jedoch keine Änderung der Substratspezifität.

Im Weiteren wurde die sehr variable Position in CDPSs (Abbildung 4-8, Anhang Tabelle 7-3), T_{82} von CDPS-Np mutiert. Die Mutationen A244G (T82A) bzw. A244G und C245T (T82V) wurden mit Hilfe der beiden Primer Np010-for und Np010-rev mittels PCR in pKB25 eingefügt. So wurden die beiden Konstrukte pKB101 (CDPS-Np_T82A) und pKB102 (CDPS-Np_T82V) erhalten. Die anschließende Analyse von **1** und **2** ergab eine auf 67 % bzw. 46 % reduzierte Produktbildung von CDPS-Np_T82A (pKB101) im Vergleich zum Wildtypen (Abbildung 4-9). Im Gegensatz dazu führte die Mutation von T_{82} zu Valin zu einem positiven Effekt in Hinblick auf die Enzymaktivität. Im Vergleich zu CDPS-Np erzielten die Kulturen mit CDPS-Np_T82V (pKB102) eine 1,4- bzw. 2,2-fache Produktbildung (Abbildung 4-9).

Um sicher zu gehen, dass die beobachteten Unterschiede in der Produktausbeute nicht auf unterschiedlichen Expressionslevel zurückzuführen sind, wurden die Proteinrohextrakte mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie angefärbt (Abbildung 4-10, A). Im Vergleich zum Leervektor konnte in den Kulturen von CDPS-Np und deren Mutanten jeweils eine zusätzliche Bande mit der Größe von etwa 30 kDa beobachtet werden. Die Identität der His_6-tagged Proteine wurde mittels Western Blot Analyse bestätigt (Abbildung 4-10, B und C). Die Intensität der Banden von CDPS-Np und deren vier Einzelmutanten sind vergleichbar. Dies bedeutet, dass die beobachteten Produktausbeuten aus unterschiedlichen katalytischen Aktivitäten der Y_{196}- und T_{82}-Mutanten resultieren.

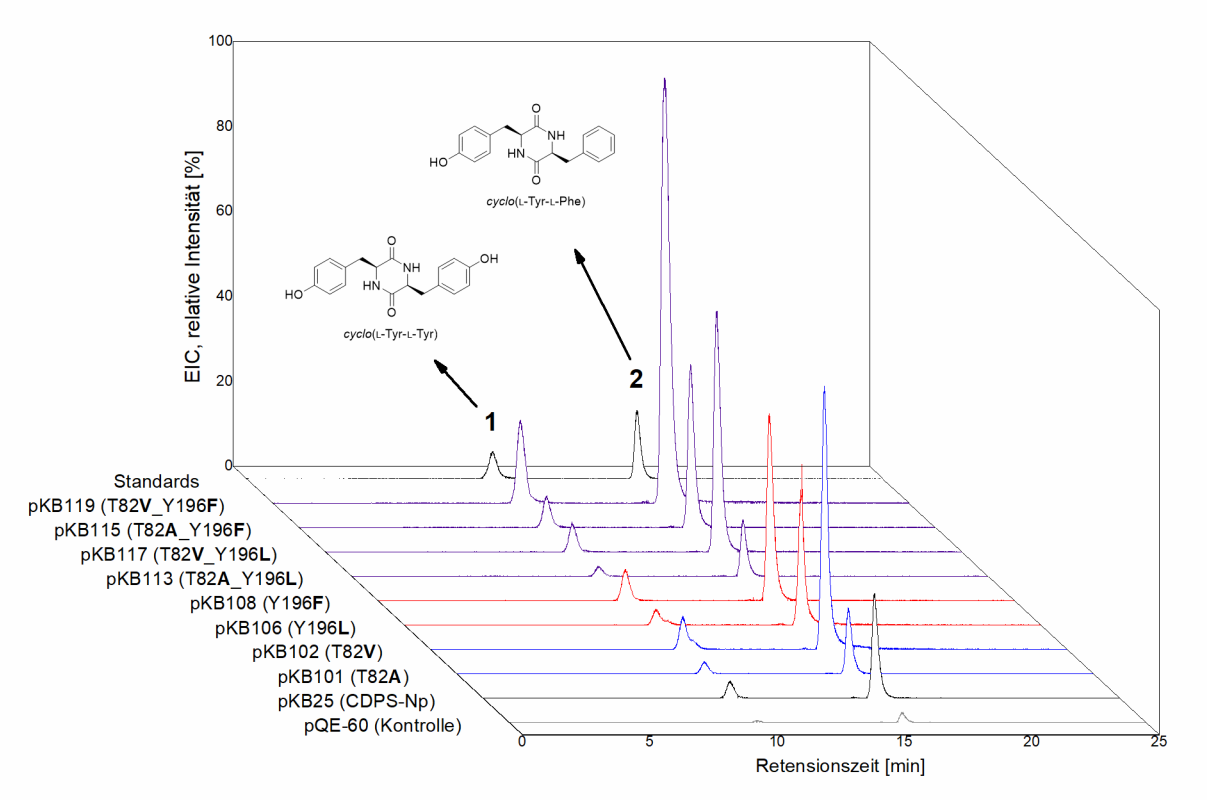


Abbildung 4-9: LC-MS Analyse. Bildung von 1 und 2 durch CDPS-Np und deren Mutanten. Dargestellt sind die positiven extracted ion chromatograms (EICs) von m/z = 327,1339 ±0,005 ([M+H]⁺ von 1) und 311,1390 ±0,005 ([M+H]⁺ von 2).

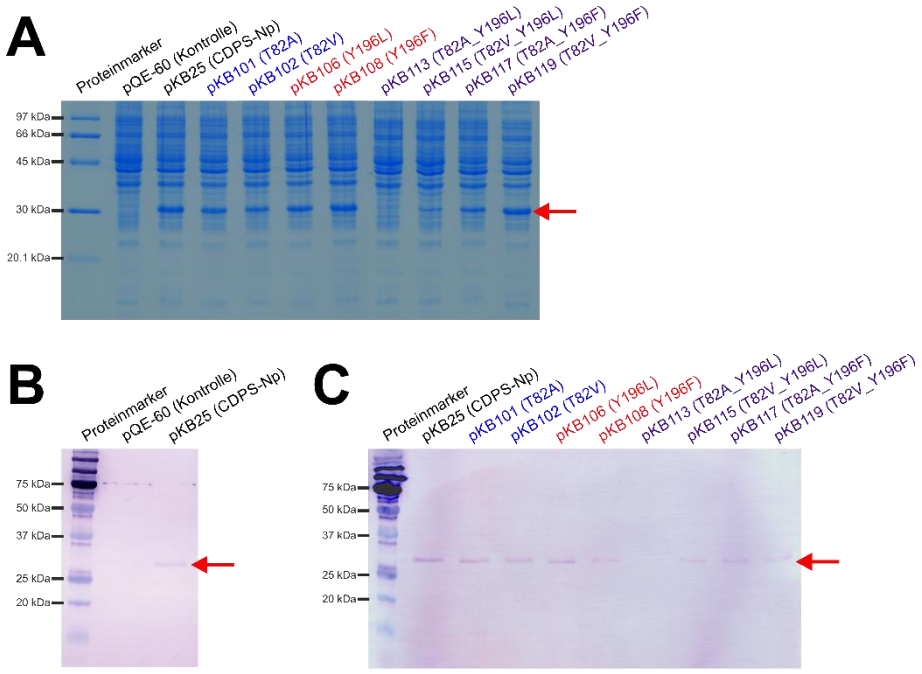


Abbildung 4-10: Analyse von CDPS-Np und deren Mutanten mittels SDS-PAGE (A) und Western Blot-Analyse (B und C) . A: Die Proteinrohextrakte wurden auf einem 15 %igen SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue G-250 angefärbt. B: Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran überführt und anschließend die mit Histidin-Tag versehenen Proteine mittels BCIP und NBT detektiert. Die roten Pfeile markieren die gewünschten Proteine mit einer berechneten Größe von etwa 28 kDa.

Da in den beiden Positionen Y_{196} und T_{82} deutliche Effekte in Hinblick auf die Produktbildung zu beobachten waren, wurden anschließend die vier Doppelmutanten T82A_Y196L (pKB113), T82A_Y196F (pKB115), T82V_Y196L (pKB117) und T82V_Y196F (pKB119) erstellt. Um die beiden Mutanten mit Y196L zu erstellen, wurden die Mutationen T586C und A587T mit Hilfe der Primer Np013-for und Np013-rev mittels PCR in die Konstrukte pKB101 und pKB102 eingefügt. Die Mutation A587T wurde wiederum mittels PCR mit den beiden Primern Np011-for und Np011-rev in die beiden Konstrukte pKB106 und pKB108 eingeführt, um die Mutation mit Y196F zu erhalten.

Die Analyse der Proteinrohextrakt mittels SDS-PAGE zeigte einen deutlichen Einfluss der zweifachen Mutationen auf die Genexpression (Abbildung 4-10, A). Während pKB119 (T82V_Y196F) über ein mit dem Wildtypen vergleichbares Expressionslevel verfügt, betragen die Konzentrationen von T82A_Y196F und T82V_Y196L lediglich etwa 50 bzw. 30 % vom Wildtypen. Im Falle von T82A_Y196L ist die Proteinmenge so gering, dass ein Vergleich der Produktbildung mit dem Wildtypen nicht möglich ist.

Die beiden Doppelmutanten T82A_Y196F und T82V_Y196L, welche jeweils eine Mutation mit einem positiven und jeweils eine Mutation mit einem negativen Effekt in Hinblick auf die Produktbildung enthalten, erzielten eine erhöhte Produktbildung im Vergleich zu CDPS-Np, obwohl die Konzentrationen in den Proteinrohextrakten geringer als im Wildtypen waren. T82V_Y196L produzierte 0,38 mg/L **1** und 4,15 mg/L **2**, welches im Vergleich zu CDPS-Np einer 2,0-fachen bzw. 3,2-fachen Produktion von **1** bzw. **2** entspricht. In den Kulturen von T82A_Y196F wurden 0,40 mg/L **1** and 2,01 mg/L **2** beobachtet. Unter Berücksichtigung der Proteinkonzentration entspricht dies einer 4,2-fachen bzw. 3,1-fachen Produktion von **1** bzw. **2** im Vergleich zum Wildtypen. Wie erwartet, führte die Kombination von zwei positiv beeinflussende Mutationen in T82V_Y196F zu scheinbar synergistischen Effekten und somit zur 8-fachen Produktion von **1** und 10-fachen Produktion von **2** (Abbildung 4-9). Eine Untersuchung der Produktausbeuten durch CDPS-Np und deren Mutanten deutete auf eine Verschiebung der Verhältnisse von **1** und **2** von 1:11,5 zu 1:3,5 hin.

Die Änderung der Enzymaktivität durch die Mutationen in Position Y_{196} und T_{82} ging ebenso mit einer Änderung der Produktbildung von **3** und **4**, insbesondere in T82V, T82V_Y196L, und T82V_Y196F einher (Abbildung 4-11). Im EIC der Extrakte von T82V_Y196F waren die Intensitäten von **3** und **4** um 11,8 bzw. 3,7-fach erhöht. MS^2-Fragmente von **3** bei m/z 247,1051 und **4** bei 249,1579, 171,1118 und 136,0736 wiesen zusätzlich auf die Identität von *cyclo*(L-Tyr-L-Met) und *cyclo*(L-Tyr-L-Leu) oder *cyclo*(L-Tyr-L-Ile) hin. Die Ausbeute von **3** und **4** war zu gering, um diese quantifizieren und mit **1** bzw. **2** vergleichen zu können.

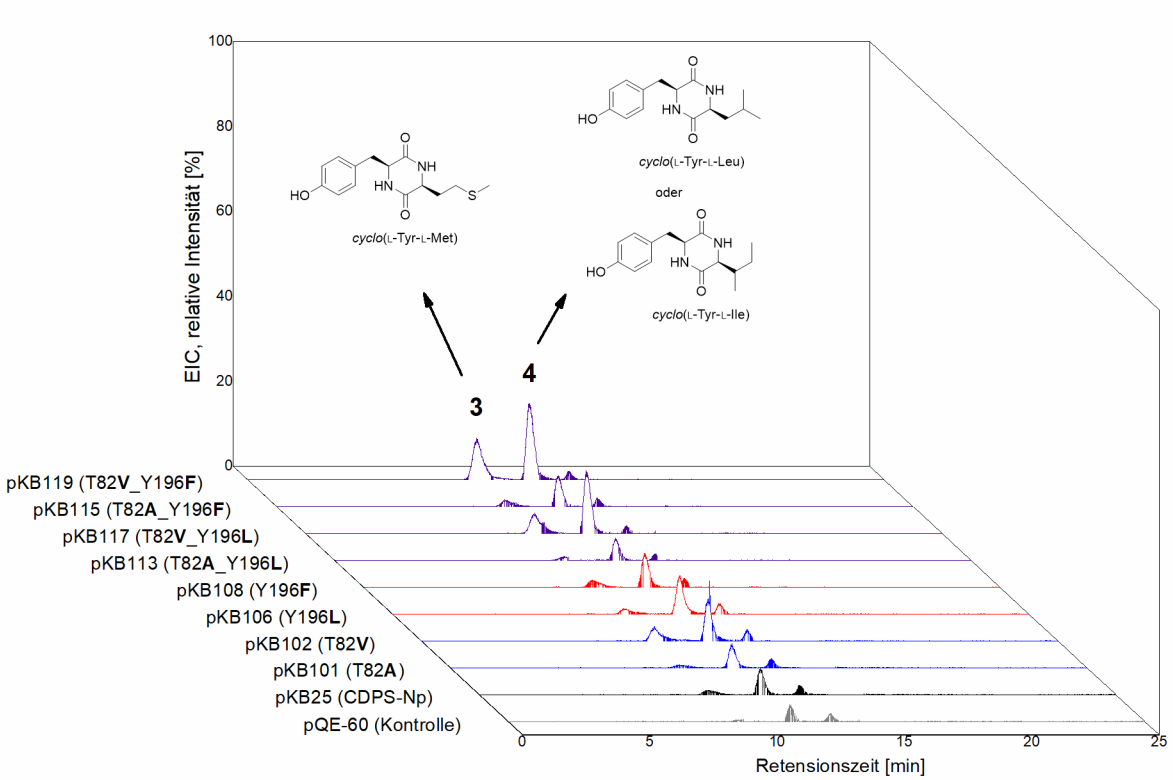


Abbildung 4-11: LC-MS Analyse. Bildung von 3 und 4 durch CDPS-Np und deren Mutanten. Dargestellt sind die positiven extracted ion chromatograms (EICs) von m/z = 295,1111 ±0,0025 ([M+H]⁺ von 3) und 277,1547 ±0,0025 ([M+H]⁺ von 4).

Um ergänzend zu Abbildung 4-10 eine unterschiedliche Produktausbeute durch unterschiedliche Expressionslevel auszuschließen, wurde die Abhängigkeit der Produktbildung durch CDPS-Np bzw. CDPS-Np_T82V_Y196F von der Kultivierungszeit überprüft. Hierfür wurde die Bildung von **1** und **2** über einen Zeitraum von 48 Stunden beobachtet. In Abbildung 4-12 ist deutlich zu erkennen, dass über den gesamten Zeitraum ein erheblicher Unterschied in den Ausbeuten von **1** und **2** durch CDPS-Np und deren Mutante bestehen bleibt.

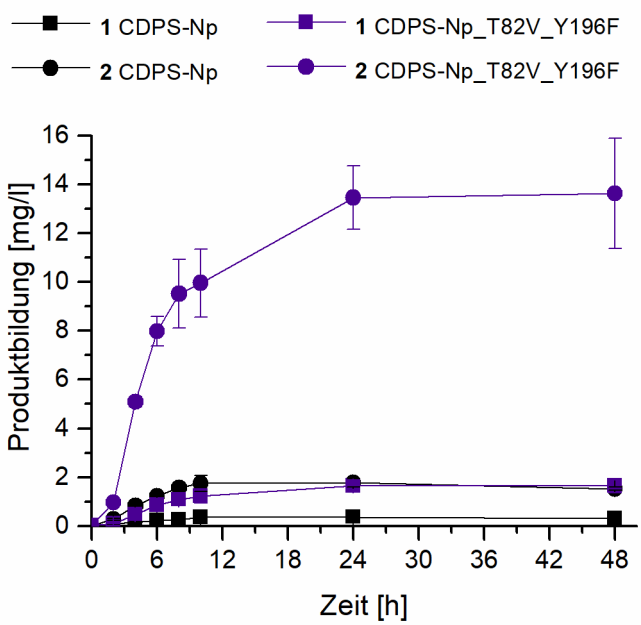


Abbildung 4-12: Abhängigkeit der Produktbildung durch CDPS-Np bzw. CDPS-Np_T82V_Y196F von der Kultivierungszeit.

CDPS-Np aus *N. prasina* konnte mit dem Hauptprodukt *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) und den Nebenprodukten *cyclo*(L-Tyr-L-Tyr), *cyclo*(L-Tyr-L-Met) und *cyclo*(L-Tyr-L-Leu) oder *cyclo*(L-Tyr-L-Ile), abweichend von der vorherigen bioinformatischen Analyse (Jacques *et al.*, 2015), als tyrosin-spezifische Cyclodipeptidsynthase identifiziert werden. Hieraus ergibt sich neben der bioinformatischen Analyse eine Notwendigkeit der experimentellen Überprüfung der tatsächlichen Funktion dieser Gene. Vorherige Versuche Aminosäuren innerhalb der katalytischen und konservierten Bereiche zu mutieren, endete in der Senkung der Produktbildung (Sauguet *et al.*, 2011). Mutationen in den Positionen Y_{196} und T_{82} von CDPS-Np führte dagegen teilweise zu einer deutlichen Erhöhung der Produktbildung.

4.1.6 Analysen zur zielgerichteten Mutagenese der Bindetasche P2 von CDPS-Np

Das aktive Zentrum der Cyclodipeptidsynthase besteht maßgeblich aus zwei Bindetaschen, welche unabhängig voneinander die beiden Substrate binden und zu einem cyclischen Dipeptid verknüpfen (Jacques *et al.*, 2015). Die beiden Cyclodipeptidsynthasen AlbC und Ndas_1148 produzieren unter anderem das cyclische Dipeptid *cyclo*(L-Phe-L-Phe). Dies bedeutet, dass beide Bindetaschen dieser Enzyme fähig sein müssen, Phe-tRNA zu binden. In den Extrakten von CDPS-Np konnte keinerlei Überproduktion von *cyclo*(L-Phe-L-Phe) beobachtet werden. Die Mutante T82A_Y196L, bei der die Aminosäuren der Bindetasche P1 genau den Aminosäuren entsprechen, welche in P1 von Ndas_1148 vorkommen, produzierte ebenso kein *cyclo*(L-Phe-L-Phe). Da die vorherigen Mutationen innerhalb der Bindetasche P1 zu Änderungen in der enzymatischen Aktivität, nicht aber zur Änderung der Substratspezifität führten, stellte sich die Frage, welchen Einfluss die Bindetasche P2 von CDPS-Np auf deren Produktbildung hat. Um dies genauer zu untersuchen, wurden Aminosäuren der Bindetasche P2

von CDPS-Np sowie deren Mutante T82A_Y196L zielgerichtet mutiert (Kapitel 3.6.4). Ziel hierbei war es, alle entsprechenden Aminosäuren der Bindetasche P2 von CDPS-Np bzw. T82A_Y196L (H_{167} Q_{170} I_{171} G_{174} E_{215} L_{217} P_{218}) in die in Ndas_1148 vorkommenden Aminosäuren (H_{156} H_{159} V_{160} A_{163} A_{204} M_{206} P_{207}) zu ändern. Hierfür wurden zunächst, mit Hilfe der beiden Primer Np021-for und Np021-rev mittels PCR, die zwei Mutationen A644C und C649A (E215A und L217M) in pKB25 bzw. pKB113 eingeführt. In diese beiden erhaltenen Konstrukte pKB145 (CDPS-Np_E215A_L217M) und pKB149 (CDPS-Np_ T82A_Y196L_E215A_L217M) wurden anschließend, mit Hilfe der beiden Primer Np020-for und Np020-rev, die Mutationen G510C, A511G, G521C und T522C (Q170H, I171V und G174A) eingeführt. Die resultierenden Konstrukte pKB150 (CDPS-Np_Q170H_I171V_G174A_ E215A_L217M) und pKB151 (CDPS-Np_T82A_Y196L_Q170H_I171V_G174A_E215A_L217M) codieren nun Mutanten von CDPS-Np bzw. T82A_Y196L, deren Aminosäuren der Bindetasche P2 (H_{167} H_{170} V_{171} A_{174} A_{215} M_{217} P_{218}) denen von Ndas_1148 entsprechen (H_{156} H_{159} V_{160} A_{163} A_{204} M_{206} P_{207}).

Beide Konstrukte wurden in *E. coli* M15 eingebracht und die entsprechende Produktbildung der Mutanten im Vergleich zum Wildtypen untersucht (Anhang, Tabelle 7-2). In Abbildung 4-13 sind die EICs von m/z = 327,1339 $\pm$ 0,005 ($[M+H]^+$) von **1** und m/z = 311,1390 $\pm$ 0,005 ($[M+H]^+$) von **2** sowie m/z = 295,1441 $\pm$ 0,005 ($[M+H]^+$) von *cyclo*(L-Phe-L-Phe) der entsprechenden Extrakte dargestellt. Auch hier ist eine Änderung in der Bildung von **1** und **2** zu erkennen. In den jeweiligen EICs von m/z = 295,1441 $\pm$ 0,005 ($[M+H]^+$) unterscheiden sich diese bei einer Retentionszeit von 20,7 min nicht von der Kontrolle. Die erwartete Bildung von *cyclo*(L-Phe-L-Phe) ist jedoch sowohl bei der Mutante Q170H_I171V_G174A_ E215A_L217M (pKB150) als auch bei der Mutante T82A_Y196L_Q170H_I171V_ G174A_E215A_L217M (pKB151) ausgeblieben.

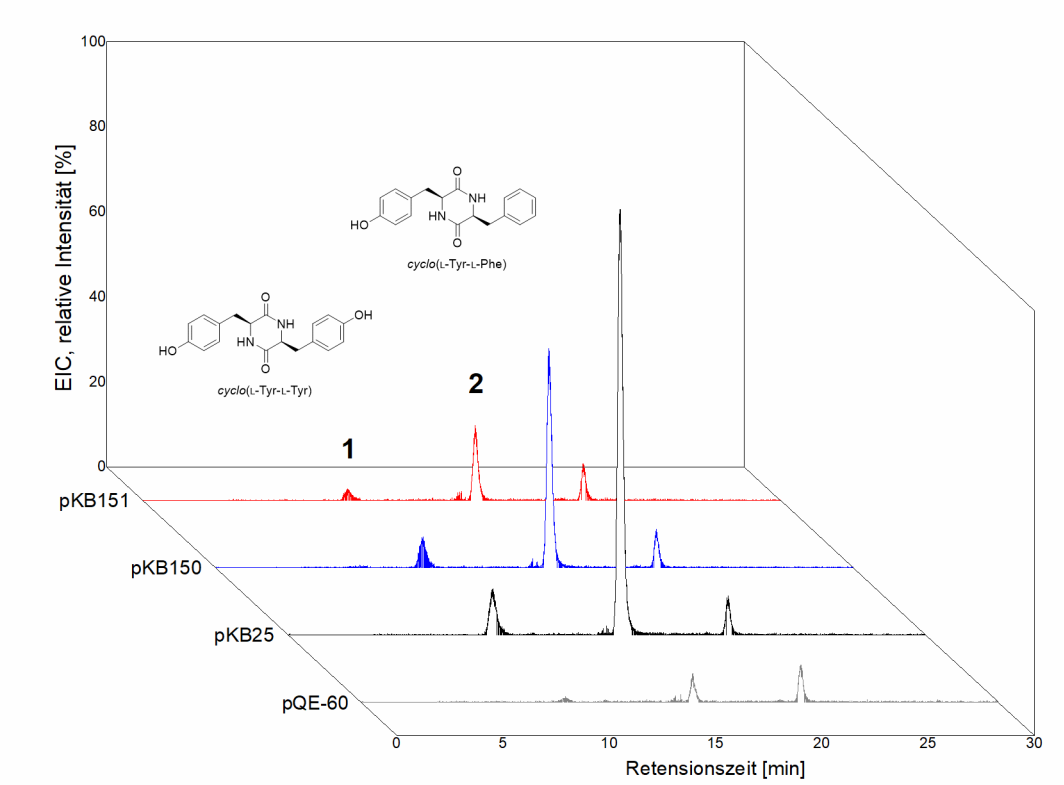


Abbildung 4-13: LC-MS Analyse. Bildung von 1 und 2 durch CDPS-Np und deren Mutanten Q170H_I171V_G174A_ E215A_L217M (pKB150) und T82A_Y196L_Q170H_I171V_G174A_E215A_L217M (pKB151) im Vergleich zum Wildtypen (pKB25). Dargestellt sind die positiven extracted ion chromatograms (EICs) von m/z 327,1339 ±0,005 ([M+H]⁺ von 1), 311,1390 ±0,005 ([M+H]⁺ von 2) und 295,1441 ±0,005 ([M+H]⁺ von cyclo*(L-Phe-L-Phe).*

Beide hier generierte Mutanten basierend auf pKB150 bzw. pKB151 sind, trotz fünf bzw. sieben Mutationen, aktiv und synthetisieren ihre Produkte **1** und **2**. Im Vergleich zum Wildtypen sind **1** und **2** jedoch reduziert. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass eine Überproduktion von *cyclo*(L-Phe-L-Phe) aufgrund der allgemeinen reduzierten Produktion der Mutanten nicht zu detektieren war.

Die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass durch die Änderung der Aminosäuren weder in P1 noch in P2 der Bindetaschen von CDPS-Np eine Änderung im Produktspektrum erzielt werden konnte.

4.2 Untersuchungen zu Cyclodipeptidoxidasen aus Actinobacteria

4.2.1 Einleitung

Bisher wurden die beiden Cyclodipeptidoxidasen (CDOs) aus *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* (Ndas_1146 und Ndas_1147) und *Streptomyces noursei* (AlbA und AlbB) genauer betrachtet. Hierbei wurden beide jedoch nicht im Vergleich zueinander betrachtet. In beiden Fällen wurde mindestens für deren natürliche Substrate eine Umsetzung zu dehydrierten Produkten nachgewiesen. Die Identität zwischen Ndas_1146 und AlbA beträgt 44 %, während die Identität zwischen Ndas_1147 und AlbB 45 % beziffert wird (Abbildung 4-14). Dies wirft die Frage auf, wie ähnlich sich diese beiden CDOs bzw. im Vergleich zu der putativen CDO aus *N. prasina* (CDO_A-Np und CDO_B-Np) wirklich verhalten.

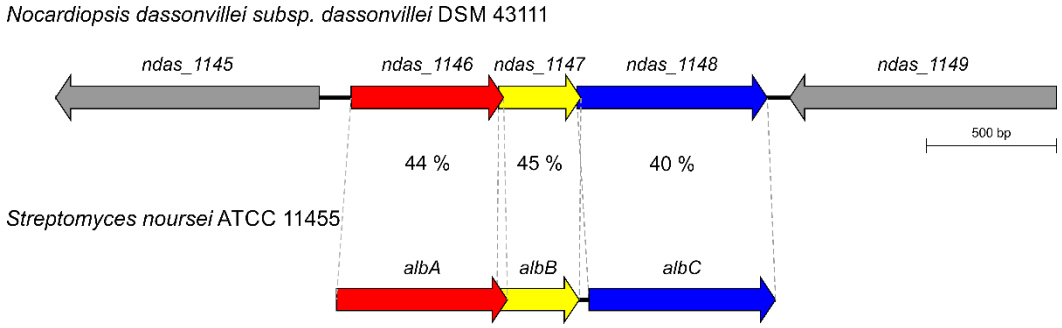


Abbildung 4-14: Struktureller Vergleich der biosynthetischen Gencluster in N. dassonvillei subsp. dassonvillei DSM 43111 und S. noursei ATCC 11455.

Im Vergleich des Biosynthese-Genclusters von Albonoursin in *S. noursei* und der Nocazine in *N. dassonvillei* fällt auf, dass neben der CDPS, CDO_A und CDO_B ebenso weitere Enzyme wie beispielsweise Methyltransferasen in der Biosynthese involviert sein können. Um eine Vorstellung zu bekommen in was für genetischen Umgebungen CDOs vorkommen, wurden die Aminosäure-sequenzen von AlbA und AlbB bzw. Ndas_1146 und Ndas_1147 durch das Programm Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) mit Sequenzen der NCBI-Datenbank verglichen. Hierbei wurden Homologe von CDO_A und CDO_B getrennt voneinander gesucht und anschließend deren genetische Nachbarschaft untersucht. Genauer betrachtet wurden CDOs in Actinobacteria, bei denen in unmittelbarer Nähe eine CDPS zu finden ist. So war es möglich insgesamt 55 Gencluster, mindestens bestehend aus einer CDPS und einer CDO, in den Gattungen *Streptomyces*, *Nocardiopsis* und *Actinomadura* zu identifizieren. Hierbei sind fünf verschiedene Muster aufgetreten. Insgesamt 17 Cluster bestehen aus jeweils einer CDPS und einer CDO (CDO_A und CDO_B). Weitere 14 Cluster verfügen neben der CDPS und der CDO über jeweils eine putative Methyltransferase, 15 weitere Cluster verfügen sogar über jeweils zwei putative Methyltransferasen. In unmittelbarer Nähe von einer CDPS

und einer CDO wurde in zwei Clustern jeweils ein putatives Cytochrom P450 Enzym identifiziert. Weitere sieben Cluster bestehen aus CDPS, CDO, einem putativen Cytochrom P450 Enzym und einer putativen Methyltransferase. In 51 der betrachteten Organismen kommt jeweils nur einer dieser verschiedenen Gencluster-Typen vor. In *Actinomadura oligospora* ATCC 4369 sowie in *Streptomyces monomycini* NRRL B-24309 sind jeweils zwei unterschiedliche Cluster vorhanden. In beiden Fällen besteht jeweils ein Cluster lediglich aus einer CDPS und einer CDO, während das andere Cluster in *Actinomadura oligospora* ATCC 4369 neben der CDPS und der CDO über zusätzlich ein putatives Cytochrom P450 Enzym bzw. in *Streptomyces monomycini* NRRL B-24309 über zusätzlich ein putatives Cytochrom P450 Enzym und eine putative Methyltransferase verfügt. Cluster bestehend aus CDPS und CDO sowie aus CDPS, CDO, und putativem Cytochrom P450 Enzym mit oder ohne putativer Methyltransferase kommen nach diesem Kenntnisstand in Organismen der Gattung *Streptomyces* und *Actinomadura*, nicht jedoch in *Nocardiopsis* vor. Die Cluster mit CDPS, CDO, und einer putativen Methyltransferase, mit Ausnahme von *Nocardiopsis synnemataformans* DSM 44143 und *Nocardiopsis potens* DSM 45234, kommen überwiegend in *Streptomyces* vor. Die Cluster mit CDPS, CDO, und zwei putativen Methyltransferasen, mit Ausnahme von *Streptomyces catenulae* NRRL B-2342, kommen hingegen überwiegend in *Nocardiopsis* vor.

Da die CDPSs die Substrate der putativen CDOs synthetisieren, wurden diese zunächst genauer betrachtet. In Abbildung 4-15 ist eine phylogenetische Analyse der 55 CDPSs dargestellt. Die Funktion von einigen dieser CDPSs wurde bereits experimentell bewiesen. Es handelt sich hierbei um CDPSs, welche bevorzugt phenylalanin- bzw. tyrosin-haltige cyclische Dipeptide synthetisieren. Auffällig ist, dass sich keine bekannte CDPS darunter befindet, welche tryptophan-haltige cyclische Dipeptide produziert. Im Anhang (Abbildung 7-1) ist ein multipler Sequenzvergleich dieser 55 CDPSs in Nachbarschaft von putativen CDOs abgebildet. Hierbei wurden die Aminosäuren, welche die beiden Bindetaschen P1 und P2 bilden, analysiert. Auch hier deutet keines der Aminosäure-Motive der beiden Bindetaschen auf die Synthese von anderen cyclischen Dipeptiden durch diese CDPSs.

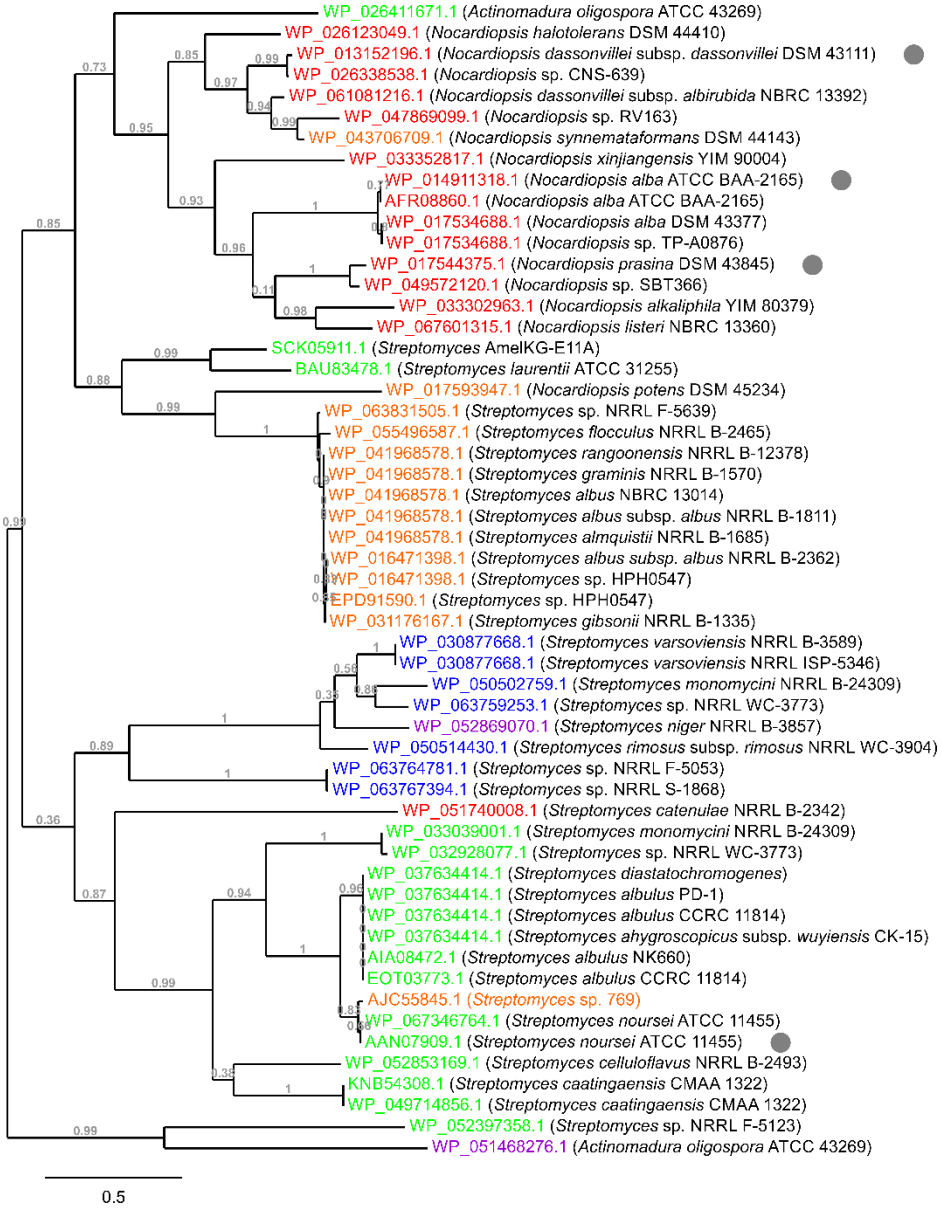


Abbildung 4-15: Phylogenetische Analyse ausgewählter CDPS aus Actinobacteria (Oktober 2016). CDPS, welche in unmittelbarer Nachbarschaft zusammen mit putativen CDO_A und CDO_B vorkommen, sind in grün gekennzeichnet. CDPS, welche zusätzlich zu putativen CDO_A und CDO_B, zusammen mit einer bzw. zwei putativen Methyltransferase vorkommen, sind in orange bzw. rot gekennzeichnet. CDPS, welche zusätzlich zu den putativen CDO_A und CDO_B zusammen mit einem putativen Cytochrom P450 Enzym bzw. einem putativen Cytochrom P450 Enzym und einer putativen Methyltransferase auftreten, sind in lila bzw. blau gekennzeichnet. CDPS, deren Produktbildung identifiziert wurde, sind mit einem grauen Punkt markiert.

Um einen Eindruck über die CDO_A sowie CDO_B zu bekommen, wurden auch diese phylogenetisch untersucht. In Abbildung 4-16 ist diese entsprechende Analyse der putativen CDO_A-Homologen wiedergegeben, während in Abbildung 4-18 der zugehörige multiple Sequenzvergleich dieser Homologe dargestellt ist. Die Homologe dieser Actinobacteria variieren in ihrer Größe zwischen 145 und 219 aa und in ihren Identitäten zu AlbA bzw. Ndas_1146 zwischen 35 und 90 % bzw. 40 und 78 % (Anhang, Tabelle 7-4). Im Vergleich zu AlbA schwanken die putativen CDO_A-Homologe selbst innerhalb der Gattung *Streptomyces* in ihrer Größe zwischen 145 und 219 aa und in ihrer Identität zwischen 35 und 90 %. Innerhalb der Gattung *Nocardiopsis* schwanken die putativen Homologe in ihrer Größe zwischen 157 und 195 aa und in ihrer Identität zu Ndas_1146 zwischen 48 und 78 %. Die vergleichsweisen geringen Übereinstimmungen scheinen also nicht alleine auf die unterschiedlichen Gattungen zurückzuführen zu sein.

In Abbildung 4-17 ist die phylogenetische Analyse der putativen CDO_B-Homologe dargestellt. Aufgrund der hohen Abweichung von WP_052853170.1 aus *Streptomyces celluloflavus* NRRL B-2493 und WP_052869068.1 aus *Streptomyces niger* NRRL B-3857 in ihren jeweiligen Identitäten zu AlbB bzw. Ndas_1146, wurden diese im multiplen Sequenzvergleich der CDO_B-Homologe in Abbildung 4-19 nicht berücksichtigt. WP_052853170.1 teilt lediglich eine Identität von 5,3 % mit AlbB und 14,7 % mit Ndas_1147, während WP_052869068.1 über eine Identität von 11,9 % zu AlbB und 7,1 % zu Ndas_1147 verfügt (Anhang, Tabelle 7-4). Die übrigen putativen CDO_B-Homologe variieren in ihrer Größe zwischen 94 und 117 aa und in ihren Identitäten zu AlbB bzw. Ndas_1147 zwischen 38 und 93 % bzw. 34 und 97 % (Anhang, Tabelle 7-4). Hierbei befinden sich die Identitäten im Vergleich zu AlbB innerhalb der Gattung S*treptomyces* zwischen 40 und 93 %, während die Identitäten zu Ndas_1147 innerhalb der Gattung *Nocardiopsis* zwischen 44 und 97 % schwankt. Die CDO_B-Homologe schwanken in ihrer Größe innerhalb der Gattung *Streptomyces* zwischen 94 und 117 aa und innerhalb der Gattung *Nocardiopsis* zwischen 96 und 115 aa. Auch hier sind die geringen Übereinstimmungen nicht alleine auf unterschiedlichen Gattungen zurückzuführen. Es ergibt sich hieraus die Frage, wie ähnlich oder eben nicht sich verschiedene CDOs im Vergleich verhalten.

Bisher wurden die beiden CDOs AlbA und AlbB bzw. Ndas_1146 und Ndas_1147 in Hinblick auf die Umsetzung ihrer natürlichen Substrate untersucht (Giessen *et al.*, 2013b; Gondry *et al.*, 2001). Dies geschah weitgehend mit Substraten in natürlich vorkommenden Konzentrationen. Des Weiteren wurden einzelne weitere cyclische Dipeptide als Substrate von einigen CDOs getestet (Tabelle 1-1), allerdings nicht im Vergleich zueinander. Es stellt sich zum einen die Frage, wie sich CDOs im Vergleich unter definierten Bedingungen verhalten, und zum anderen wie der Mechanismus dieser Reaktion abläuft.

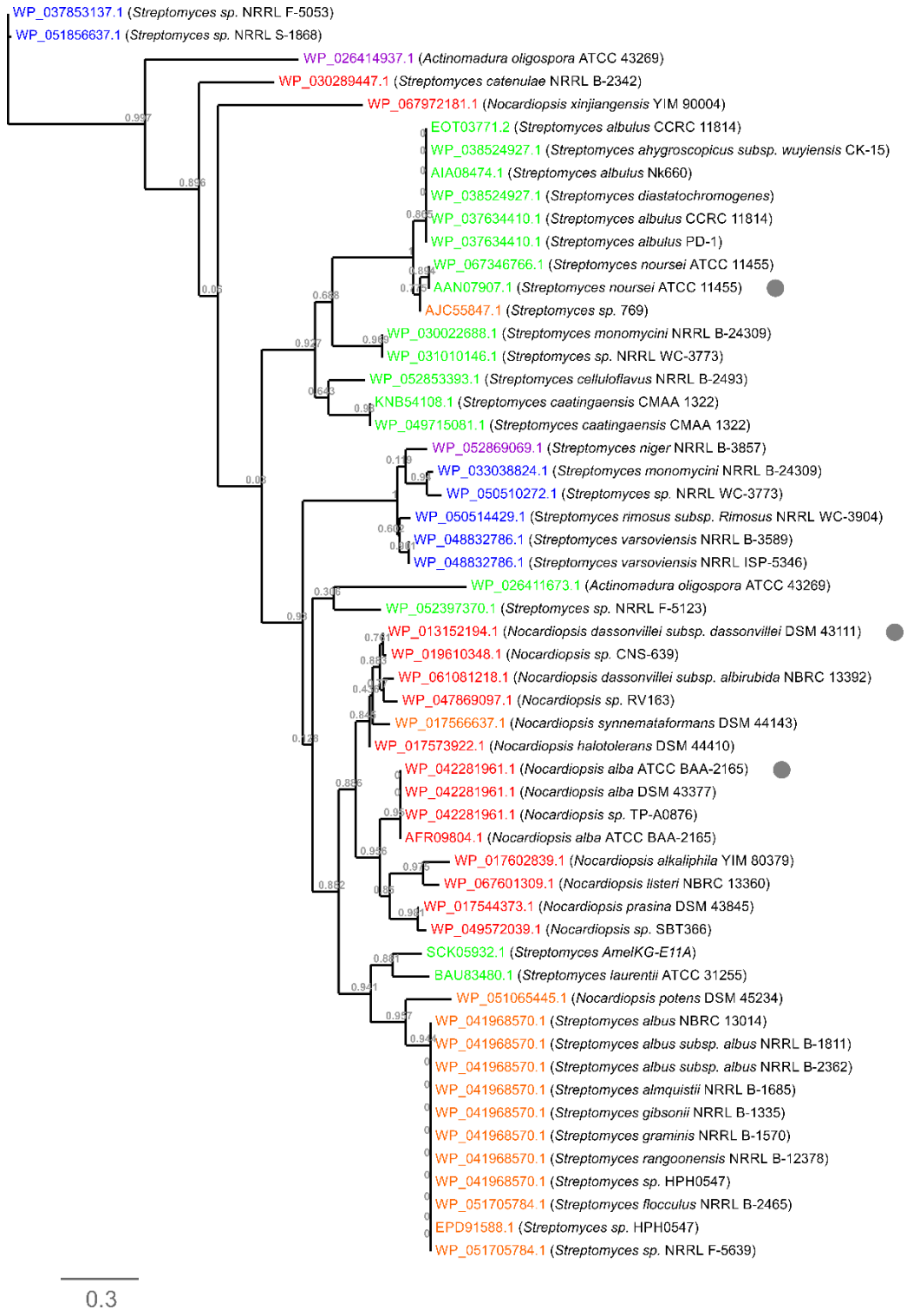


Abbildung 4-16: Phylogenetische Analyse ausgewählter CDO_A aus Actinobacteria (Oktober 2016). CDO_A, welche in unmittelbarer Nachbarschaft zusammen mit einer putativen CDO_B und CDPS vorkommen, sind in grün gekennzeichnet. CDO_A, welche zusätzlich zur putativen CDO_B und CDPS, zusammen mit einer bzw. zwei putativen Methyltransferase vorkommen, sind in orange bzw. rot gekennzeichnet. CDO_A, welche zusätzlich zur putativen CDO_B und CDPS zusammen mit einem putativen Cytochrom P450 Enzym bzw. einem putativen Cytochrom P450 Enzym und einer putativen Methyltransferase auftreten, sind in lila bzw. blau gekennzeichnet. CDO_A, deren Produktbildung identifiziert wurde, sind mit einem grauen Punkt markiert.

Abbildung 4-17: Phylogenetische Analyse ausgewählter CDO_B aus Actinobacteria (Oktober 2016). CDO_B, welche in unmittelbarer Nachbarschaft zusammen mit einer putativen CDO_A und CDPS vorkommen, sind in grün gekennzeichnet. CDO_B, welche zusätzlich zur putativen CDO_A und CDPS, zusammen mit einer bzw. zwei putativen Methyltransferase vorkommen, sind in orange bzw. rot gekennzeichnet. CDO_A, welche zusätzlich zur putativen CDO_A und CDPS zusammen mit einem putativen Cytochrom P450 Enzym bzw. einem putativen Cytochrom P450 Enzym und einer putativen Methyltransferase auftreten, sind in lila bzw. blau gekennzeichnet. CDO_B, deren Produktbildung identifiziert wurde, sind mit einem grauen Punkt markiert.

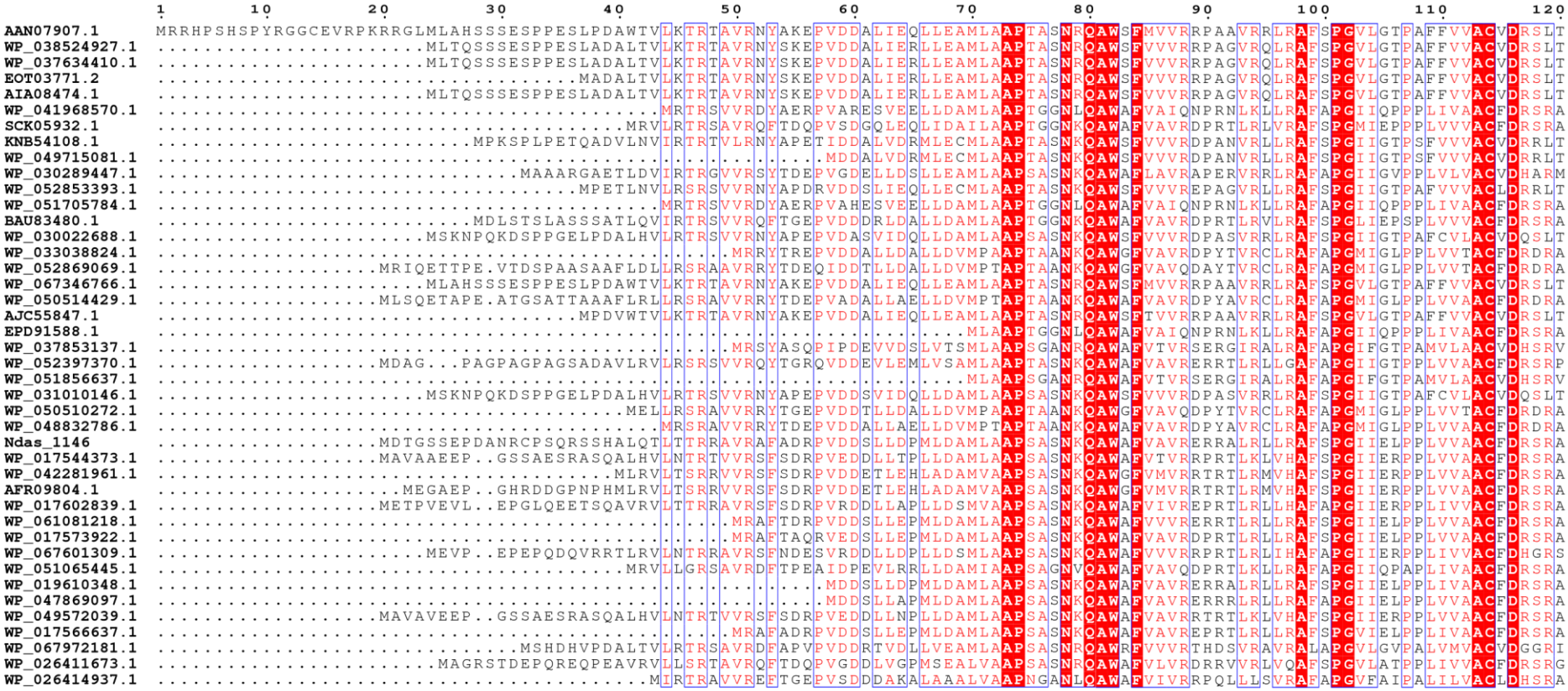
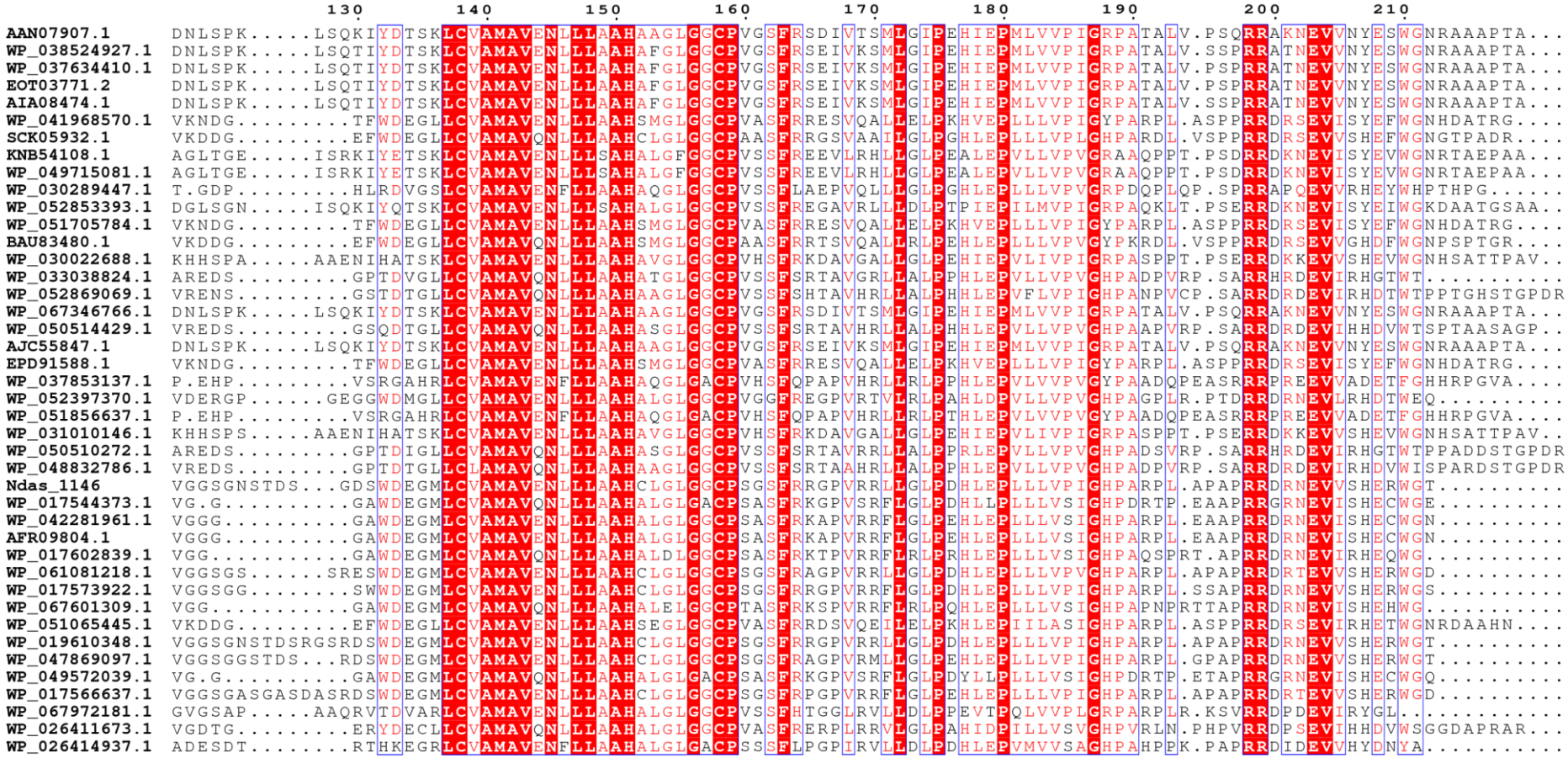


Abbildung 4-18: Multipler Sequenzvergleich von putativen CDO_A in Actinobacteria. Die dargestellten CDO_A kommen aus den in Abbildung 4-16 dargestellten Actinomadura, Nocardiopsis und Streptomyces Stämmen.



Fortsetzung von Abbildung 4-18.

Abbildung 4-19: Multipler Sequenzvergleich von putativen CDO_B in Actinobacteria. Die dargestellten CDO_B kommen aus den in Abbildung 4-17 dargestellten Actinomadura, Nocardiopsis und Streptomyces Stämmen

4.2.2 Analysen zur Cyclodipeptidoxidase CDO_A-Np und CDO_B-Np aus *N. prasina*

4.2.2.1 Sequenzanalyse von *CDO_A-Np* und *CDO_B-Np* aus *N. prasina*

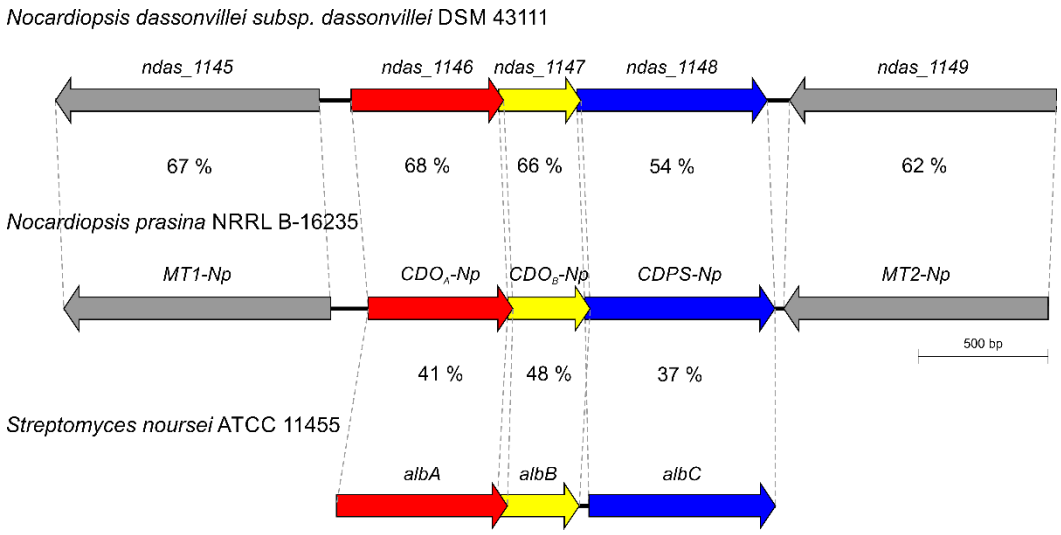


Abbildung 4-20: Struktureller Vergleich der biosynthetischen Gencluster in N. prasina NRRL B-16235, N. dassonvillei subsp. dassonvillei DSM 43111 und S. noursei ATCC 11455.

Die beiden Gene der putative Cyclodipeptidoxidase CDO_A-Np und CDO_B-Np aus *N. prasina* NRRL B-1623 wurden zu Beginn dieser Arbeit durch eine BLAST-Analyse im Vergleich zu einem homologen Gencluster aus *N. dassonvillei* DSM 43111 (Giessen *et al.*, 2013b) entdeckt (Abbildung 4-20). Das Gen von WP_017544373.1 (CDO_A-Np) besteht aus 558 bp, so dass das resultierende Protein 185 Aminosäuren mit einer berechneten Masse von 19,76 kDa umfasst. Die Aminosäuresequenz von WP_017544373.1 (CDO_A-Np) ist zu 68 % identisch mit der von Ndas_1146 sowie zu 41 % identisch mit AlbA (Abbildung 4-21).

Abbildung 4-21: Sequenzvergleich von AlbA aus Streptomyces noursei, Ndas_1146 aus Nocardiopsis dassonvillei subsp. dassonvillei *DSM 43111 und CDO_A-Np aus Nocardiopsis prasina NRRL B-16235.*

Das Gen dagegen, welches das Protein WP_017544374.1 (CDO_B-Np) kodiert, besteht aus 306 bp, welches ein 101 Aminosäuren großes Polypeptid mit einer berechneten Masse von 10,89 kDA hervorbringt. Die Gene von WP_017544373.1 und WP_017544374.1 überlappen in einem Bereich von nur 8 bp. Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Annotierung von CDO_B-Np in der NCBI Datenbank in WP_026129216.1 geändert. Das Gen von WP_026129216.1 befindet sich innerhalb des Genclusters

aus *N. prasina* NRRL B-1623 auf dem Contig NZ_ANAE01000117 (Tabelle 4-1) im Bereich von bp 31718 und bp 32035. Die Sequenz wurde hierbei um 12 bp erweitert. Die Aminosäuresequenzen von WP_026129216.1 und WP_017544374.1 unterscheiden sich also lediglich durch die ersten vier zusätzlichen Aminosäuren von WP_026129216.1. Das Gen von WP_026129216.1 besteht aus 318 bp, überlappt mit dem von WP_017544373.1 in einem Bereich von 20 bp und codiert ein Protein von 105 Aminosäuren und einer berechneten Masse von 11,20 kDa. Während die Identität zwischen WP_017544374.1 und Ndas_1147 61 % bzw. zu AlbB 47 % beträgt, erhöht sich mit der Änderung der Annotierung von CDO_B-Np die Identität zwischen WP_026129216.1 und Ndas_1147 auf 66 % bzw. auf 48 % im Vergleich zu AlbB (Abbildung 4-22).

Abbildung 4-22: Sequenzvergleich von AlbB aus Streptomyces noursei, Ndas_1147 aus Nocardiopsis dassonvillei subsp. *dassonvillei DSM 43111 und CDO_B-Np aus Nocardiopsis prasina NRRL B-16235.*

4.2.2.2 Amplifikation von *CDO_A-Np* und *CDO_B-Np* aus genomischer DNA von *N. prasina* NRRL B-16235

Um die Cyclodipeptidoxidase aus *N. prasina* NRRL B-16235 untersuchen zu können, wurde die überlappende Sequenz (Abbildung 4-23) der beiden Gene *CDO_A-Np* und *CDO_B-Np* (NCBI accession number WP_017544373.1 und WP_017544374.1 bzw. WP_026129216.1) amplifiziert und in den Vektor pQE-60 zur Expression in *E. coli* kloniert.

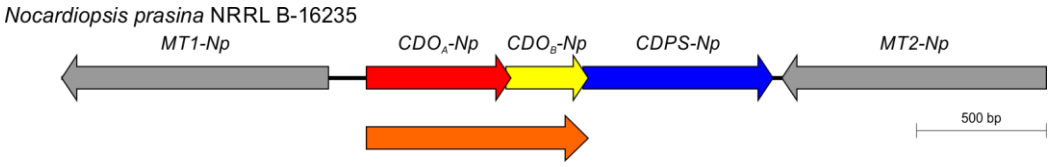


Abbildung 4-23: Darstellung der klonierten Sequenz von CDO_A-Np und CDO_B-Np aus N. prasina NRRL B-16235.

Hierfür wurde die Sequenz mit Hilfe der Oligonukleotide Np003-for und Np004b-rev mittels PCR anhand von pKB54 amplifiziert. Durch die Oligonukleotide wurden die beiden Restriktions-schnittstellen für NcoI und BamHI eingefügt. Die PCR wurde mit der High Fidelity Polymerase mit einer Anlagerungstemperatur von 60 °C und einer Elongationszeit von 1 Minute durchgeführt (Kapitel 3.6.3). In Abbildung 4-24 ist das zugehörige PCR-Produkt zu erkennen.

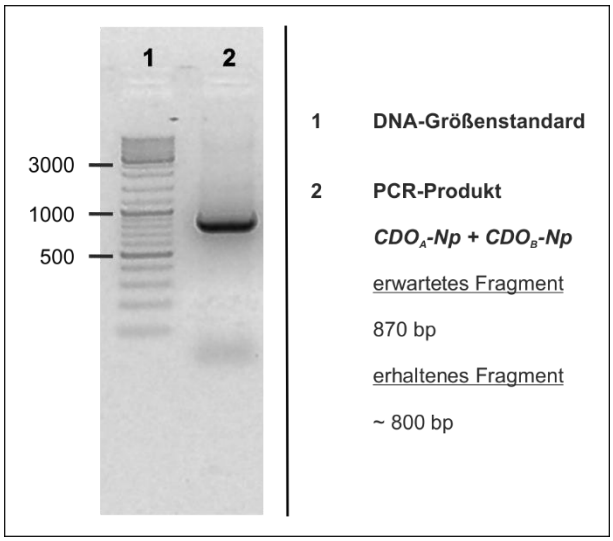


Abbildung 4-24: 1,25 %iges Agarosegele der Amplifikation von CDO$_A$-Np und CDO$_B$-Np mittels PCR.

4.2.2.3 Klonierung der überlappenden Sequenz zur Überproduktion von CDO$_A$-Np und CDO$_B$-Np in *E. coli*

Das erhaltene PCR-Produkt wurde mittels TA-Klonierung mit dem linearisierten Vektor pGEM®-T Easy ligiert und anschließend mittels Hitzeschock in *E. coli* XL10-Gold eingebracht. Durch die mögliche Blau-Weiß-Selektion wurden einige Kolonien ausgewählt, kultiviert und im Anschluss deren Plasmide isoliert. Nach einer Restriktion mit EcoRI wurden die DNA-Fragmente mittels Elektrophorese aufgetrennt. Die Fragmente des Plasmides pKB78 (Abbildung 4-25, A) entsprachen den erwarteten Fragmentgrößen von 889 und 2997 bp (Abbildung 4-25, B). Die gewünschte Sequenz konnte anschließend durch eine Sequenzierung bestätigt werden.

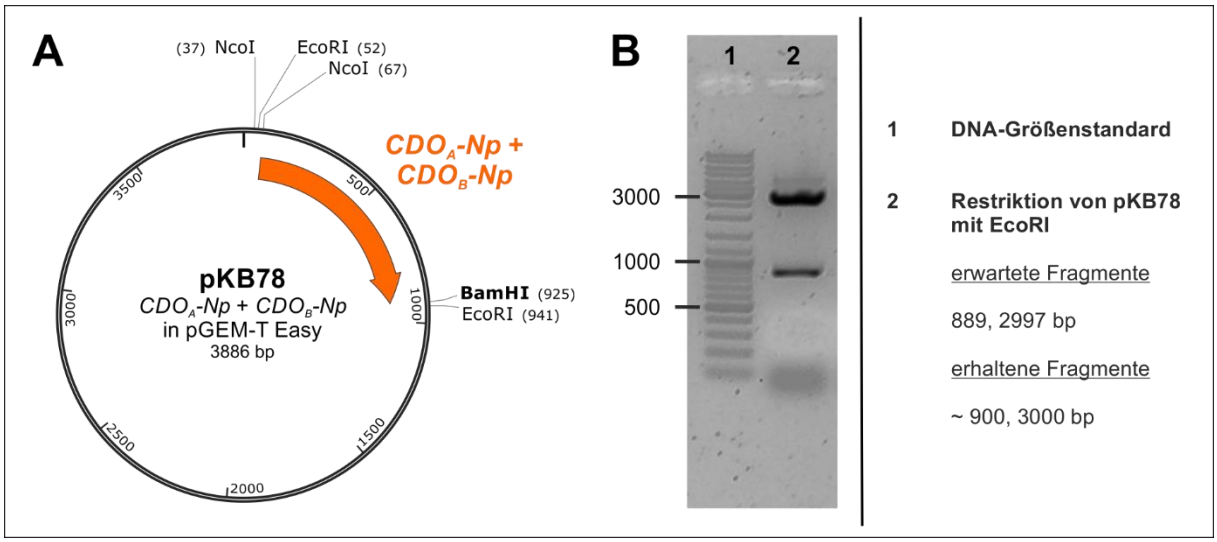


Abbildung 4-25: A: Plasmidkarte von pKB78 (CDO$_A$-Np und CDO$_B$-Np in pGEM®-T Easy). B: 1 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB78 mit EcoRI.

Im Anschluss erfolgte eine Restriktion von pKB78 und pQE-60 mit NcoI und BamHI. Nach der Trennung der DNA-Fragmente mittels Elektrophorese wurden die betreffenden DNA-Fragmente aus den Agarosegelen isoliert und miteinander ligiert. Anschließend wurde dieser Ligationsansatz mittels Hitzeschock in *E. coli* XL10-Gold eingebracht und Plasmide von einigen Kolonien isoliert. Zur Überprüfung der Ligation erfolgte eine Restriktion mit NcoI und BamHI. Nach der Trennung der erhaltenen DNA-Fragmente mittels Elektrophorese entsprachen die Größen der DNA-Fragmente des Plasmides pKB81 (Abbildung 4-26, A) den erwarteten Größen von 858 und 3423 bp (Abbildung 4-26, B). Die Sequenz des Inserts konnte anschließend durch eine Sequenzierung bestätigt werden.

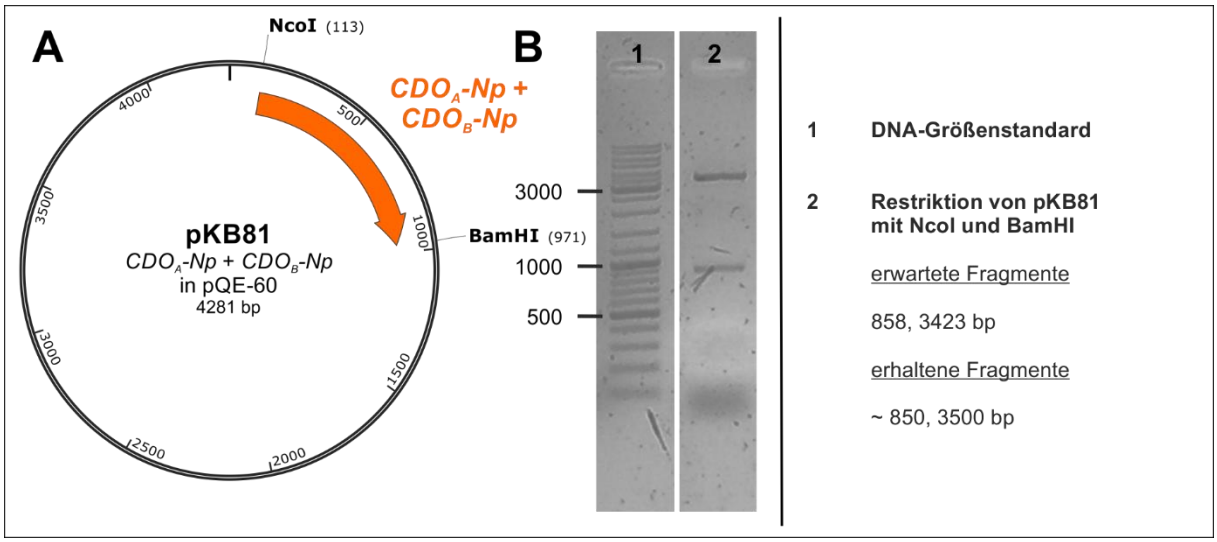


Abbildung 4-26: A: Plasmidkarte von pKB81 (CDO$_A$-Np und CDO$_B$-Np in pQE-60). B: 1,25 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB81 mit NcoI und BamHI.

4.2.2.4 Biotransformation und Identifizierung der enzymatischen Produkte von CDO_A-Np und CDO_B-Np

Um die Funktion der Cyclodipeptidoxidase aus *N. prasina* zu analysieren, wurde das Plasmid pKB81 in *E. coli* M15 [pREP4] (Tabelle 3-21) eingebracht und bei 37 °C in LB-Medium schüttelnd kultiviert. Die Genexpression wurde für 16 Stunden mit 1 mM IPTG induziert. Anschließend wurde der Kultur 1 mM *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) (**2**), welches eines der natürlichen Substrate darstellt, zugesetzt und für weitere 6 Stunden inkubiert (Kapitel 4.1.3). Die Kultur wurde mit gleichem Volumen Methanol versetzt und im Anschluss mittels LC-MS analysiert.

In Abbildung 4-27 ist das Ergebnis abgebildet. Es konnten neben dem $[M+H]^+$-Ion des Substrates (**2**) mit m/z = 311,1392 bei einer Abweichung von -0,5 ppm zu dem berechneten $[M+H]^+$-Ion von m/z = 311,1390 zwei jeweils einfach dehydrierte Produkte (**2a** und **2b**) sowie ein zweifach dehydriertes Produkt (**2c**) identifiziert werden (Anhang, Tabelle 7-5). Die beiden $[M+H]^+$-Ionen mit m/z = 309,1225 von **2a** und 309,1227 von **2b** weichen mit 3,0 und 2,3 ppm von dem berechneten $[M+H]^+$-Ion mit m/z = 309,1234 von *cyclo*(ΔTyr-L-Phe) oder *cyclo*(L-Tyr-ΔPhe) ab. Das $[M+H]^+$-Ion von **2c** mit m/z = 307,1072 weist eine Abweichung von 1,7 ppm zum berechneten $[M+H]^+$-Ion von *cyclo*(ΔTyr-ΔPhe) mit m/z = 307,1077 auf.

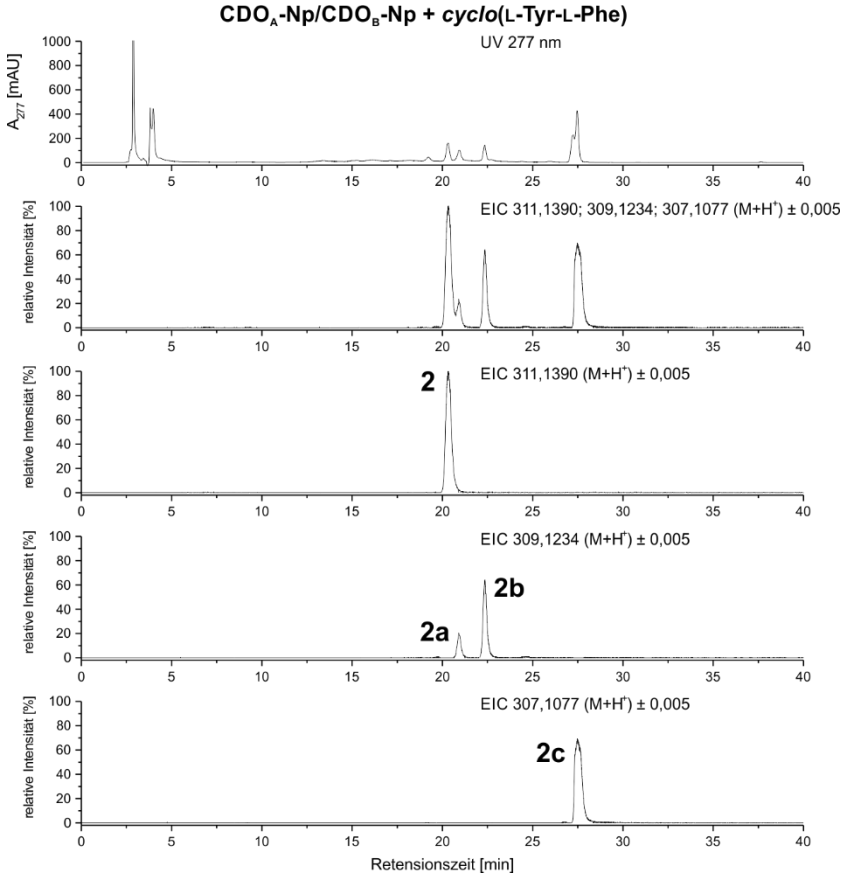


Abbildung 4-27: Biotransformation von cyclo(L-Tyr-L-Phe) durch CDO_A-Np und CDO_B-Np aus N. prasina NRRL B-16235.

Die zwei Produkte **2a** und **2b** deuten beide auf jeweils einfach dehydriertes *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) hin. Es stellte sich an dieser Stelle die Frage, an welchem Rest des 2,5-Diketopiperazin-Gerüstes die Doppelbindung jeweils eingeführt wurde. Zu diesem Zweck wurde die Fragmentierung der beiden Produkte im Vergleich zur Fragmentierung des protonierten Substrates analysiert (Anhang, Abbildung 7-2).

Bei der Analyse der Fragmentierung des protonierten Substrates **2** konnten bei dem $[M+H]^+$-Ion mit m/z = 311,1382 ($[M+H]^+$) bei 20,2 min die Fragmente mit m/z = 311,1384 ($[M+H]^+$), 283,1431 ($[M+H-CO]^+$), 238,1211 ($[M+H-CO-HCONH_2]^+$), 205,0964 ($[M+H-Substituent]^+$), 136,0751 ($[M+H-CO-Rest]^+$) und 120,0800 ($[M+H-CO-Rest]^+$) zugeordnet werden (Anhang, Abbildung 7-3). Das $[M+H]^+$-Ion von m/z = 309,1227 bei 20,8 min von **2a** wurde unter anderem in die beiden Fragmente m/z = 136,0742 ($[M+H-CO-Rest]^+$) und 203,0804 ($[M+H-Substituent]^+$) zerlegt (Anhang, Abbildung 7-4), während das $[M+H]^+$-Ion von m/z = 309,1228 bei 22,3 min von **2b** unter anderem die beiden markanten Fragmente mit m/z = 120,0736 ($[M+H-CO-Rest]^+$) und 134,0577 ($[M+H-CO-Rest]^+$) aufweist (Anhang, Abbildung 7-5). Diese Fragmentierung weist darauf hin, dass es sich bei **2a** um *cyclo*(L-Tyr-ΔPhe) und bei **2b** um *cyclo*(ΔTyr-L-Phe) handelt (Abbildung 4-28).

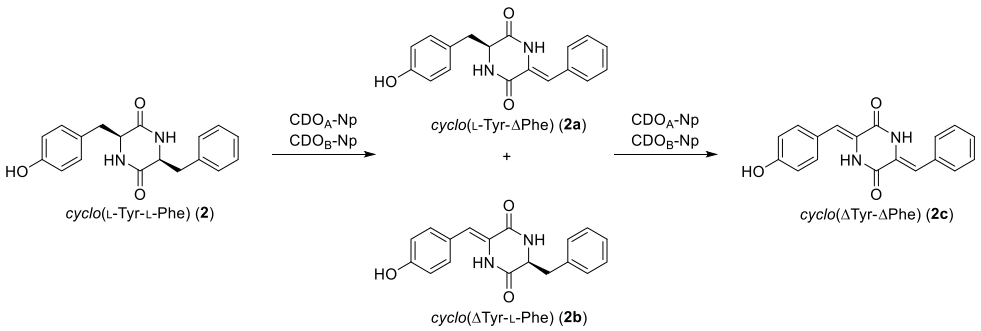


Abbildung 4-28: Enzymatische Umsetzung von cyclo*(L-Tyr-L-Phe) durch CDO_A-Np und CDO_B-Np.*

4.2.2.5 Analyse der Bildung von *E*- und *Z*-Isomeren der Produkte der enzymatischen Umsetzung von *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) durch CDO-Np

Im Kapitel 4.2.2.4 konnte bereits gezeigt werden, dass die CDO aus *N. prasina* aktiv ist und ihr Substrat sowohl in einfach als auch zweifach dehydrierte Produkte umsetzt. Da in den Strukturen dieser entstandenen Produkte eine bzw. zwei Doppelbindungen eingefügt wurden, besteht die Möglichkeit der Bildung von *E*- und *Z*-Isomeren. Um einen Hinweis hierauf zu erhalten, wurde erneut eine Biotransformation wie in Kapitel 3.7.6.1 beschrieben durchgeführt. Die Inkubationszeit der Kultur mit 1 mM *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) (cYF) wurde hierbei auf 4 Stunden reduziert. Auch hier konnten neben dem Substrat (cYF) zwei jeweils einfach dehydrierte Produkte (cYF-2H) sowie ein zweifach dehydriertes Produkt (cYF-4H) identifiziert werden (Abbildung 4-29, A und Anhang Tabelle 7-6). Dieselbe Probe wurde anschließend für 4 Stunden dem natürlichen Tageslicht ausgesetzt und ebenso mittels LC-MS analysiert. Nun konnten neben dem Substrat (cYF) drei jeweils einfach dehydrierte Produkte (cYF-2H) und zwei jeweils zweifach dehydrierte Produkte detektiert werden (Abbildung 4-29, B und Anhang Tabelle 7-7). Diese Ergebnisse zeigen, dass es durch die Dehydrierung der Substrate der CDO unter Einfluss von Licht zur Bildung von *E*- und *Z*-Isomeren der Produkte kommt.

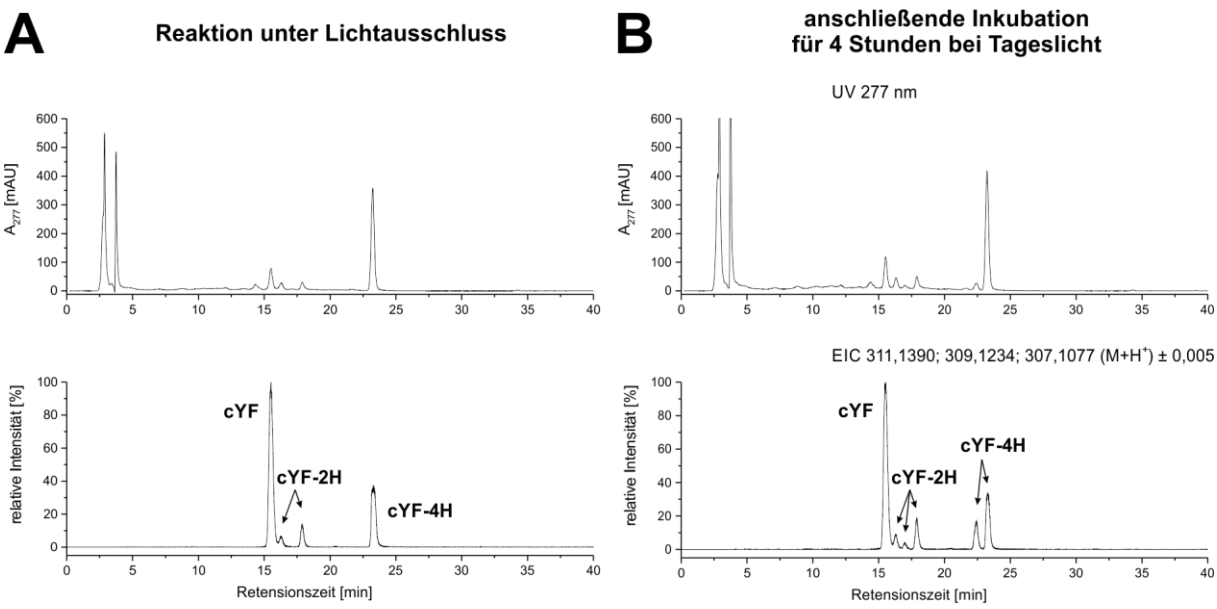


Abbildung 4-29: Analyse der Bildung von E- und Z-Isomeren der Produkte der Biotransformation von cyclo(L-Tyr-L-Phe) durch CDO_A-Np und CDO_B-Np aus N. prasina NRRL B-16235.

4.2.2.6 Klonierung der überlappenden Sequenz zur Überproduktion von His_6-CDO_A-Np und CDO_B-Np-His_6 in *E. coli*

Die Aktivität der CDO_A-Np und CDO_B-Np konnte in Kapitel 4.2.2.4 bereits gezeigt werden. Nun sollte geprüft werden, ob die Erweiterung der beiden Proteine um jeweils einen His_6-Tag ebenso zu der gewünschten CDO-Aktivität führen würde. Um die beiden Proteine CDO_A-Np und CDO_B-Np um jeweils einen C- bzw. N-terminalen His_6-Tag zu erweitern, wurde die entsprechende Sequenz basierend auf dem Konstrukt pKB54 mit Hilfe der beiden Oligonukleotide Np003b-for und Np004-rev mittels PCR amplifiziert. Das Oligonukleotid Np003b-for enthielt hierbei neben der eingefügten Restriktionsschnittstelle für NcoI, eine zusätzliche C-terminale für den His_6-Tag codierende Sequenz. Durch das Oligonukleotid Np004-rev dagegen wurde das Stoppcodon von *CDO_B-Np* deletiert und eine Restriktionsschnittstelle für BglII eingeführt. Auf diese Weise sollten die beiden überlappenden Gene die beiden Proteine His_6-CDO_A-Np und CDO_B-Np-His_6 codieren. Das entsprechende Fragment wurde in einer PCR mit der High Fidelity Polymerase mit einer Anlagerungstemperatur von 60 °C und einer Elongationszeit von 1 Minute erzeugt (Kapitel 3.6.3). Das entsprechende PCR-Produkt ist in Abbildung 4-30 dargestellt.

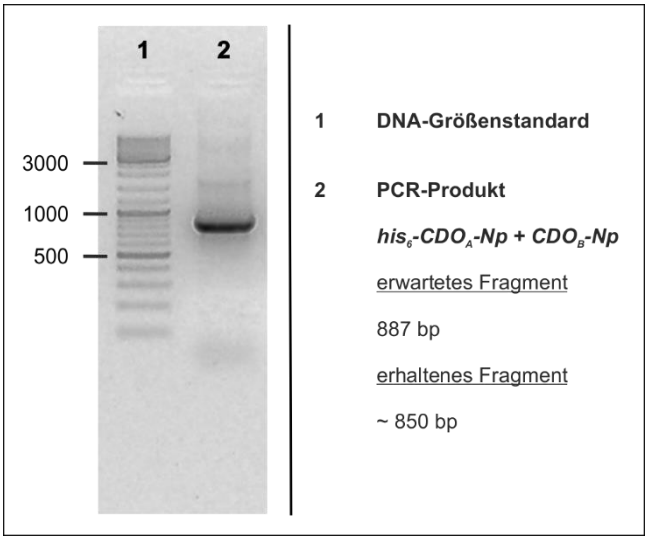


Abbildung 4-30: 1,25 %iges Agarosegele der Amplifikation von his_6-CDO_A-Np und CDO_B-Np mittels PCR.

Das so erzeugte PCR-Produkt wurde mittels TA-Klonierung in den linearisierten pGEM®-T Easy integriert und im Anschluss in *E. coli* XL10-Gold eingebracht. Nach der Auswahl sowie der anschließenden Kultivierung einiger Kolonien wurden deren Plasmide isoliert. Diese wurden einer Restriktion mit EcoRI unterzogen und die so entstandenen DNA-Fragmente mittels Elektrophorese aufgetrennt. Das Plasmid pKB79 (Abbildung 4-31, A) stimmte mit seinen Fragmenten mit den erwarteten Fragmenten von 907 und 2997 bp überein (Abbildung 4-31, B). Die Sequenz der überlappenden Gene konnte anschließend durch eine Sequenzierung bestätigt werden.

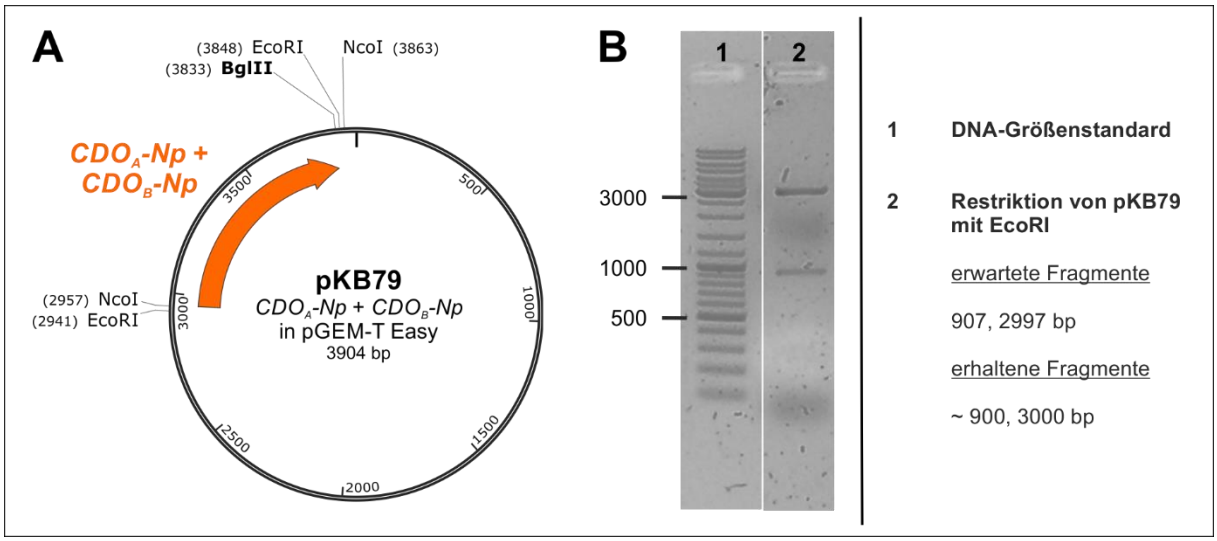


Abbildung 4-31: A: Plasmidkarte von pKB79 (CDO_A-Np und CDO_B-Np in pGEM®-T Easy). B: 1,25 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB79 mit EcoRI.

Es folgte eine Restriktion von pKB79 und pQE-60 mit NcoI und BglII. Im Anschluss daran wurden die DNA-Fragmente mittels Elektrophorese aufgetrennt, die entsprechenden Fragmente aus den Agarosegelen isoliert und anschließend miteinander ligiert. Dieser Ligationsansatz wurde mittels Hitzeschock in *E. coli* XL10-Gold eingebracht und anschließend Plasmide von einigen Kolonien isoliert. Zur Überprüfung der erfolgreichen Ligation wurde eine Restriktion mit NcoI und BglII durchgeführt. Die entstandenen Fragmente wurden dann mittels Elektrophorese in einem 1,25 %igen Agarosegel getrennt. Die Fragmente des Plasmides pKB83 (Abbildung 4-32, A) zeigten in ihren Größen hohe Übereinstimmungen mit den erwarteten Größen von 876 und 3417 bp (Abbildung 4-32, B). Die gewünschte Sequenz konnte auch hier durch eine Sequenzierung bestätigt werden.

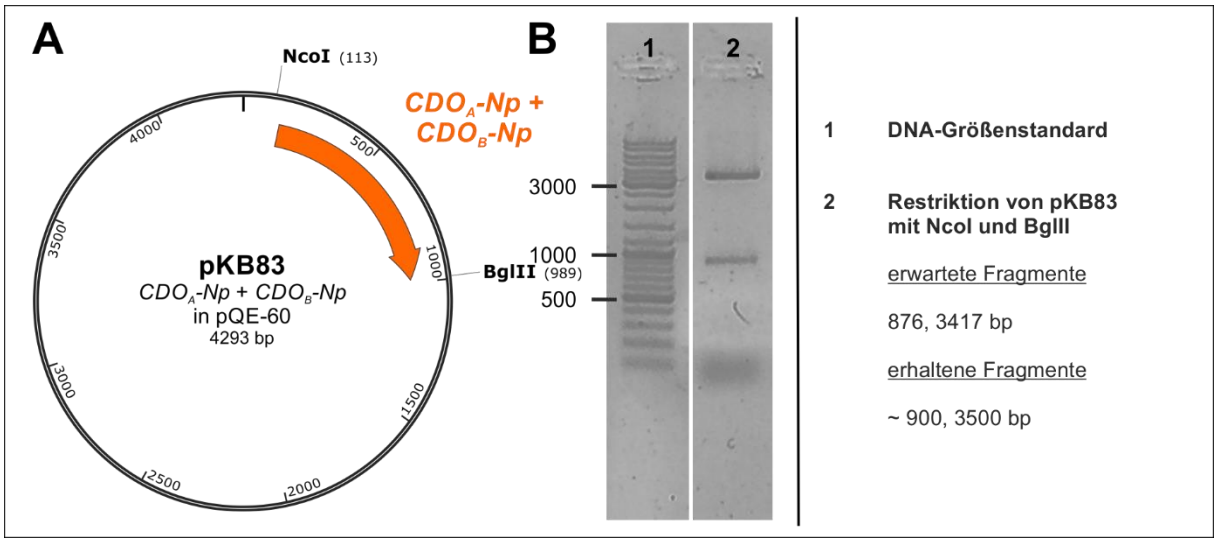


Abbildung 4-32: A: Plasmidkarte von pKB83 (CDO_A-Np und CDO_B-Np in pQE-60). B: 1,25 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB83 mit NcoI und BglII.

4.2.2.7 Biotransformation und Identifizierung der enzymatischen Produkte von His_6-CDO_A-Np und CDO_B-Np-His_6

Um die Funktionsfähigkeit der beiden Proteine His_6-CDO_A-Np und CDO_B-Np-His_6 zu überprüfen, wurde eine Biotransformation nach Kapitel 3.7.6.1 durchgeführt und nach einer Extraktion der Kulturen die entsprechende Produktbildung mittels LC-MS untersucht. Hierfür wurden *E. coli* M15 [PREP4] (Tabelle 3-21) Kulturen, welche zum einen zur Kontrolle pQE-60 und zum anderen pKB81 und pKB83 enthielten mit *cyclo*(L-Phe-L-Leu) versetzt. In Abbildung 4-33 sind die entsprechenden EICs dieser Proben mit m/z = 261,1598 $[M(cFL)+H]^+ \pm 0{,}02$, m/z = 259,1441 $[M(cFL\text{-}2H)+H]^+ \pm 0{,}02$ und m/z = 257,1285 $[M(cFL\text{-}4H)+H]^+ \pm 0{,}02$ wiedergegeben.

In der Kontrolle ist der Peak des Substrates (cFL) zu erkennen, hingegen kein weiterer Produktpeak. In der Probe der Biotransformation von cFL durch CDO_A-Np und CDO_B-Np (pKB81) sind neben dem Signal für das Substrat, zwei Peaks mit einem $[M+H]^+$-Ionen von jeweils einfach dehydriertem cFL (cFL-2H) sowie zwei Peaks mit einem $[M+H]^+$-Ionen von jeweils zweifach dehydriertem cFL (cFL-4H) zu finden (Anhang, Tabelle 7-8). CDO_A-Np und CDO_B-Np setzen das Substrat, bei 214 nm analysiert, zu 97 % zu cFL-2H und cFL-4H um. In der Probe der Biotransformation mit His_6-CDO_A-Np und CDO_B-Np-His_6 ist ebenso neben dem Substrat eine Produktbildung von zwei jeweils einfach dehydrierten (cFL-2H) und zwei jeweils zweifach dehydriertem cFL (cFL-4H) zu beobachten (Anhang, Tabelle 7-9). Die Umsetzung von cFL zu cFL-2H und cFL-4H beträgt hierbei lediglich 68 %. His_6-CDO_A-Np und CDO_B-Np-His_6 sind also im Zusammenspiel aktiv, wobei die Erweiterung der Proteine um jeweils einen His_6-Tag die Ausbeuten der Produkte beeinflusst.

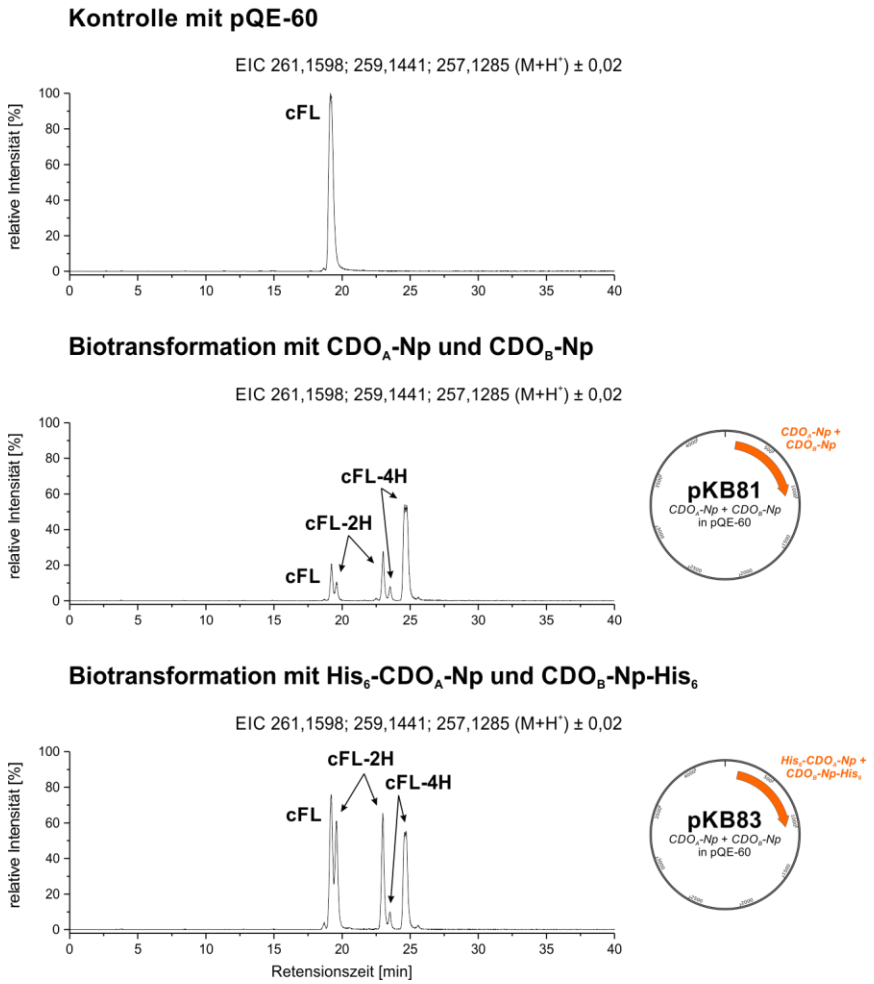


Abbildung 4-33: Biotransformation von cyclo(L-Phe-L-Leu) durch CDO_A-Np und CDO_B-Np bzw. His_6-CDO_A-Np und CDO_B-Np-His_6 aus N. prasina NRRL B-16235.

4.2.2.8 Überproduktion und Reinigung von His_6-CDO_A-Np und CDO_B-Np-His_6

Zunächst wurde das Plasmid pKB83 mittels Hitzeschock in calciumkompetente *E. coli* M15 [PREP4] (Kapitel 3.6.9.2) eingebracht. Diese wurden anschließend in LB-Medium bei 37 °C und schüttelnd kultiviert und die entsprechende Überproduktion von His_6-CDO_A-Np und CDO_B-Np-His_6 mit 1 mM IPTG für 16 Stunden induziert (Kapitel 3.6.11.2). Im Anschluss daran wurde der Proteinrohextrakt aus *E. coli* gewonnen (Kapitel 3.7.1) und aus diesem eine Reinigung der Hexahistidin-Fusionsproteine mittels Nickel-Affinitätschromatographie vorgenommen (Kapitel 3.7.2).

In Abbildung 4-34 ist das Ergebnis der Überproduktion von His_6-CDO_A-Np und CDO_B-Np-His_6 sowie der Reinigung der Proteine nach erfolgter Trennung durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung (Kapitel 3.7.3) dargestellt. In der Spur 3 ist im Gesamtprotein nach erfolgter Induktion der Proteinüberproduktion eine deutliche Proteinbande mit einer Größe von etwa 20 kDa zu erkennen, welche in Spur 2 des Gesamtproteins vor entsprechender Induktion nicht in solcher Intensität auftritt. Diese deutet auf die erfolgreiche Überproduktion von His_6-CDO_A-Np mit einer berechneten Größe von 21 kDa hin. Eine entsprechende Proteinbande ist ebenso in der Spur 4, welche dem unlöslichen Protein entspricht, in etwas geringerer Intensität zu erkennen. Diese Proteinbande ist jedoch weder in der Spur der löslichen Proteine (Spur 5), noch in der Durchflussfraktion (6), der Waschfraktion (7) oder der Elutionsfraktion (8) sowie der Elutionsfraktion nach einem Pufferwechsel (9) zu beobachten. Eine entsprechende Proteinbande von CDO_B-Np-His_6 mit einer berechneten Größe von 12 kDa ist in keiner der Fraktionen zu erkennen.

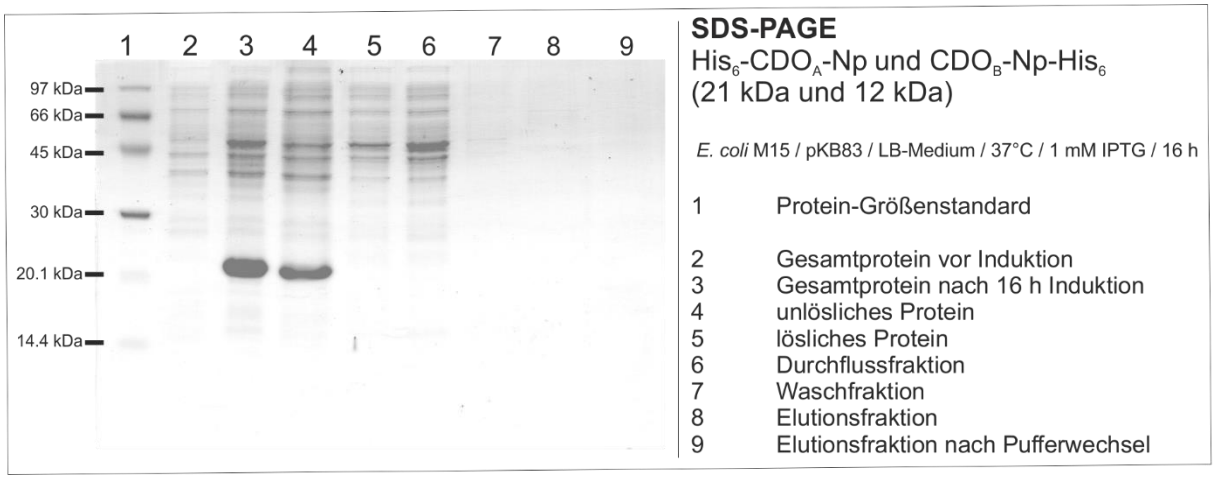


Abbildung 4-34: Analyse der Überproduktion von His_6-CDO_A-Np und CDO_B-Np-His_6 (pKB83) in E. coli M15 und Reinigung der Hexahistidin-Fusionsproteine durch Nickel-Affinitätschromatographie nach erfolgter Trennung mittels SDS-PAGE.

In dieser Analyse wurden dieselben Bedingungen der Kultivierung und der Induktion der Proteinüberproduktion von His_6-CDO_A-Np und CDO_B-Np-His_6 gewählt, mit denen in Kapitel 4.2.2.4 im Rahmen einer anschließenden Biotransformation die Aktivität dieser CDO nachgewiesen werden konnte. Für eine gewünschte Reinigung der Proteine bedarf es gegebenenfalls einer Optimierung.

4.2.2.9 Klonierung der getrennten Sequenzen in einen Vektor zur Überproduktion von CDO_A-Np und CDO_B-Np in *E. coli*

Mit Hilfe der beiden Konstrukte pKB81 (Kapitel 4.2.2.3) und pKB83 (Kapitel 4.2.2.6) konnte bereits die Aktivität von CDO_A-Np und CDO_B-Np nachgewiesen werden. In beiden Fällen wurde mit der überlappenden Sequenz von *CDO_A-Np* und *CDO_B-Np* gearbeitet. Aufgrund der polycistronischen Operons in Prokaryonten, können dementsprechend von einer polycistronischen mRNA die beiden Proteine CDO_A-Np und CDO_B-Np in *E. coli* translatiert werden. Im Verlauf dieser Arbeit hat sich, wie bereits erwähnt, die Annotierung in der NCBI Datenbank von CDO_B-Np beginnend mit WP_017544374.1 bestehend aus 101 bp in WP_026129216.1 mit 105 bp geändert. Basierend auf den beiden Konstrukten pKB81 und pKB83 war es nicht möglich eine Aussage über die richtige Annotierung zu treffen. An dieser Stelle wurde ein Konstrukt für die separate Herstellung von CDO_A-Np und CDO_B-Np durch einen Vektor erstellt. Hierfür wurden zunächst die beiden Gene *CDO_A-Np* und *CDO_B-Np* getrennt voneinander in pGEM®-T Easy kloniert (pKB140 und pKB141) und anschließend beide Gene in einem pQE-60 zur Expression in *E. coli* zusammengefügt (pKB158). Es wurde zusätzlich mittels PCR eine ribosomale Bindestelle (RBS) zwischen das 3'-Ende von *CDO_A-Np* und das 5'-Ende von *CDO_B-Np* gesetzt sowie vorbereitend auf weitere mögliche Experimente eine weitere RBS hinter das 3'-Ende von *CDO_B-Np* (Abbildung 4-35).

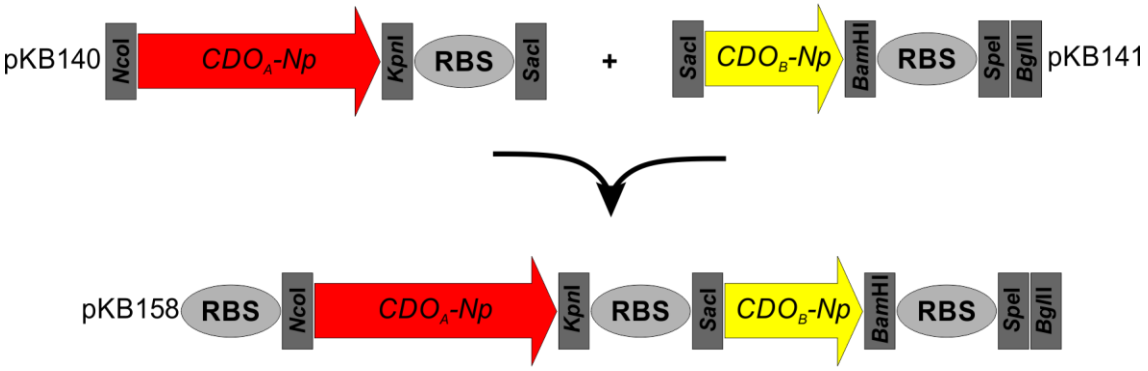


Abbildung 4-35: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie von pKB158.

Die getrennten Sequenzen von *CDO_A-Np* und *CDO_B-Np* wurden jeweils in einer PCR mit der High Fidelity Polymerase mit Hilfe der Oligonukleotide Np018-for und Np018-rev bzw. Npo19-for und Np019-rev von pKB81 als Template amplifiziert. Die beiden Fragmente wurden hierbei jeweils mit einer Anlagerungstemperatur von 60 °C und einer Elongationszeit von 30 Sekunden erzeugt (Kapitel 3.6.3).

Das Oligonukleotid Np0018-for enthielt eine N-terminal von *CDO_A-Np* eingefügte Restriktionsschnittstelle für NcoI, während Np018-rev C-terminal von *CDO_A-Np* eine Restriktionsschnittstelle für KpnI, die Sequenz 5'-AGAGGA-3' (RBS) sowie weitere Restriktionsschnittstellen für SacI und BamHI beinhaltete.

Das so generierte DNA-Fragment wurde in pGEM®-T Easy integriert und resultierte in dem Konstrukt pKB140 (Abbildung 4-36, A).

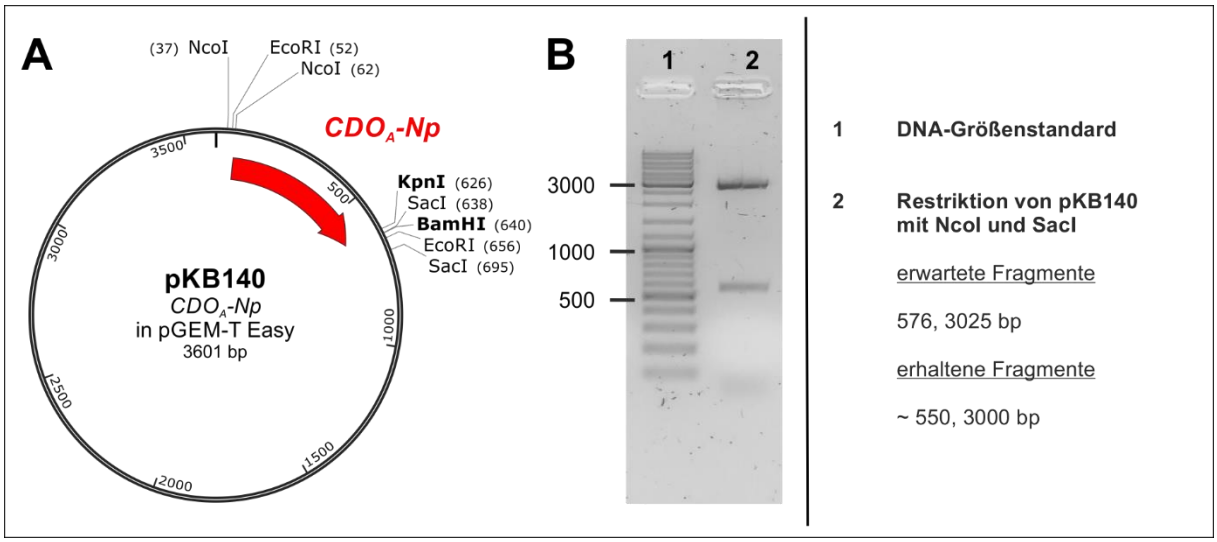


Abbildung 4-36: A: Plasmidkarte von pKB140 (CDO$_A$-Np in pGEM®-T Easy). B: 1,5 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB140 mit NcoI und SacI.

Durch das Oligonukleotid Np019-for wurde C-terminal von *CDO$_B$-Np* eine Restriktionsschnittstelle für SacI und durch Np019-rev eine Restriktionsschnittstelle für BamHI, die Sequenz 5'-AGAGGA-3' (RBS) und zwei weitere Schnittstellen für SpeI und BglII eingeführt. Das auf diese Weise amplifizierte DNA-Fragment wurde ebenfalls in pGEM®-T Easy eingefügt, welches in pKB141 endete (Abbildung 4-37, A).

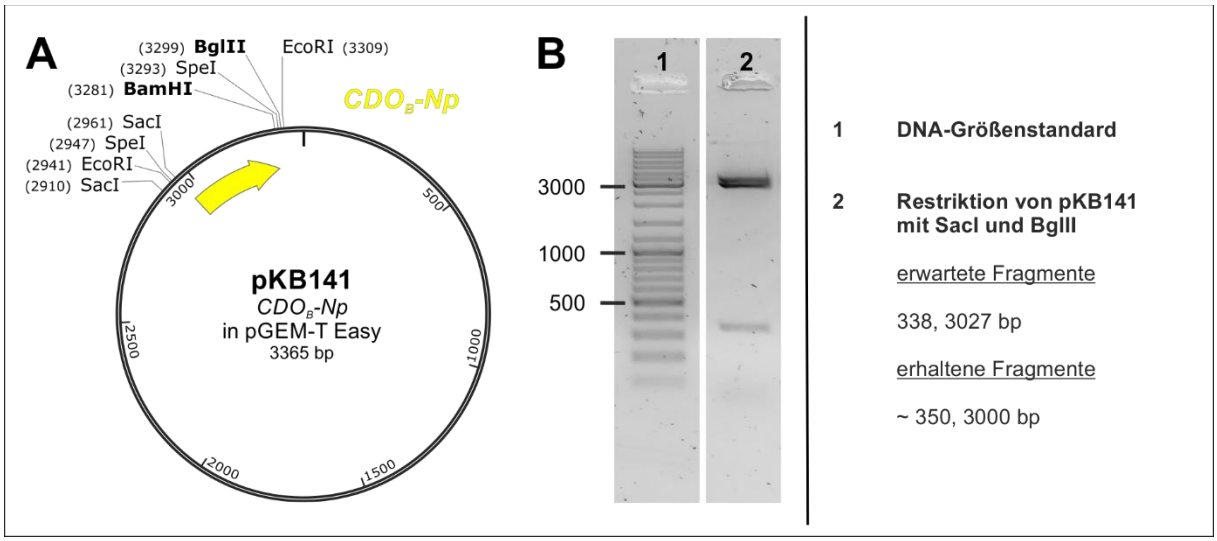


Abbildung 4-37: A: Plasmidkarte von pKB141 (CDO$_B$-Np in pGEM®-T Easy). B: 1,5 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB141 mit SacI und BglII.

Nach dem Einbringen der Ligationsansätze in *E. coli* XL10-Gold wurden wieder einige Kolonien kultiviert und deren Plasmide isoliert. Zur Kontrolle der erfolgten Klonierungen, wurden die beiden Konstrukte pKB140 und pKB141 einer Restriktion mit NcoI und SacI bzw. mit SacI und BglII unterzogen und die so entstandenen DNA-Fragmente anschließend mittels Elektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt.

In beiden Fällen stimmten die Größen der erhaltenen Fragmente mit den Erwartungen überein (Abbildung 4-36, B bzw. Abbildung 4-37, B). Eine Sequenzierung bestätigte im Anschluss die jeweils gewünschte Sequenz.

Um die Sequenz von *CDO$_A$-Np* in pQE-60 zu klonieren, wurde sowohl das pKB140 als auch pQE-60 mit NcoI und BamHI geschnitten. Nach der Trennung der DNA-Fragmente mittels Elektrophorese in einem Agarosegel, wurden die beiden gewünschten Fragmente isoliert und miteinander ligiert. Nach dem Einbringen des Ligationsansatzes in *E. coli* XL10-Gold wurden einige Kolonien kultiviert und anschließend deren Plasmide isoliert. Es erfolgte eine Restriktion mit NcoI und BamHI. Die Größen der Fragmente des Plasmides pKB157 (Abbildung 4-38, A) stimmten mit den erwarteten Größen von 578 und 3423 bp überein (Abbildung 4-38, B).

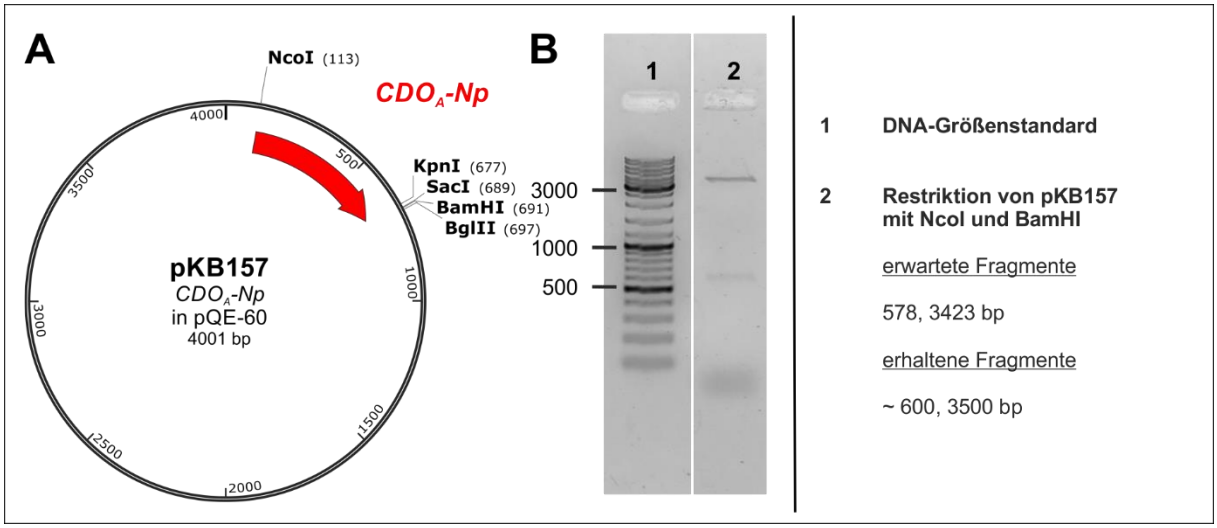


Abbildung 4-38: A: Plasmidkarte von pKB157 (CDO$_A$-Np in pQE-60). B: 1,5 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB157 mit NcoI und BamHI.

Um hingegen *CDO$_A$-Np* und *CDO$_B$-Np* in pQE-60 zusammenzufügen, wurden pQE-60 mit NcoI und BglII, pKB140 mit NcoI und SacI und pKB141 mit SacI und BglII geschnitten. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden in einem Agarosegel mittels Elektrophorese aufgetrennt und anschließend die gewünschten drei DNA-Fragmente jeweils isoliert. Es wurde ein Ligationsansatz mit allen drei Fragmenten angesetzt und dieser im Anschluss mittels Hitzeschock in *E. coli* XL10-Gold eingebracht. Nach der Kultivierung einiger Kolonien wurden deren Plasmide isoliert und einer Restriktion mit NcoI und BamHI unterzogen. Das Plasmid pKB158 (Abbildung 4-39, A) brachte nach erfolgter Auftrennung entsprechende DNA-Fragmente mit der erwarteten Größe von 896 und 3435 bp hervor (Abbildung 4-39, B). In einer anschließenden Sequenzierung konnten die beiden gewünschten Sequenzen der jeweiligen Inserts bestätigt werden.

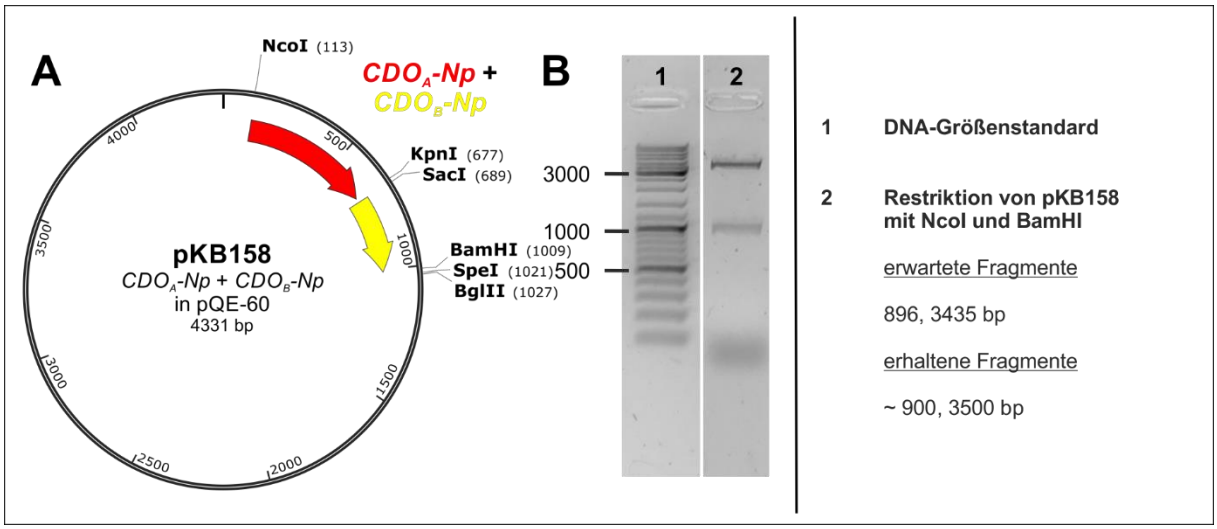


Abbildung 4-39: A: Plasmidkarte von pKB158 (CDO$_A$-Np und CDO$_B$-Np in pQE-60). B: 1,5 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB158 mit NcoI und BamHI.

4.2.2.10 Biotransformation und Identifizierung der enzymatischen Produkte von CDO$_A$-Np und CDO$_B$-Np

Im Folgenden wurde eine Biotransformation nach Kapitel 3.7.6.1 durchgeführt. Hierbei wurden drei Konstrukte parallel beobachtet. Zum einen pKB157, welches lediglich das Gen der CDO$_A$-Np enthält, und zum anderen pKB158, welches *CDO$_A$-Np* und *CDO$_B$-Np* getrennt voneinander beinhaltet sowie pKB81, welches die überlappende Sequenz von *CDO$_A$-Np* und *CDO$_B$-Np* enthält.

Im Weiteren sind die entsprechenden Resultate der Umsetzung von *cyclo*(L-Tyr-L-Tyr) (Abbildung 4-40, A) und *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) (Abbildung 4-40, B) dargestellt. In der Biotransformation basierend auf dem Konstrukt pKB157 ist weder mit **1** noch mit **2** eine enzymatische Umsetzung zu beobachten (Anhang, Tabelle 7-10, Abbildung 7-6 und Abbildung 7-7). Dies bestätigt die Notwendigkeit des Zusammenwirkens von CDO$_A$-Np und CDO$_B$-Np und dient gleichzeitig als Kontrolle.

Die beiden Proteine CDO$_A$-Np und CDO$_B$-Np, welche voneinander getrennten Genen in pKB158 translatiert werden, führen zur Umsetzung von **1** zu einem einfach dehydrierten Produkt **1a** und einem zweifach dehydrierten Produkt **1b** (Anhang, Tabelle 7-11). Dieselben Produkte werden von CDO$_A$-Np und CDO$_B$-Np, welche durch die überlappenden Gene in pKB81 codiert sind, synthetisiert (Anhang, Tabelle 7-12). Das Substrat (**1**) wurde, bei 277 nm im UV-Chromatogramm beobachtet, zu 48 % (pKB158) bzw. zu 50 % (pKB81) zu einfach und zweifach dehydrierten Produkten umgesetzt. Das Verhältnis zwischen **1**, **1a** und **1b** beträgt hierbei 6,1:2,3:1 (pKB158) bzw. 7,0:2,6:1 (pKB81).

Das Substrat **2** wird von CDO_A-Np und CDO_B-Np, sowohl in pKB158 (Anhang, Tabelle 7-11, Abbildung 7-8 bis Abbildung 7-10) als auch in pKB81 (Anhang, Tabelle 7-12, Abbildung 7-11 bis Abbildung 7-13) zu **2a**, **2b** und **2c** umgesetzt. Hierbei wurde das Substrat (**2**), bei 277 nm im UV-Chromatogramm beobachtet, zu 14 % (pKB158) bzw. zu 31 % (pKB81) zu einfach und zweifach dehydrierten Produkten umgesetzt. Trotz des etwas voneinander abweichenden Gesamtumsatz dieser beiden Reaktionen, ähnelt sich das Verhältnis wieder zwischen **2**, **2a**, **2b** und **2c** von 1,1:1,3:1,5:1 (pKB158) bzw. 1,1:1,2:1,4:1 (pKB81).

Diese Ergebnisse bestätigen zum einen die Notwendigkeit des Zusammenspiels zwischen CDO_A-Np und CDO_B-Np, zum anderen die Funktionalität der in der NCBI Datenbank annotierten Proteine WP_017544373.1 (CDO_A-Np) und WP_026129216.1 (CDO_B-Np).

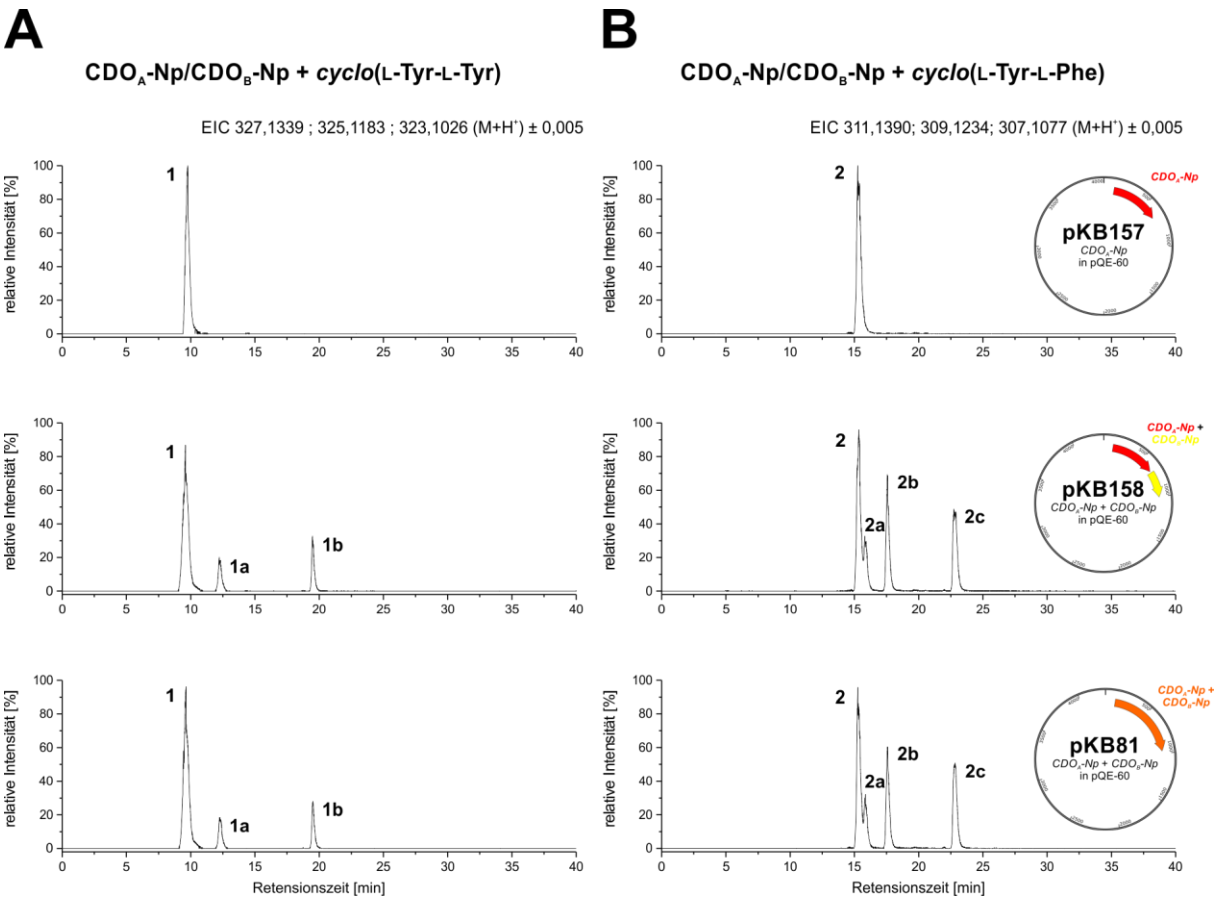


Abbildung 4-40: Biotransformation von cyclo(L-Tyr-L-Tyr) (1) (A) und cyclo(L-Tyr-L-Phe) (2) (B) durch CDO_A-Np und CDO_B-Np aus N. prasina NRRL B-16235.

4.2.2.11 Klonierung der getrennten Sequenzen in getrennte Vektoren zur Überproduktion von CDO_A-Np-His_6 und CDO_B-Np-His_6 in *E. coli*

In Kapitel 4.2.2.10 konnte gezeigt werden, dass die beiden Gene der CDO_A-Np und CDO_B-Np getrennt voneinander exprimiert zusammen zu der gewünschten CDO-Aktivität führen. Nun sollten die beiden Gene *CDO_A-Np* und *CDO_B-Np* jeweils in einzelnen Vektoren exprimieren werden.

Hierfür wurden beide Gene von einer High Fidelity Polymerase mittels PCR anhand von genomischer DNA amplifiziert. Für die Amplifikation von *CDO_A-Np* wurden hierbei die Oligonukleotide Np003-for und Np003-rev verwendet, während Np004-for und Np004-rev für die Generierung von *CDO_B-Np* genutzt wurden. Die Oligonukleotide Np003-for bzw. Np004-for enthielten hierbei jeweils eine Restriktionsschnittstelle für NcoI und Np003-rev bzw. Np004-rev jeweils eine für BglII. Bei der PCR wurde jeweils eine Anlagerungstemperatur von 55 °C und einer Elongationszeit von 30 Sekunden Minuten verwendet (Kapitel 3.6.3). Die beiden entstandenen PCR-Produkte sind in Abbildung 4-41 zu erkennen.

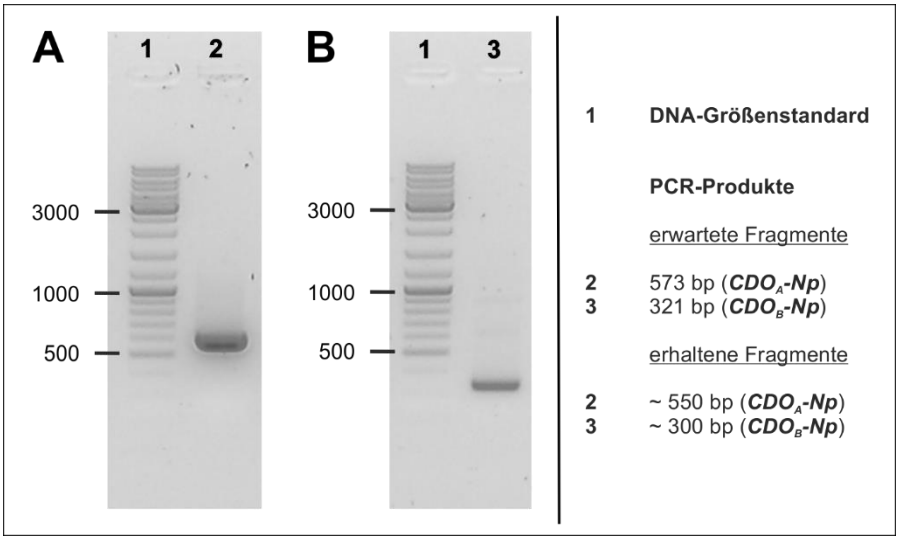


Abbildung 4-41: 1 %iges Agarosegele der Amplifikation von CDO_A-Np (A) und CDO_B-Np(B) mittels PCR aus gDNA von N. prasina.

Die beiden resultierenden DNA-Fragmente wurden jeweils in pGEM®-T Easy ligiert und mittels Hitzeschock in *E. coli* XL10-Gold eingebracht und entsprechende Kolonien kultiviert. Die daraus isolierten Plasmide pKB31 und pKB32 (Abbildung 4-42, A und Abbildung 4-43, A) wurden einer Restriktion mit EcoRI unterzogen, die entstandenen Fragmente mittels Elektrophorese aufgetrennt und das jeweils resultierende Fragmentmuster anhand deren Größe untersucht. Die Fragmente von pKB31 entsprachen in ihrer Größe den erwarteten Größen von 593 und 2997 bp, während die Fragmente von pKB32 mit den Größen von 341 und 2997 bp übereinstimmten (Abbildung 4-42, B und Abbildung 4-43, B). Die Identität der beiden Sequenzen wurde anschließen ebenso durch eine Sequenzierung bestätigt.

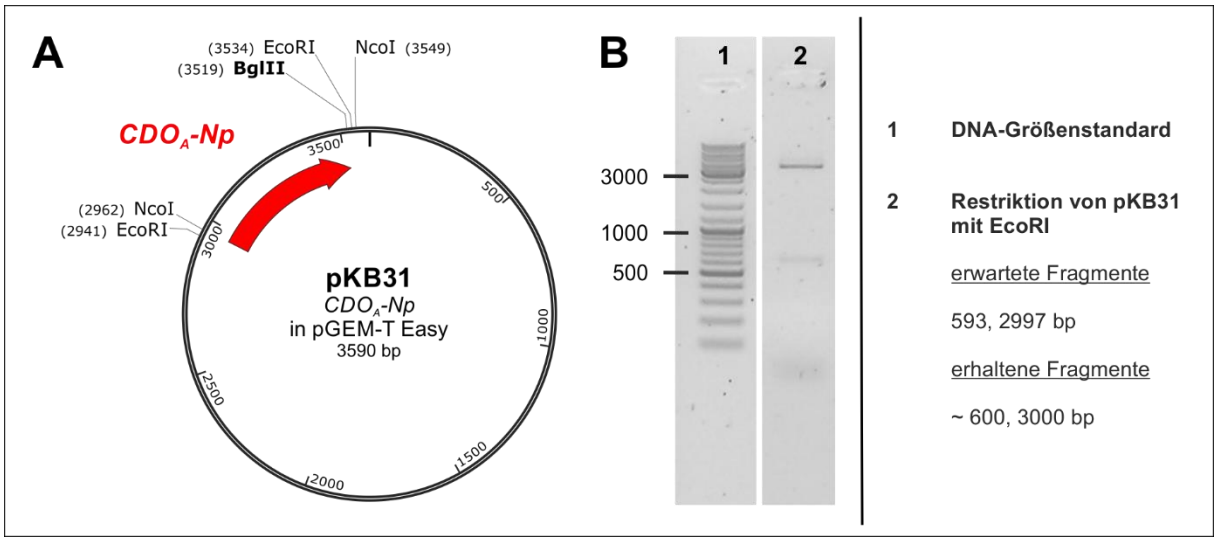


Abbildung 4-42: A: Plasmidkarte von pKB31 (CDO$_A$-Np in pGEM®-T Easy). B: 1,5 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB31 mit EcoRI.

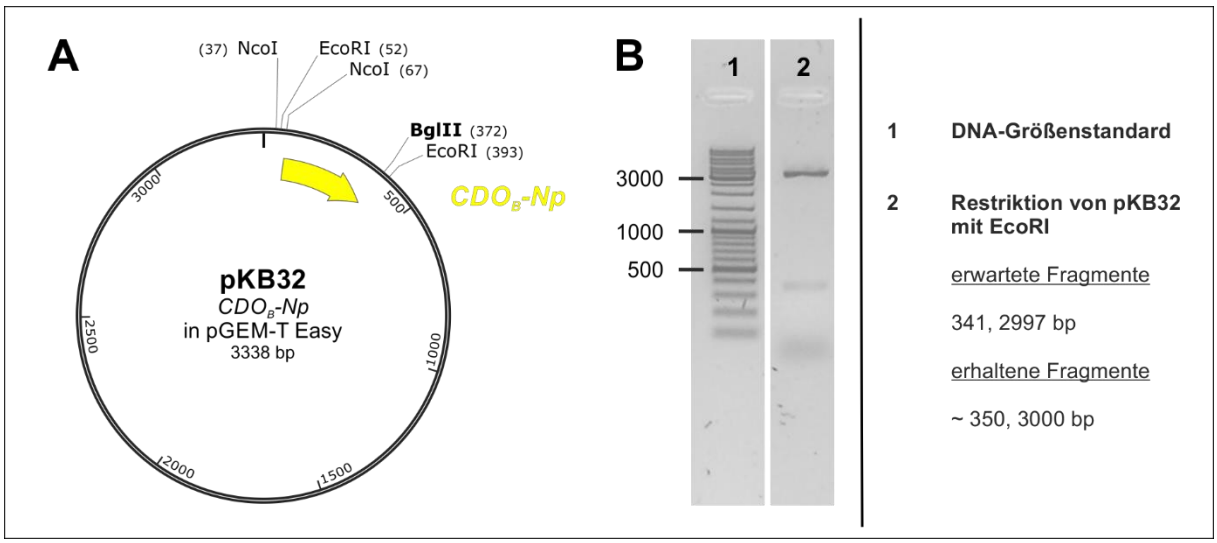


Abbildung 4-43: A: Plasmidkarte von pKB32 (CDO$_B$-Np in pGEM®-T Easy). B: 1,5 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB32 mit EcoRI.

Zur Klonierung dieser Gene in pQE-60, wurden die Plasmide pKB31 und pKB32 sowie pQE-60 einer Restriktion mit NcoI und BglII unterzogen und anschließend entsprechend ligiert. Es folgte das Einbringen in *E. coli* XL10-Gold mittels Hitzeschock, die Kultivierung einiger Kolonien sowie die Isolierung einiger Plasmide. Zur Kontrolle der resultierenden Konstrukte pKB33 (Abbildung 4-44, A) und pKB34 (Abbildung 4-45, A) wurde jeweils eine Restriktion mit NcoI und BglII durchgeführt. Die Größen der jeweiligen aufgetrennten Fragmente entsprachen den berechneten Größen von 557 und 3417 bp bzw. 305 und 3417 bp (Abbildung 4-44, B und Abbildung 4-45, B). Auch hier wurden die Sequenzen der beiden Gene erneut durch eine Sequenzierung kontrolliert.

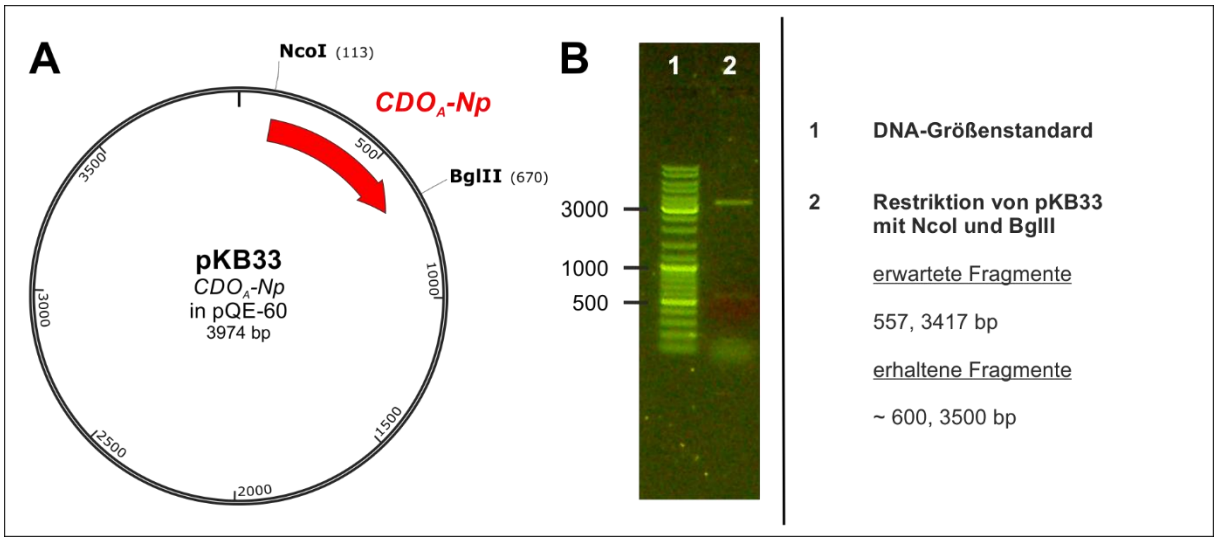


Abbildung 4-44: A: Plasmidkarte von pKB33 (CDO$_A$-Np in pQE-60). B: 1,5 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB33 mit NcoI und BglII.

.

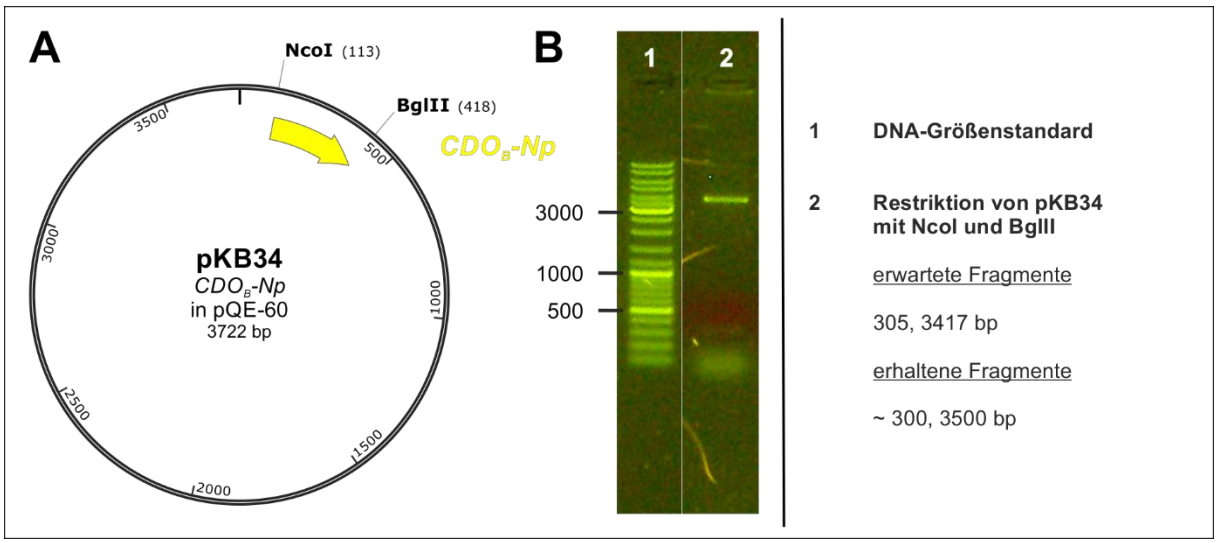


Abbildung 4-45: A: Plasmidkarte von pKB34 (CDO$_B$-Np in pQE-60). B: 1,5 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB34 mit NcoI und BglII.

Zusätzlich dazu wurden die beiden durch Restriktion von pKB31 und pKB32 mit NcoI und BglII erhaltene Fragmente in einen mit NcoI und BamHI geöffneten pKB60 (pHis8-Derivat) integriert. Die entsprechenden Ligationsansätze wurden mittels Transformation durch Hitzeschock in *E. coli* XL1-Blue eingebracht. Zur Überprüfung der gewünschten Ligation wurden die isolierten Plasmide einer Restriktion mit NcoI und XhoI unterzogen. Die beiden Plasmide pKB64 (Abbildung 4-46, A) und pKB65 (Abbildung 4-47, A) entsprachen in ihren Fragmentgrößen den Erwartungen von 563 und 5286 bp bzw. 311 und 5286 bp (Abbildung 4-46,B und Abbildung 4-47, B).

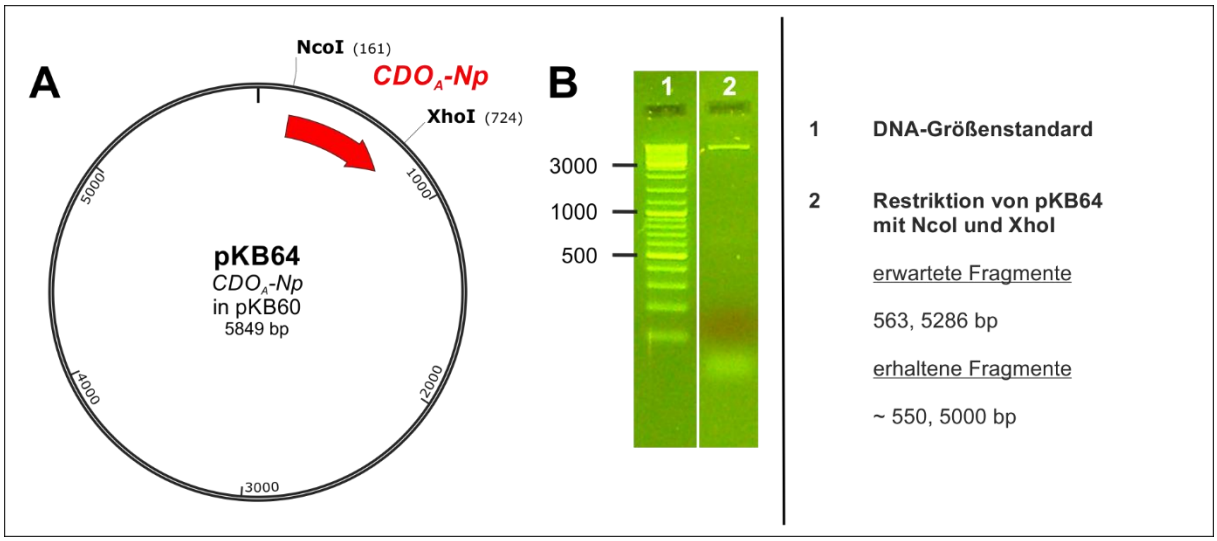


Abbildung 4-46: Plasmidkarte von pKB64 (CDO$_A$-Np in pKB60). B: 1,5 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB64 mit NcoI und XhoI.

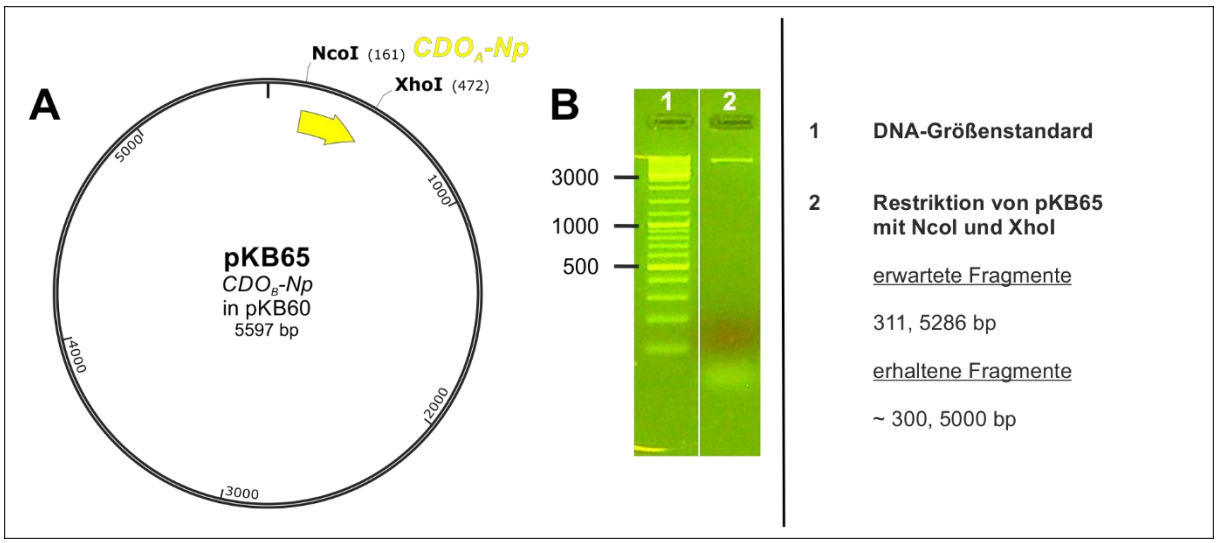


Abbildung 4-47: Plasmidkarte von pKB65 (CDO$_B$-Np in pKB60). B: 1,5 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB65 mit NcoI und XhoI.

4.2.2.12 Klonierung der getrennten Sequenzen in getrennte Vektoren zur Überproduktion von Ndas_1146-His_6 und Ndas_1147-His_6 in *E. coli*

Um einen besseren Einblick und gleichzeitig Aufschluss über die Bedeutung der einzelnen Untereinheiten zu erhalten, wurden die Gene der jeweiligen Untereinheiten der bekannten CDO Ndas_1146 und Ndas_1147 aus *N. dassonvillei* auf analoge Weise kloniert.

So wurden *ndas_1146* und *ndas_1147* mittels PCR amplifiziert. Mit Hilfe der Oligonukleotide Nd001-for und Nd001-rev bzw. Nd002-for und Nd002-rev wurden die beiden Restriktionsschnittstellen für NcoI und BglII eingefügt und die entsprechenden PCR-Produkte in pGEM®-T Easy, resultierend in pKB18 und pKB19, kloniert. Nach der Restriktion von pKB18, pKB19 und pQE-60 mit NcoI und BglII wurden die beiden Gene, resultierend in pKB23 (Abbildung 4-48) und pKB24 (Abbildung 4-49), zur Expression in *E. coli* kloniert.

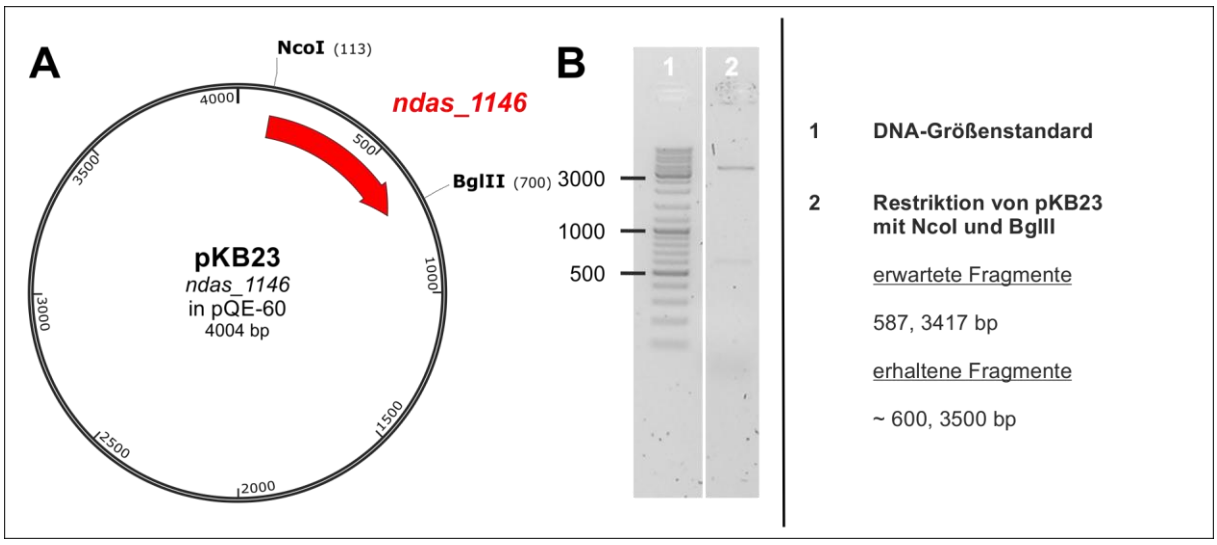


Abbildung 4-48: Plasmidkarte von pKB23 (ndas_1146 in pQE-60). B: 1,5 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB23 mit NcoI und BglII.

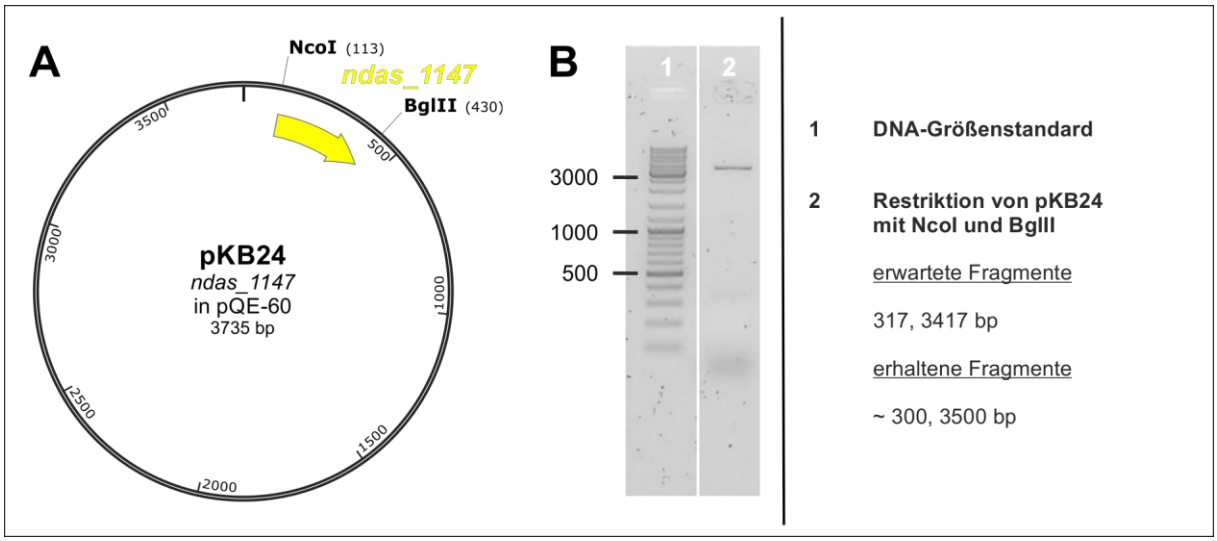


Abbildung 4-49: Plasmidkarte von pKB24 (ndas_1147 in pQE-60). B: 1,5 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB24 mit NcoI und BglII.

Um die beiden Gene in pHis8 zu klonieren, wurde zunächst *ndas_1146* mittels PCR amplifiziert. Durch die Oligonukleotide Nd001-for und Nd001b-rev wurden die Restriktionsschnittstellen für NcoI bzw. BamHI und XhoI eingeführt und das entsprechende DNA-Fragment in pGEM®-T Easy kloniert. Das so entstandene Plasmid pKB59 (Abbildung 4-50 und Abbildung 4-51) sowie pHis8 wurden dann mit NcoI und XhoI restringiert und die erhaltenen Fragmente miteinander ligiert. Nach der Isolierung des Plasmides pKB60 (Abbildung 4-52) wurde dieses durch Restriktion mit NcoI und XhoI sowie später durch eine Sequenzierung überprüft.

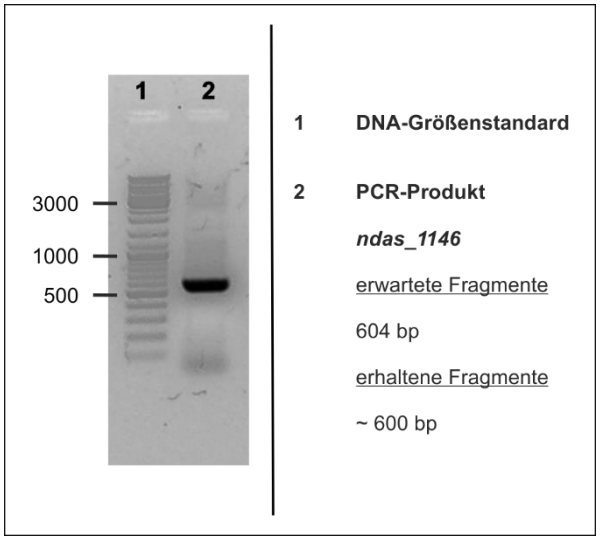


Abbildung 4-50: 1,5 %iges Agarosegele der Amplifikation von ndas_1146 aus pKB18.

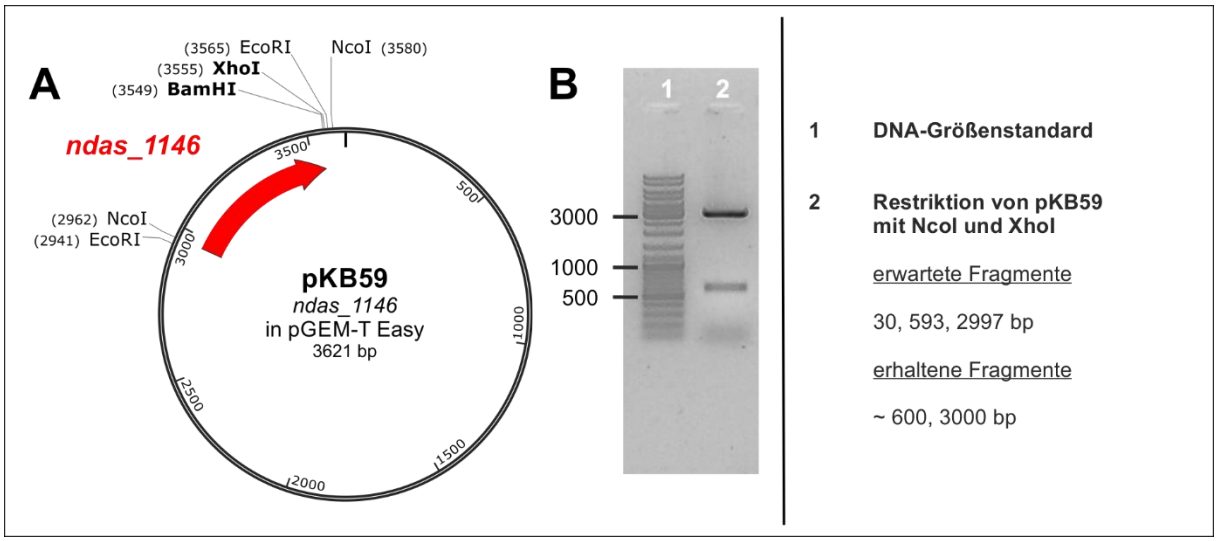


Abbildung 4-51: Plasmidkarte von pKB59 (ndas_1146 in pGEM-T® Easy). B: 1 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB59 mit NcoI und XhoI.

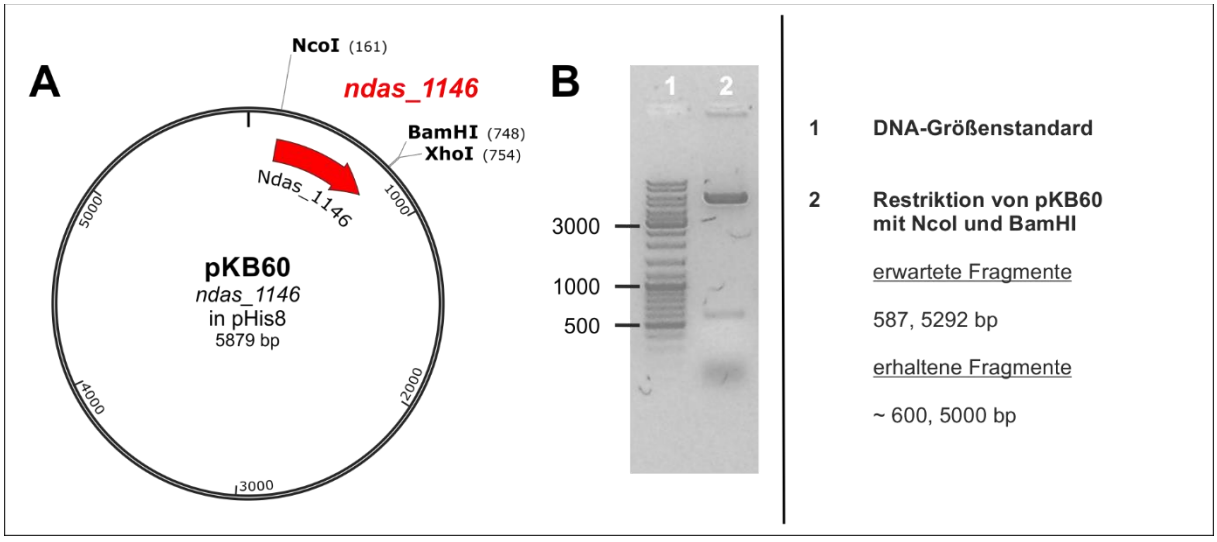


Abbildung 4-52: Plasmidkarte von pKB60 (ndas_1146 in pHis8). B: 1 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB60 mit NcoI und BamHI.

Aufgrund der zusätzlich in pKB60 eingefügten Restriktionsschnittstelle für BamHI, konnte nun im Falle der Klonierung von *ndas_1147* das bereits durch Restriktion von pKB19 mit NcoI und BglII erhaltene DNA-Fragment verwendet werden. Dieses wurde nun in einen mit NcoI und BamHI behandelten pKB60, resultierend in pKB62 (Abbildung 4-53), kloniert.

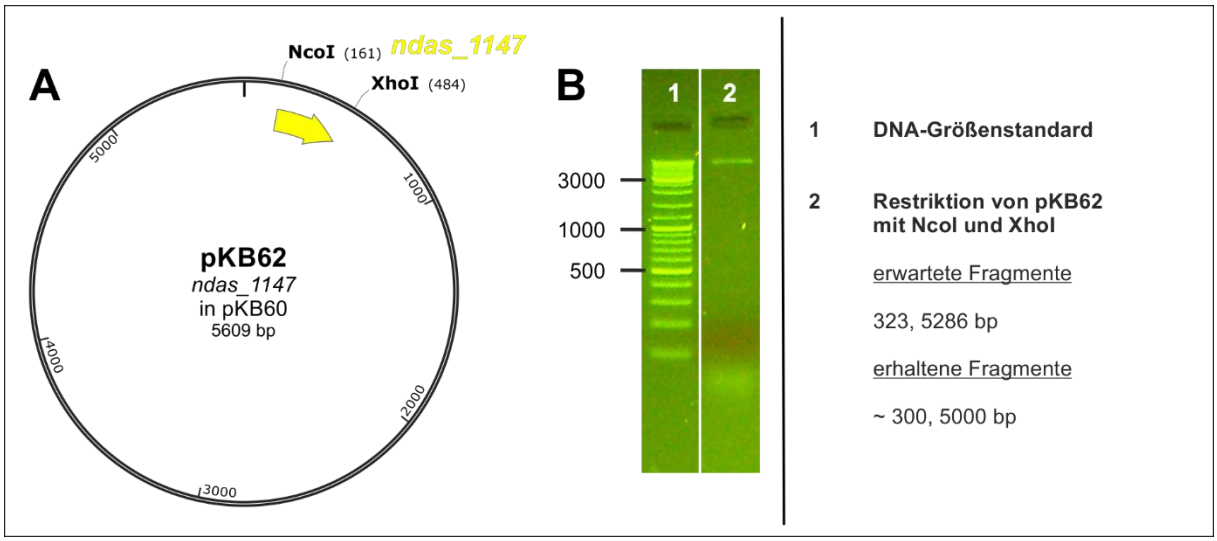


Abbildung 4-53: Plasmidkarte von pKB62 (ndas_1147 in pKB60). B: 1,5 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB62 mit NcoI und XhoI.

4.2.2.13 Überproduktion von CDO_A-Np-His_6, CDO_B-Np-His_6, Ndas_1146-His_6 und Ndas_1147-His_6 in *E. coli*

Zur Überproduktion stehen die Konstrukte pKB33, pKB34, pKB64 und pKB65 für CDO_A-Np-His_6 und CDO_B-Np-His_6 (Kapitel 4.2.2.11) sowie pKB23, pKB24, pKB60 und pKB62 für Ndas_1146-His_6 und Ndas_1147-His_6 (Kapitel 4.2.2.12) zur Verfügung.

Zunächst wurden die Plasmide, auf dem Grundgerüst von pQE-60 basierend, mittels Hitzeschock in calciumkompetente *E. coli* M15 [PREP4] (Kapitel 3.6.9.2) eingebracht. Die Kultivierung erfolgte schüttelnd in LB-Medium bei 37 °C, während die Überproduktion der gewünschten Proteine mit 1 mM IPTG für 16 Stunden induziert wurde (Kapitel 3.6.11.2). Nach anschließender Reinigung der Proben (Kapitel 3.7.1 und 3.7.2) waren nach der Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE (Kapitel 3.7.3) keine zusätzlichen Proteinbanden von gewünschter Größe zu erkennen.

Daraufhin wurden die Plasmide pKB64 und pKB65 für CDO_A-Np-His_6 und CDO_B-Np-His_6 sowie pKB60 und pKB62 für Ndas_1146-His_6 und Ndas_1147-His_6, welche auf dem Grundgerüst von pHis8 (pET28a(+)-Derivat) beruhen, in *E. coli* Rosetta 2 eingebracht. Die Kultivierung und Induktion erfolgte hierbei unter den gleichen Bedingungen, welche für die *E. coli* M15-Transformaten beschrieben wurden.

In Abbildung 4-54 ist zunächst das Resultat einer Kontrolle mit pHis8 abgebildet. In den darauffolgenden Abbildungen sind die Bilder der SDS-Page nach erfolgter Proteinaufreinigung dargestellt. In Abbildung 4-55 sowie Abbildung 4-56 ist das entsprechende Resultat der Überproduktion und

Reinigung von CDO_A-Np-His_6 und CDO_B-Np-His_6 wiedergegeben, während die Abbildung 4-57 und Abbildung 4-58 die entsprechenden Ergebnisse von Ndas_1146-His_6 und Ndas_1147-His_6 zeigen.

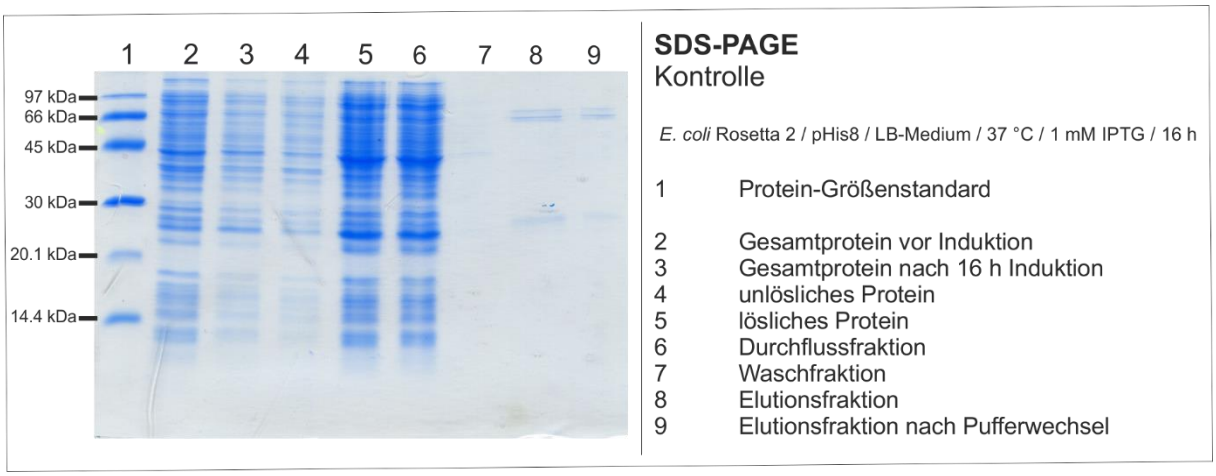


Abbildung 4-54: Kontrolle mit pHis8

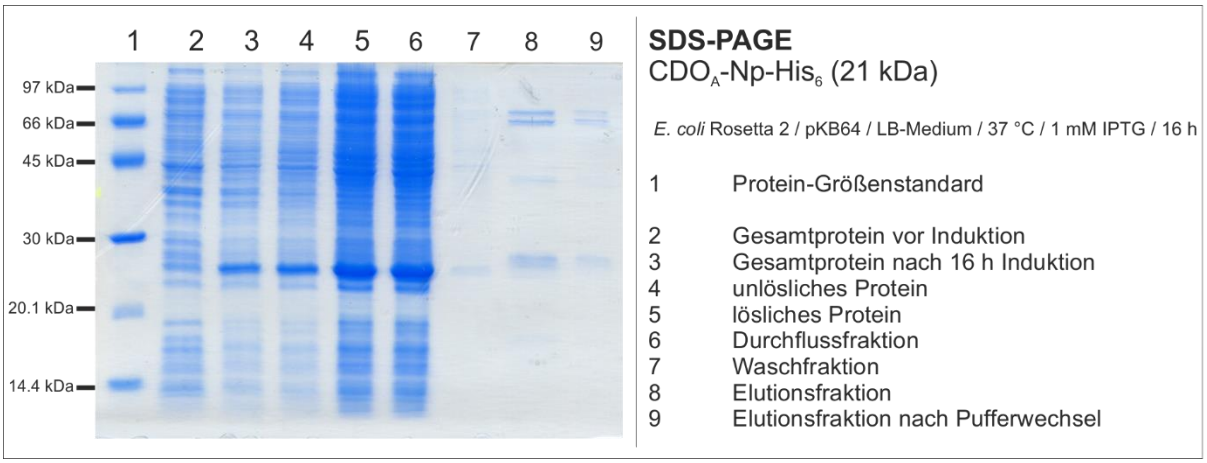


Abbildung 4-55: Analyse der Überproduktion von CDO_A-Np -His_6 (pKB64) in E. coli Rosetta 2 und Reinigung der Hexahistidin-Fusionsproteine durch Nickel-Affinitätschromatographie nach erfolgter Trennung mittels SDS-PAGE.

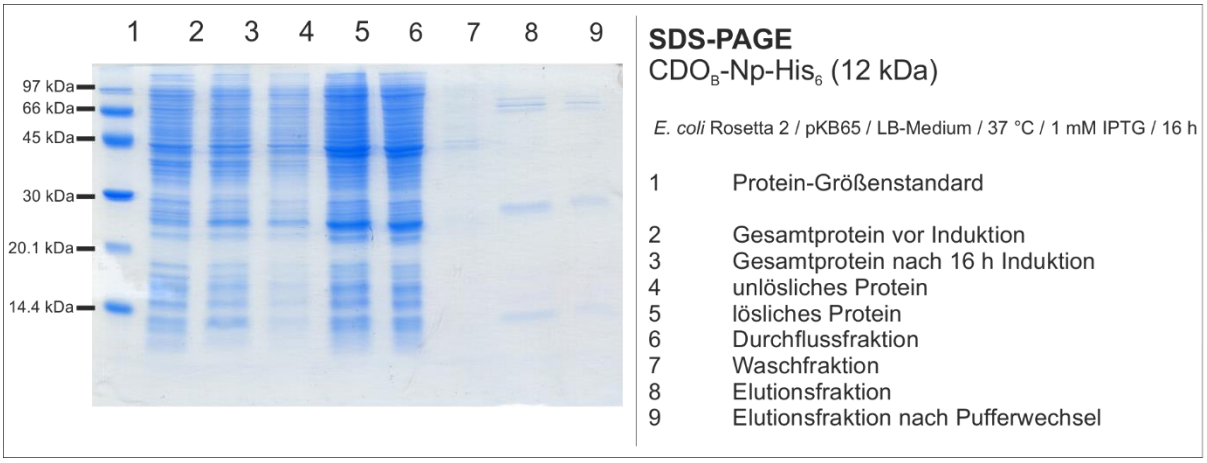


Abbildung 4-56: Analyse der Überproduktion von CDO_B-Np -His_6 (pKB65) in E. coli Rosetta 2 und Reinigung der Hexahistidin-Fusionsproteine durch Nickel-Affinitätschromatographie nach erfolgter Trennung mittels SDS-PAGE.

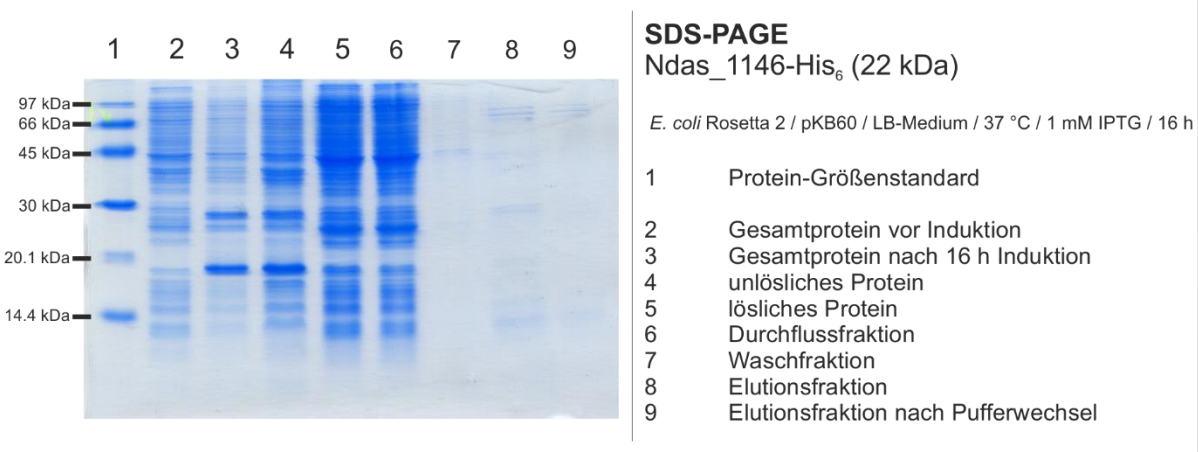


Abbildung 4-57: Analyse der Überproduktion von Ndas_1146-His$_6$ (pKB60) in E. coli Rosetta 2 und Reinigung der Hexahistidin-Fusionsproteine durch Nickel-Affinitätschromatographie nach erfolgter Trennung mittels SDS-PAGE.

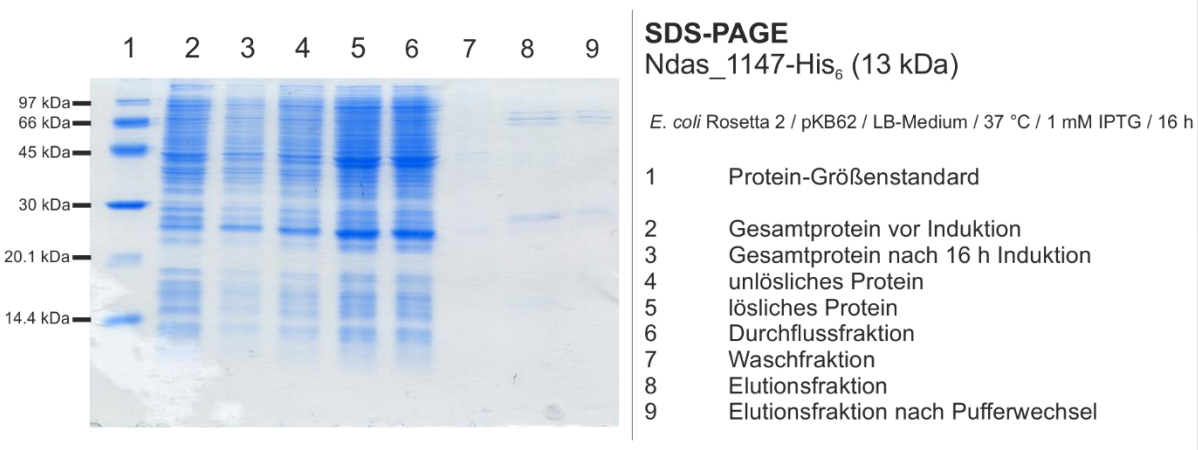


Abbildung 4-58: Analyse der Überproduktion von Ndas_1147-His$_6$ (pKB62) in E. coli Rosetta 2 und Reinigung der Hexahistidin-Fusionsproteine durch Nickel-Affinitätschromatographie nach erfolgter Trennung mittels SDS-PAGE.

Hierbei ist jedoch keine der gewünschten jeweiligen Proteinbande in der entsprechenden Elutionsfraktion nach dem Pufferwechsel zu erkennen. An dieser Stelle besteht ein Bedarf der Optimierung der Überproduktionsbedingungen sowie der Reinigung der Proteine.

Bei erfolgreicher Reinigung von CDO$_A$-Np-His$_6$ und CDO$_B$-Np-His$_6$ sowie Ndas_1146-His$_6$ und Ndas_1147-His$_6$ sollte eine weitere Untersuchung erfolgen. Nach dem Kontroll-Enzymassay von jeweils CDO$_A$-Np-His$_6$ und CDO$_B$-Np-His$_6$ bzw. Ndas_1146-His$_6$ und Ndas_1147-His$_6$ mit Zusatz von NADPH und FMN/FAD, sollte die Austauschbarkeit der Untereinheiten und deren Auswirkungen analysiert werden.

4.2.3 Vergleichende Analysen zu Cyclodipeptidoxidasen aus *N. prasina*, *N. dassonvillei* und *S. noursei*

4.2.3.1 Einleitung

Im vorherigen Kapitel wurde eine neue Cyclodipeptidoxidase aus *N. prasina* (CDO_A-Np und CDO_B-Np) identifiziert und etwas genauer betrachtet. Im Folgenden stellt sich nun die Frage, wie ähnlich sich die diese im Vergleich zu den bekannten CDOs aus *N. dassonvillei* (Ndas_1146 und Ndas_1147) und *S. noursei* (AlbA und AlbB) verhält.

Während die CDO aus *N. dassonvillei* freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel zur Verfügung gestellt wurde, musste die CDO aus *S. noursei* zunächst für vergleichende Analysen kloniert werden.

4.2.3.2 Amplifikation von *albA/albB* aus genomischer DNA von *S. noursei*

Um die CDOs miteinander vergleichen zu können, wurde die überlappende Sequenz (Abbildung 4-59) der beiden Gene *albA* und *albB* (NCBI accession number AAN07907.1 und AAN07908.1) amplifiziert und in den Vektor pQE-60 kloniert.

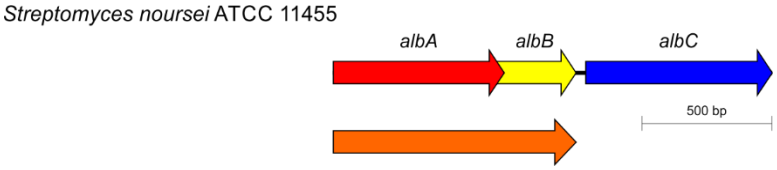


Abbildung 4-59: Darstellung der klonierten Sequenz von albA und albB aus Streptomyces noursei.

Die entsprechende Sequenz wurde mit Hilfe der Oligonukleotide Sn001-for und Sn001-rev mittels PCR amplifiziert. Die zur Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen für NcoI und BamHI wurden durch die jeweiligen Oligonukleotide eingeführt. Die PCR erfolgte mit der High Fidelity Polymerase bei einer Anlagerungstemperatur von 55 °C und einer Elongationszeit von 1 min (Kapitel 3.6.3). In Abbildung 4-60 ist das resultierende PCR-Produkt zu erkennen.

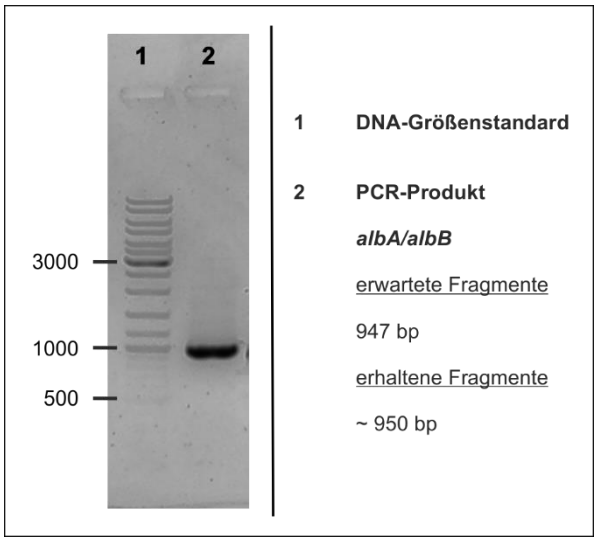


Abbildung 4-60: 1 %iges Agarosegele der Amplifikation von albA und albB mittels PCR aus gDNA von S. noursei ATCC 11455.

4.2.3.3 Klonierung der überlappenden Sequenz zur Überproduktion von AlbA und AlbB in *E. coli*

Das erhaltene PCR-Produkt wurde anschließend in einer TA-Klonierung in den linearisierten Vektor pGEM®-T Easy integriert und mittels Hitzeschock in *E. coli* XL10-Gold eingebracht. Einige Kolonien wurden ausgewählt, kultiviert und im Anschluss deren Plasmide isoliert. Die durch eine Restriktion mit EcoRI erhaltenen Fragmente des Plasmides pKB89 (Abbildung 4-61, A) entsprachen in ihren Größen den erwarteten Fragmenten mit 967 und 2997 bp (Abbildung 4-61, B). Die entsprechende Sequenz konnte durch eine Sequenzierung bestätigt werden.

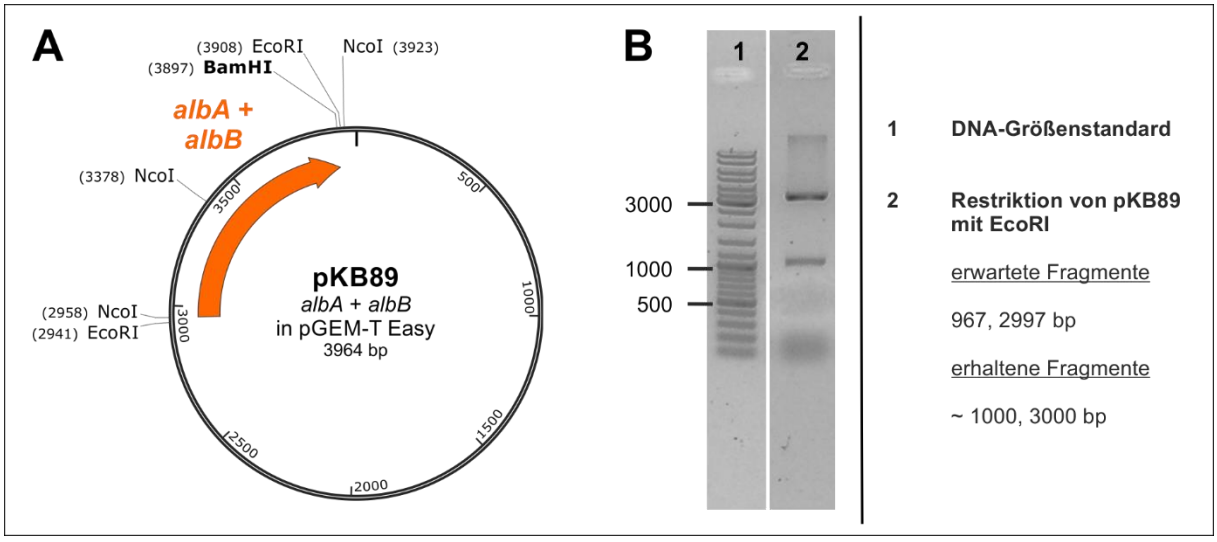


Abbildung 4-61: A: Plasmidkarte von pKB89 (albA und albB in pGEM®-T Easy). B: 1 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB89 mit EcoRI.

Im Anschluss wurden pKB89 und pQE-60 mit NcoI und BamHI restringiert und die entsprechenden mittels Elektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente isoliert und miteinander ligiert. Nachdem dieser Ligationsansatz in *E. coli* XL10-Gold eingebracht wurde, konnten einige Kolonien kultiviert und deren Plasmide isoliert werden. Es erfolgte eine Restriktion mit NcoI und BamHI zur Überprüfung der erfolgreichen Ligation. Das Plasmid pKB90 (Abbildung 4-62, A) zeigte nach der Trennung der entstandenen DNA-Fragmente das erwartete Muster der Fragmentgrößen von 420, 519 und 3423 bp (Abbildung 4-62, B). Im Anschluss konnte auch diese Sequenz mittels Sequenzierung bestätigt werden.

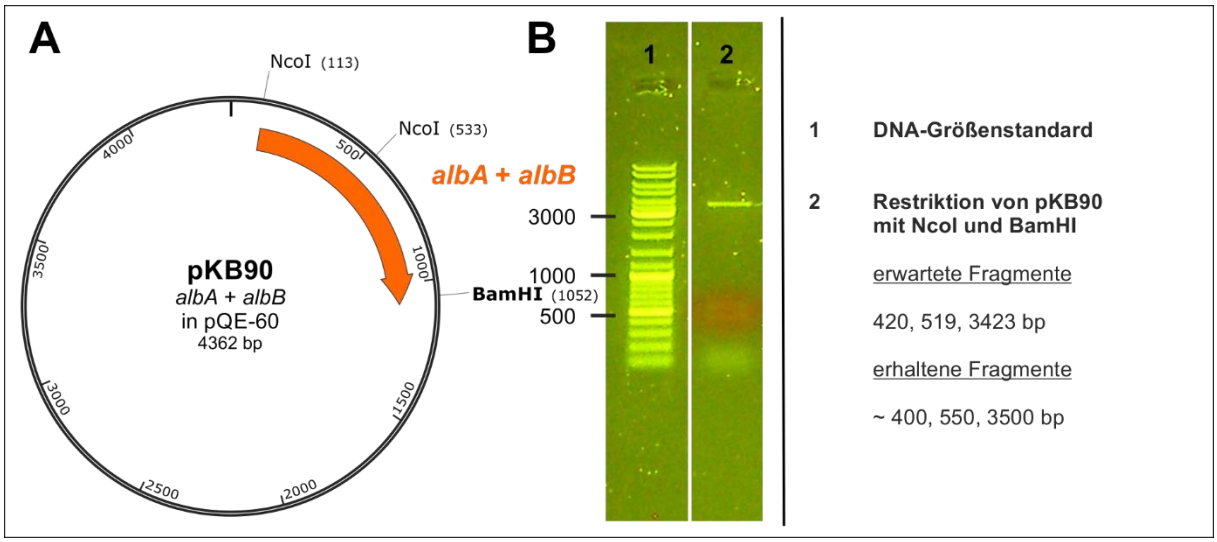


Abbildung 4-62: A: Plasmidkarte von pKB90 (albA und albB in pQE-60). B: 1 %iges Agarosegel, Überprüfung der erhaltenen Fragmente nach Restriktion von pKB90 mit NcoI und BamHI.

Hiermit stand das entsprechende Konstrukt der CDO aus *S. noursei* (AlbA und AlbB) für vergleichende Untersuchungen zur Verfügung.

4.2.3.4 Biotransformation der drei Cyclodipeptidoxidasen im Vergleich

Um die Substratspezifität der drei CDOs aus *N. prasina*, *N. dassonvillei* und *S. noursei* zu vergleichen (Abbildung 4-63), wurden Biotransformationen durchgeführt (Kapitel 3.7.6.1), bei denen verschiedene cyclische Dipeptide zugegeben und anschließend deren Umsetzung mittels LC-MS analysiert wurden (Kapitel 3.9.1). Hierfür wurden die Plasmide pKB81 und pKB90 in *E. coli* M15 [pREP4] bzw. Ndas_1146-1147-EcoRI-HindIII-pACYC in *E. coli* SoluBL21 eingebracht und bei 37 °C in LB-Medium schüttelnd kultiviert. Nach der Induktion der Genexpression wurden jeweils 32 cyclische Dipeptide (cXX) als Substrate zugesetzt und die Bildung der Produkte nach erfolgter Extraktion der Kulturen analysiert (Anhang, Tabelle 7-13 bis Tabelle 7-15). Hierbei wurden insbesondere die extracted ion chromatograms der jeweiligen Substrate (cXX) sowie deren einfach dehydrierten Produkte (cXX-2H) und deren zweifach dehydrierten Produkte (cXX-4H) betrachtet. Das Verhalten der CDOs wurde hierbei insbesondere gegenüber von phenylalanin-, tyrosin-, tryptophan- und histidin-haltigen cyclischen Dipeptiden untersucht. Des Weiteren wurde deren Verhalten gegenüber verschiedener Stereoisomere betrachtet.

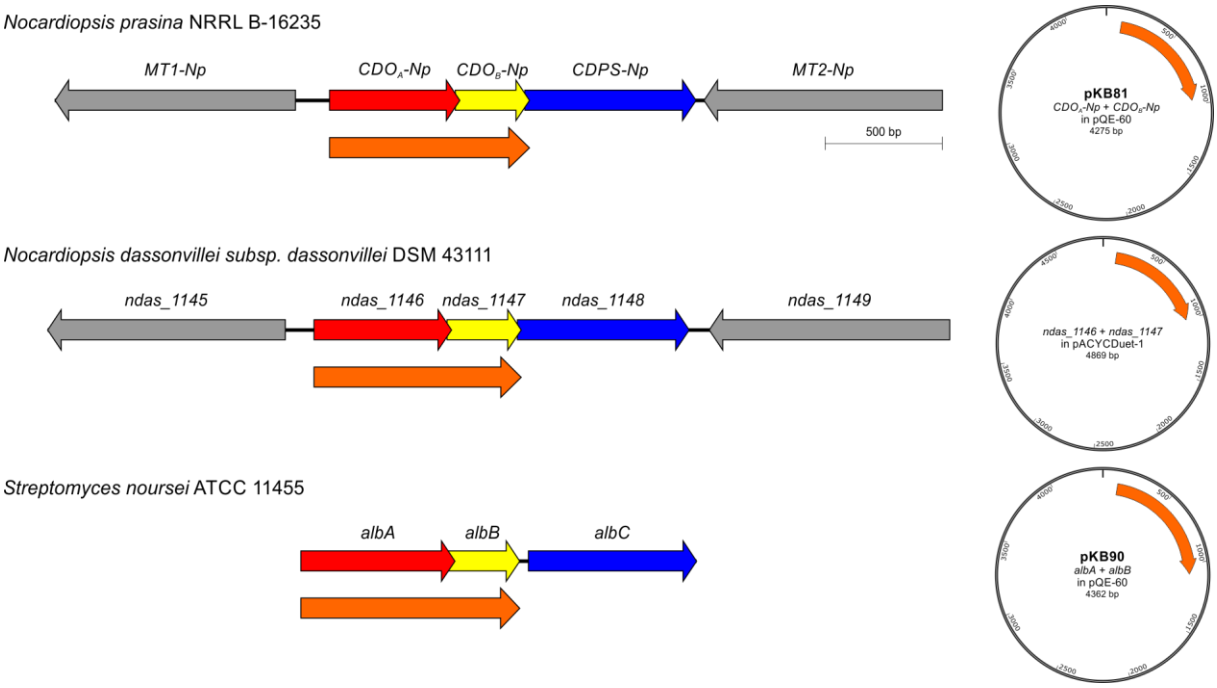


Abbildung 4-63: Übersicht über die im Rahmen dieser Untersuchung verwendeten Plasmide.

Aus vorherigen Arbeiten ist bekannt, dass CDOs besser aromatische cyclische Dipeptide umsetzten (Belin *et al.*, 2012). In Abbildung 4-65 ist zunächst das Ergebnis der Umsetzung von phenylalanin-, tyrosin- und tryptophan-haltigen cyclischen Dipeptiden durch die CDOs dargestellt. Die cyclischen Dipeptide *cyclo*(L-Phe-L-Phe), *cyclo*(L-Phe-L-Tyr) und *cyclo*(L-Typ-L-Tyr) stellen hierbei natürliche Substrate von Ndas_1146/ Ndas_1147 und AlbA/AlbB dar, während lediglich *cyclo*(L-Phe-L-Tyr) und *cyclo*(L-Typ-L-Tyr) natürliche Substrate von CDO_A-Np/CDO_B-Np sind. Die tryptophan-haltigen Substrate *cyclo*(L-Trp-L-Trp), *cyclo*(L-Phe-L-Trp) und *cyclo*(L-Tyr-L-Trp) sind hingegen für alle drei CDOs keine natürlichen Substrate. Es ist zu erkennen, dass alle drei CDOs aromatische cyclische Dipeptide mit Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophan-Resten in allen möglichen Variationen zu einfach (cXX-2H) und zu zweifach (cXX-4H) dehydrierten Produkten umsetzten, unabhängig davon, ob es sich um natürliche oder nicht natürliche Substrate handelt (Abbildung 4-64). Insbesondere in Bezug auf *cyclo*(L-Phe-L-Phe) ist kein nennenswerter Unterschied zwischen den CDOs zu erkennen. Im Vergleich der tryptophan-haltigen Substrate fällt auf, dass Ndas_1146/Ndas_1147 besonders *cyclo*(L-Phe-L-Trp) nahezu vollständig zu einfach (cFW-2H) und zu zweifach (cFW-4H) dehydrierten Produkten umsetzt.

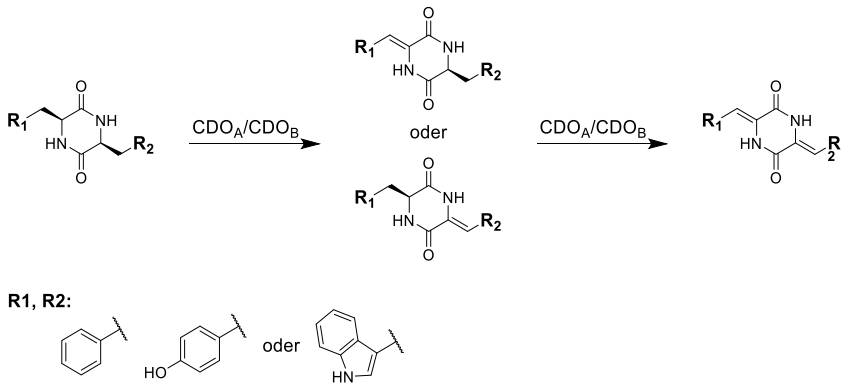


Abbildung 4-64: Enzymatische Umsetzung von phenylalanin-, tyrosin- und tryptophan-haltigen cyclischen Dipeptiden durch CDO_A-Np/CDO_B-Np, Ndas_1146/Ndas_1147 und AlbA/AlbB (CDO_A/CDO_B).

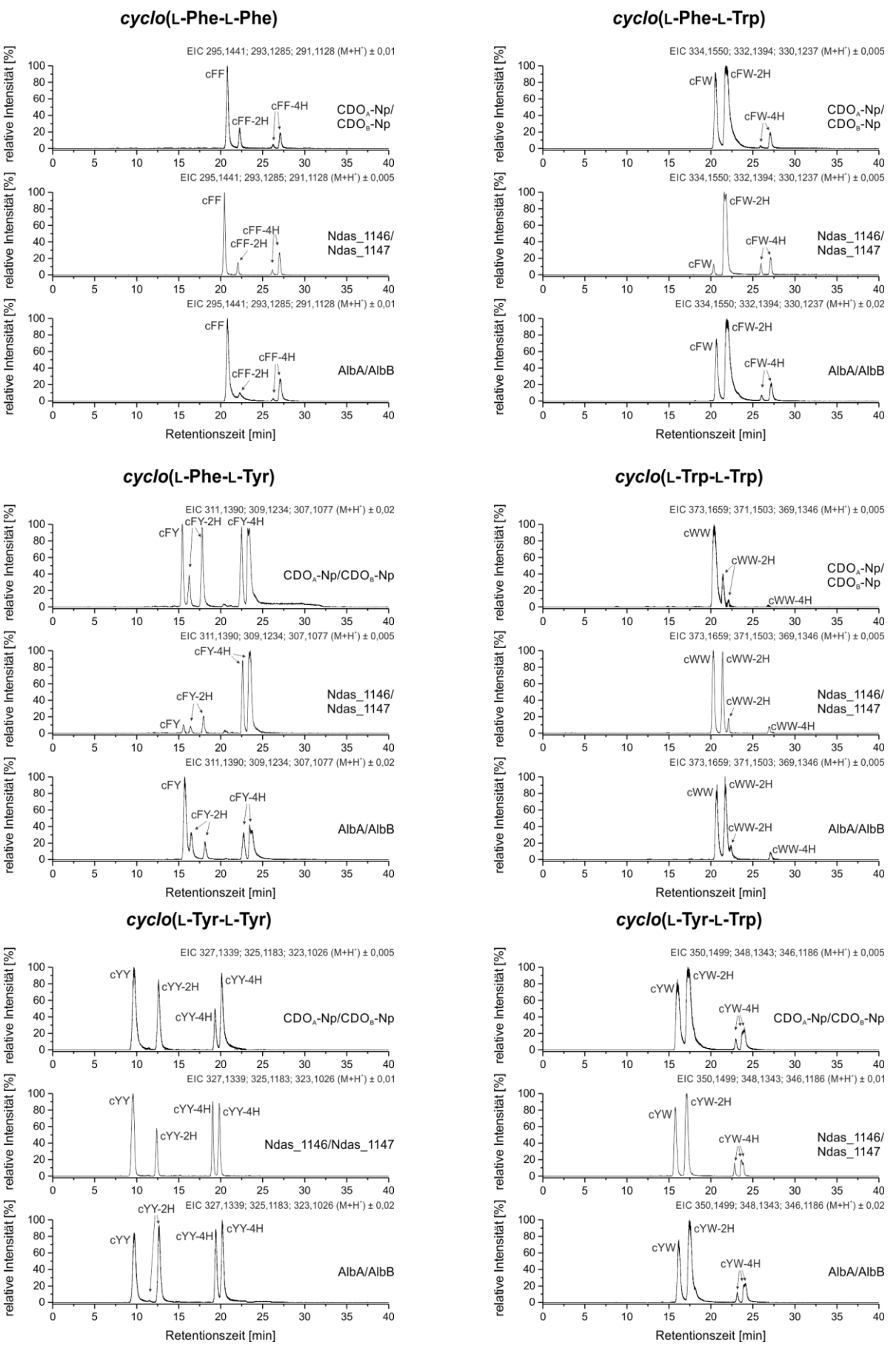


Abbildung 4-65: Enzymatische Umsetzung von cyclo*(L-Phe-L-Phe),* cyclo*(L-Phe-L-Tyr),* cyclo*(L-Tyr-L-Tyr),* cyclo*(L-Phe-L-Trp),* cyclo*(L-Trp-L-Trp) und* cyclo*(L-Tyr-L-Trp) durch CDO_A-Np/CDO_B-Np, Ndas_1146/ Ndas_1147 und AlbA/AlbB.*

Im Folgenden wurden aromatische cyclische Dipeptide mit Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophan-Resten betrachtet, bei denen aufgrund des Glycin- und Prolin-Restes lediglich eine Dehydrierung möglich ist. Bei diesen Substraten handelt es sich um keine natürlichen Substrate der CDOs. In Abbildung 4-67 sind die entsprechenden EICs abgebildet. Während *cyclo*(L-Phe-Gly) und *cyclo*(L-Tyr-Gly) durch die drei CDOs zu einfach dehydrierten Produkten umgesetzt werden, sind im Falle von *cyclo*(L-Trp-Gly) keine nennenswerten Umsetzungen zu beobachten. Die prolin-haltigen Substrate *cyclo*(L-Phe-L-Pro), *cyclo*(L-Tyr-L-Pro) *und cyclo*(L-Trp-L-Pro) werden dagegen alle zu einfach dehydrierten Produkten umgesetzt (Abbildung 4-66). Sowohl *cyclo*(L-Phe-Gly) als auch *cyclo*(L-Phe-L-Pro) werden mit der höchsten Ausbeute an dehydrierten Produkten von AlbA/AlbB umgesetzt. Dagegen werden *cyclo*(L-Tyr-Gly) und *cyclo*(L-Tyr-L-Pro) am besten von CDO_A-Np/ CDO_B-Np akzeptiert. Im Vergleich wird *cyclo*(L-Trp-L-Pro) bevorzugt von Ndas_1146/Ndas_1147 umgesetzt. Aus diesem Zusammenstellung ist eine Tendenz von AlbA/AlbB zur Umsetzung von phenylalanin-haltigen Substraten, von CDO_A-Np/CDO_B-Np zu tyrosin-haltigen Substraten und von Ndas_1146/Ndas_1147 mit Ausnahme von *cyclo*(L-Trp-Gly) zu tryptophan-haltigen Substraten abzulesen. Im Falle von AlbA/AlbB bzw. CDO_A-Np/CDO_B-Np korreliert dies mit der Tendenz der dazugehörigen CDPS zu phenylalanin- bzw. tyrosin-haltiger Produktbildung. Für Ndas_1146/ Ndas_1147 ist dies erstaunlich, da die dazugehörige CDPS Ndas_1148 keinerlei tryptophan-haltige cyclische Dipeptide synthetisiert.

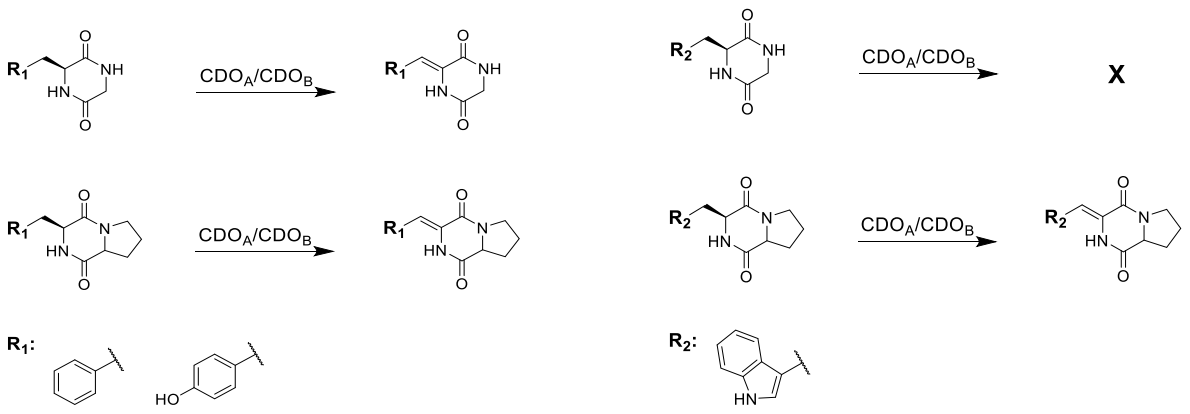


Abbildung 4-66: Enzymatische Umsetzung von phenylalanin-, tyrosin- und tryptophan-haltigen cyclischen Dipeptiden durch CDO_A-Np/CDO_B-Np, Ndas_1146/Ndas_1147 und AlbA/AlbB (CDO_A/CDO_B).

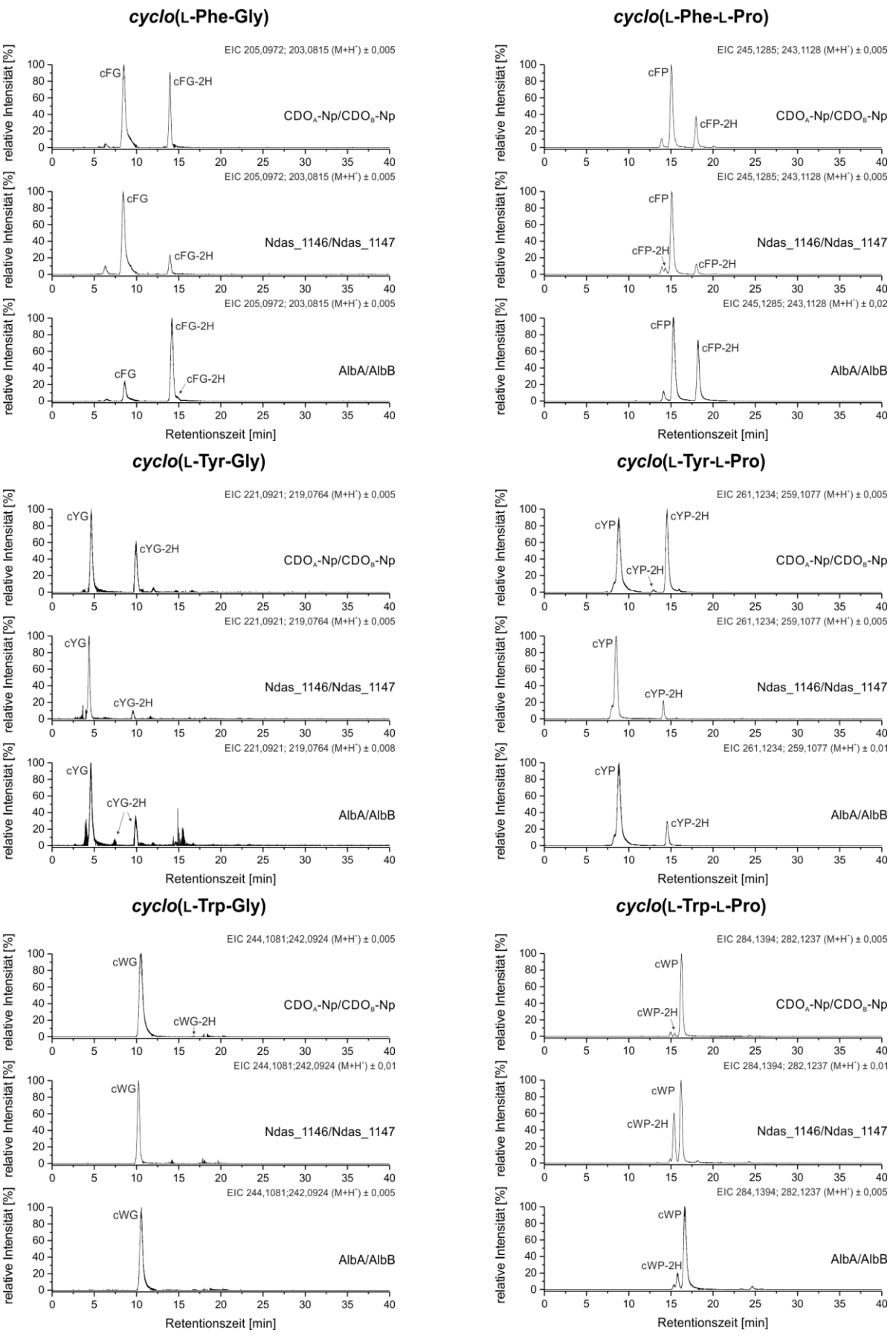


Abbildung 4-67: Enzymatische Umsetzung von cyclo(*L-Phe-L-Gly),* cyclo(*L-Tyr-L-Gly),* cyclo(*L-Trp-L-Gly),* cyclo(*L-Phe-L-Pro),* cyclo(*L-Tyr-L-Pro) und* cyclo(*L-Trp-L-Pro) durch CDO_A-Np/CDO_B-Np, Ndas_1146/ Ndas_1147 und AlbA/AlbB.*

Ein weiteres nicht natürliches Substrat, welches dafür bekannt ist von einer CDO aus *S. albulus* KO-23 umgesetzt zu werden, stellt *cyclo*(L-Phe-L-His) dar (Kanzaki *et al.*, 2004). Dieses Substrat bestitzt mit dem Phenylalanin-Rest einen aromatischen und mit dem Histidin-Rest zusätzlich einen basischen Charakter. In Abbildung 4-68 ist dargestellt, dass dieses ebenso durch AlbA/AlbB, CDO_A-Np/CDO_B-Np und Ndas_1146/ Ndas_1147 umgesetzt wird. An dieser Stelle stellte sich die Frage, wie sich die CDOs gegenüber weiterer nicht natürlicher histidin-haltiger cyclischer Dipeptide verhält. Ein weiteres aromatisches sowie basisches Substrat ist *cyclo*(L-Trp-L-His). Die drei CDOs sind alle dazu fähig *cyclo*(L-Trp-L-His) sowohl zu einfach (cWH-2H), als auch zu zweifach (cWH-4H) dehydrierten Produkten umzusetzen. Im Vergleich der CDOs untereinander ist auch hier wieder die Tendenz von Ndas_1146/ Ndas_1147 hinsichtlich von tryptophan-haltigen Substraten zu erkennen.

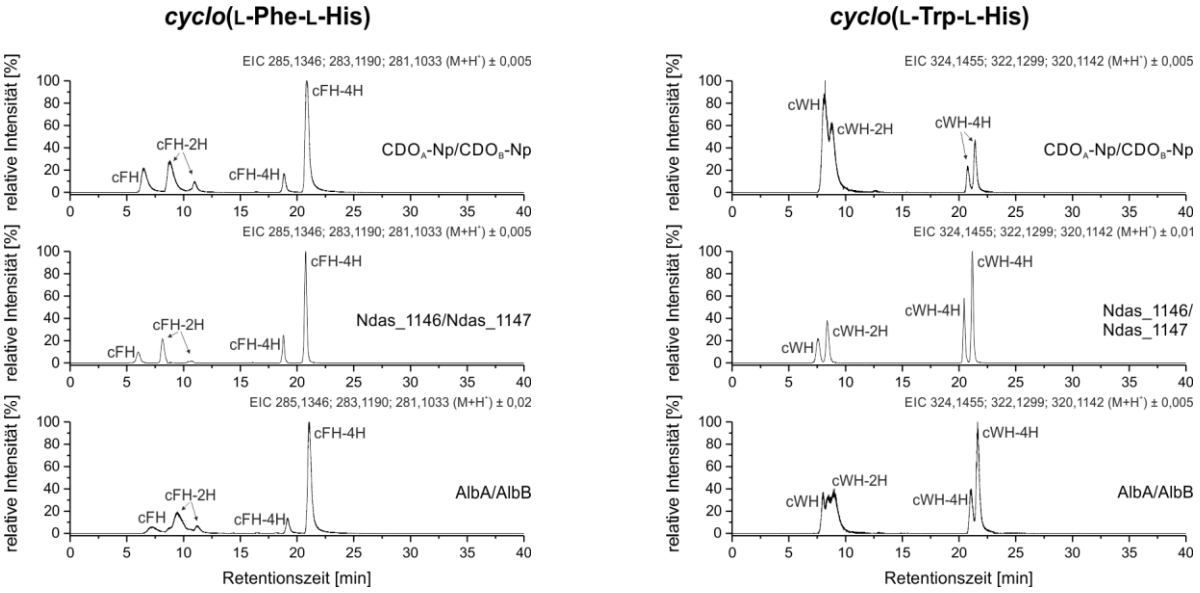


Abbildung 4-68: Enzymatische Umsetzung von cyclo*(L-Phe-L-His) und* cyclo*(L-Trp-L-His) durch CDO_A-Np/CDO_B-Np, Ndas_1146/ Ndas_1147 und AlbA/AlbB.*

Des Weiteren wurden histidin-haltige Substrate, bei denen aufgrund des Glycin- und Prolin-Restes, nur einfach dehydrierte Produkte zu erwarten sind, hinsichtlich ihrer Akzeptanz durch CDOs überprüft. In Abbildung 4-69 ist zu erkennen, dass die CDOs das Substrat *cyclo*(L-His-Gly) gar nicht und *cyclo*(L-His-L-Pro) in nicht nennenswerter Menge zu einfach dehydrierten Produkten umsetzen.

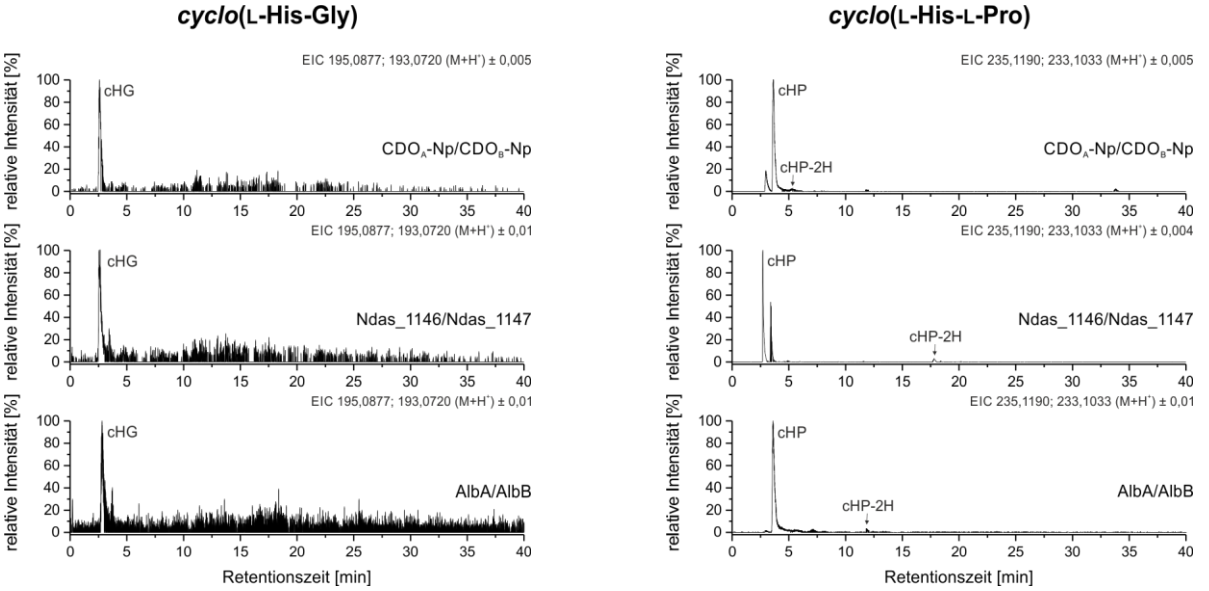


Abbildung 4-69: Enzymatische Umsetzung von cyclo*(L-His-L-Gly) und* cyclo*(L-His-L-Pro) durch CDO_A-Np/CDO_B-Np, Ndas_1146/ Ndas_1147 und AlbA/AlbB.*

Als weiteres histidin-haltiges Substrat wurde in Abbildung 4-70 *cyclo*(L-His-L-Ala), mit basischen und hydrophoben Charakter, analysiert. Dieses wurde, im Vergleich zu *cyclo*(L-His-L-Gly) von allen drei CDOs zu einfach (cHA-2H) und zweifach (cHA-4H) dehydrierten Produkten umgesetzt. Im Vergleich hierzu wurde die Umsetzung von *cyclo*(L-Trp-L-Ala), mit aromatischen und hydrophoben Resten, untersucht. Hierbei fällt auf, dass dieses lediglich zu einfach dehydrierten Produkten (cWA-2H) reagiert. Auch hier besteht die beste Umsetzung bei Ndas_1146/Ndas_1147, welches wiederum die Tendenz zu tryptophan-haltigen Substraten unterstützt.

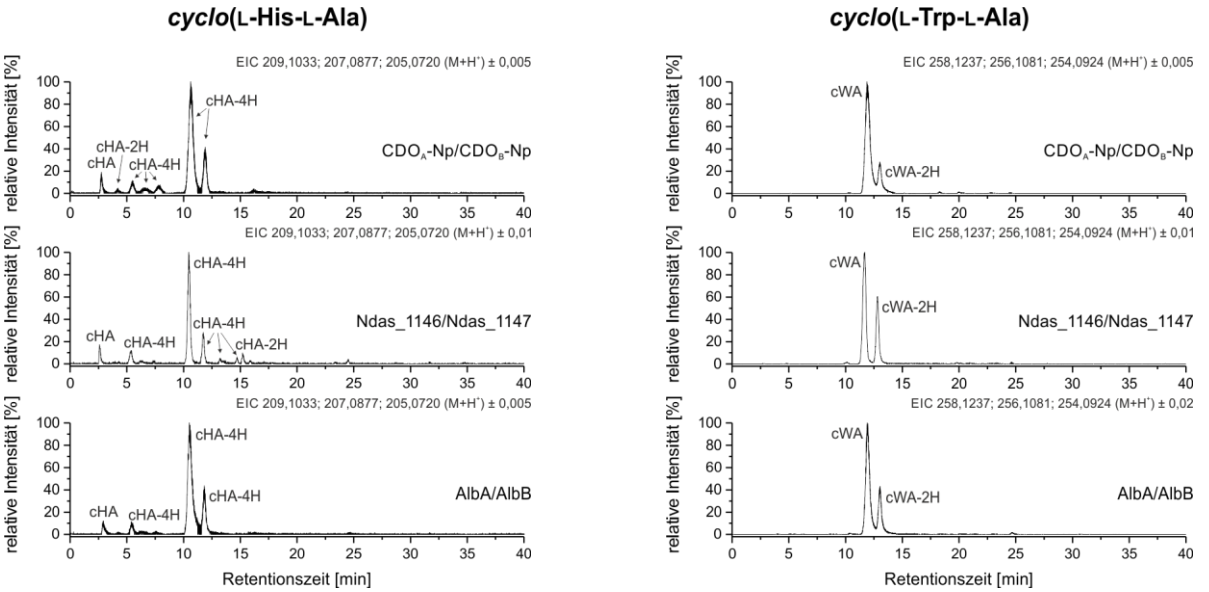


Abbildung 4-70: Enzymatische Umsetzung von cyclo*(L-His-L-Ala) und* cyclo*(L-Trp-L-Ala) durch CDO_A-Np/CDO_B-Np, Ndas_1146/ Ndas_1147 und AlbA/AlbB.*

Als ein weiteres Beispiel für ein Substrat mit sowohl aromatischen als auch hydrophoben Rest wurde nicht zuletzt *cyclo*(L-Phe-L-Leu) analysiert. Dieses stellt für Ndas_1146/ Ndas_1147 und AlbA/AlbB ein natürliches Substrat dar und wird von allen drei CDOs zu einfach (cFL-2H) und zweifach (cFL-4H) dehydrierten Produkten umgesetzt (Abbildung 4-71). Des Weiteren reagiert ebenso *cyclo*(L-Trp-L-Leu), als nicht natürliches Substrat, zu einfach (cWL-2H) und zweifach (cWL-4H) dehydrierten Produkten. Im Vergleich zu der fehlenden Umsetzung von *cyclo*(L-Trp-L-Gly) und der Umsetzung von *cyclo*(L-Trp-L-Ala) zu lediglich einfach dehydrierten Produkten, wird die Notwendigkeit der Größe des hydrophoben Restes deutlich. Die Notwendigkeit des aromatischen Restes auf der anderen Seite wird hingegen durch die fehlende Akzeptanz der CDOs gegenüber von *cyclo*(L-Pro-L-Leu) verdeutlicht.

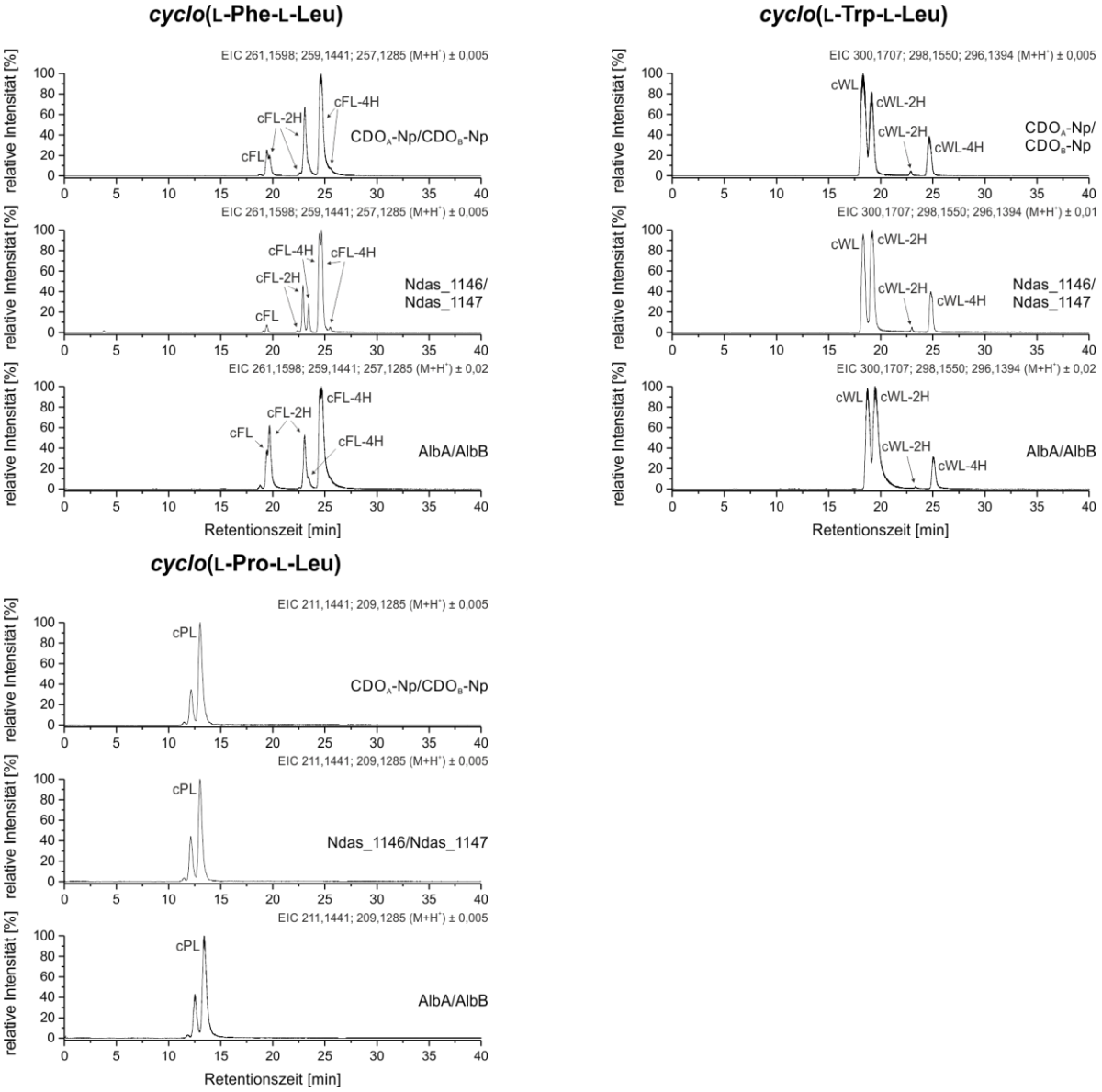


Abbildung 4-71: Enzymatische Umsetzung von cyclo*(L-Phe-L-Leu),* cyclo*(L-Trp-L-Leu) und* cyclo*(L-Pro-L-Leu) durch CDO$_A$-Np/ CDO$_B$-Np, Ndas_1146/ Ndas_1147 und AlbA/AlbB.*

Die Akzeptanz von prolin-haltigen Substraten ist stark von dem Charakter des zweiten Restes abhängig. Während *cyclo*(L-Phe-L-Pro), *cyclo*(L-Tyr-L-Pro) und *cyclo*(L-Trp-L-Pro) mit ihrem aromatischen Rest zu Produktbildung führten, wurde *cyclo*(L-His-L-Pro) mit seinem basischen Rest nicht nennenswert umgesetzt. Bei *cyclo*(L-Pro-L-Leu), *cyclo*(L-Pro-L-Val) mit hydrophoben Resten fehlen jegliche Reaktionen, ebenso wie bei *cyclo*(L-Pro-L-Thr) mit nukleophilem Rest (Abbildung 4-72).

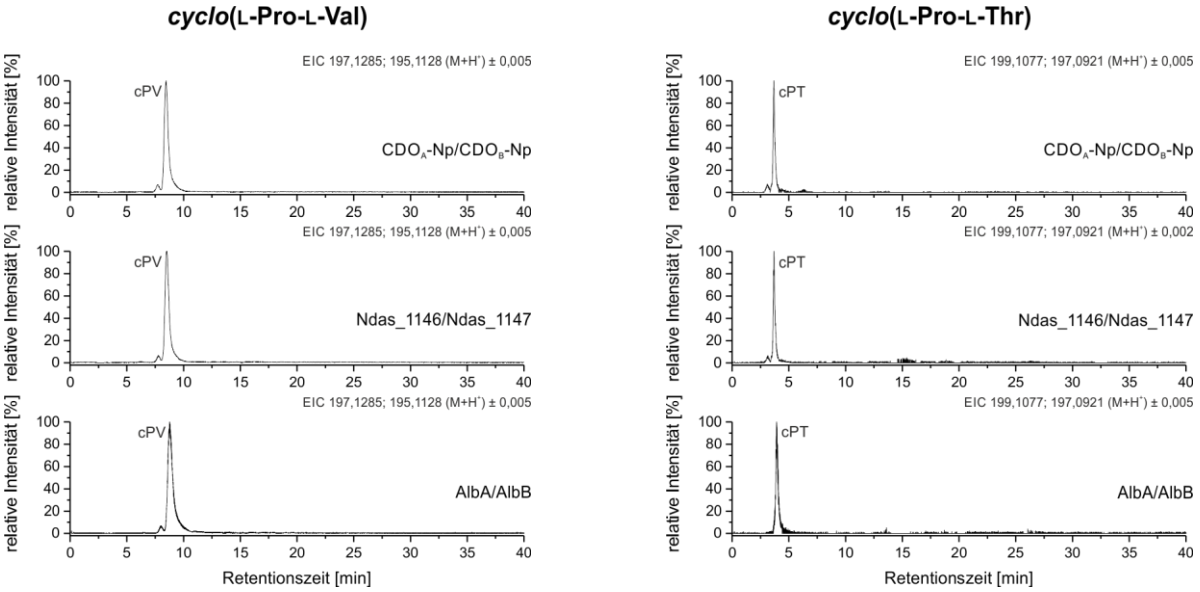


Abbildung 4-72: Enzymatische Umsetzung von cyclo*(L-Pro-L-Val) und* cyclo*(L-Pro-L-Thr) durch CDO_A-Np/CDO_B-Np, Ndas_1146/ Ndas_1147 und AlbA/AlbB.*

Wird hingegen ein nukleophiler Rest mit einem aromatischem Rest kombiniert, wie dies bei *cyclo*(L-Phe-L-Ser) und *cyclo*(L-Tyr-L-Ser) in Abbildung 4-73 der Fall ist, führt dies wiederum zur Produktbildung. Während *cyclo*(L-Phe-L-Ser) durch die CDOs zu einfach dehydrierten Produkten (cFS-2H) reagiert, wird *cyclo*(L-Tyr-L-Ser) von CDO_A-Np/CDO_B-Np und Ndas_1146/Ndas_1147 jeweils zu einem einfach dehydrierten Produkt (cYS-2H) und von AlbA/AlbB zu einem zweifach dehydrierten Produkt (cYS-4H) umgesetzt.

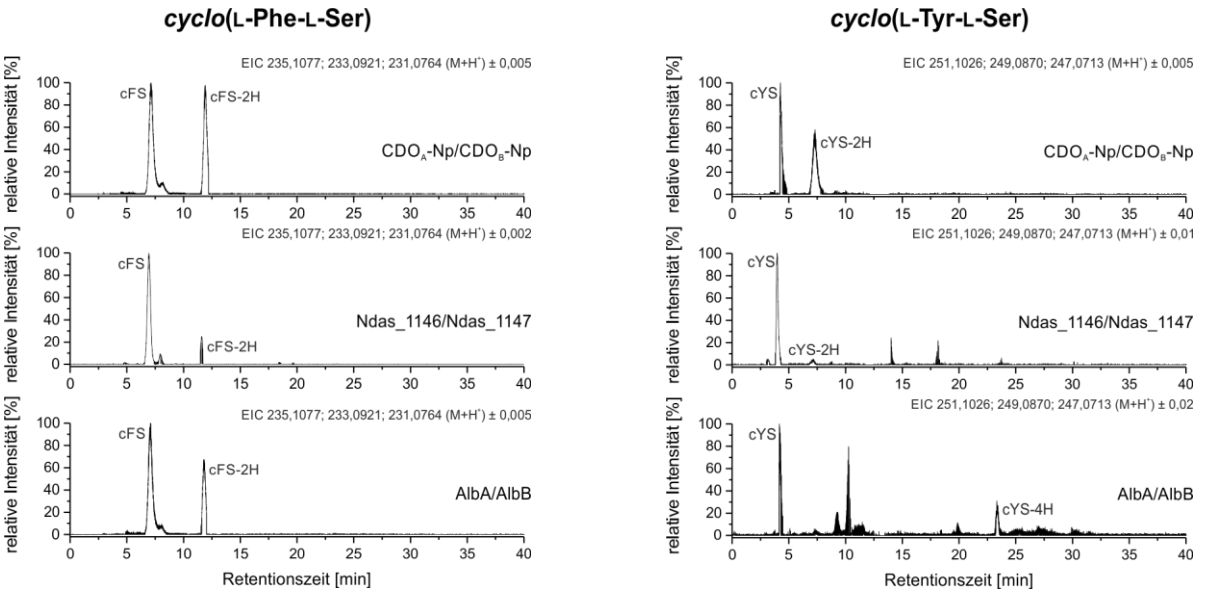


Abbildung 4-73: Enzymatische Umsetzung von cyclo*(L-Phe-L-Ser) und* cyclo*(L-Tyr-L-Ser) durch CDO_A-Np/CDO_B-Np, Ndas_1146/ Ndas_1147 und AlbA/AlbB.*

Als ein letztes nicht natürliches Substrat wurde die Umsetzung von *cyclo*(L-Glu-L-Glu) durch die CDOs untersucht. Dieses stellt das einzige Substrat mit zwei sauren Resten dar. In Abbildung 4-74 ist zu erkennen, dass dieses durch alle drei CDOs zumindest zu einfach dehydrierten Produkten (cEE-2H) umgesetzt werden konnte, zweifach dehydrierte Produkte (cEE-4H) konnten dagegen nicht detektiert werden.

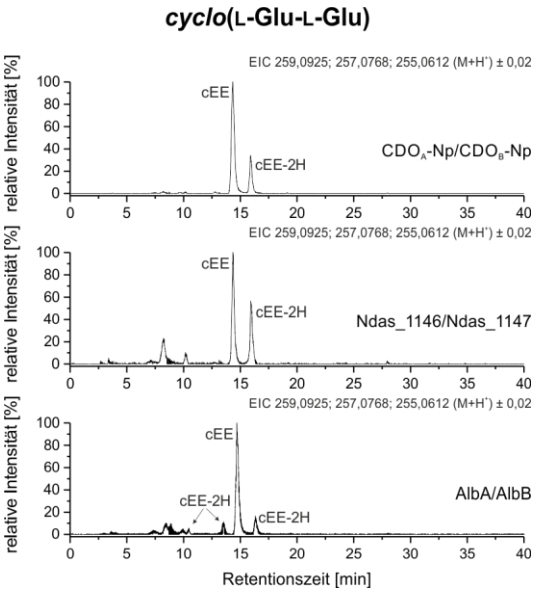


Abbildung 4-74: Enzymatische Umsetzung von cyclo*(L-Glu-L-Glu) durch CDO_A-Np/CDO_B-Np, Ndas_1146/ Ndas_1147 und AlbA/AlbB.*

Im Folgenden wurde das Verhalten der CDOs gegenüber verschiedener Stereoisomere betrachtet. In Abbildung 4-76 ist jenes Verhalten der CDOs gegenüber *cyclo*(L-Tyr-L-Trp) und *cyclo*(L-Tyr-D-Trp) dargestellt. Während *cyclo*(L-Tyr-L-Trp) (cYW) sowohl zu einfach dehydrierten Produkten (cYW-2H) als auch zu zweifach dehydrierten Produkten (cYW-4H) umgesetzt wurde, konnten lediglich einfach dehydrierte Produkte bei der Umsetzung von *cyclo*(L-Tyr-D-Trp) detektiert werden (Abbildung 4-75). Es ist also ein deutliches stereospezifisches Verhalten hinsichtlich der Produktbildung zu beobachten.

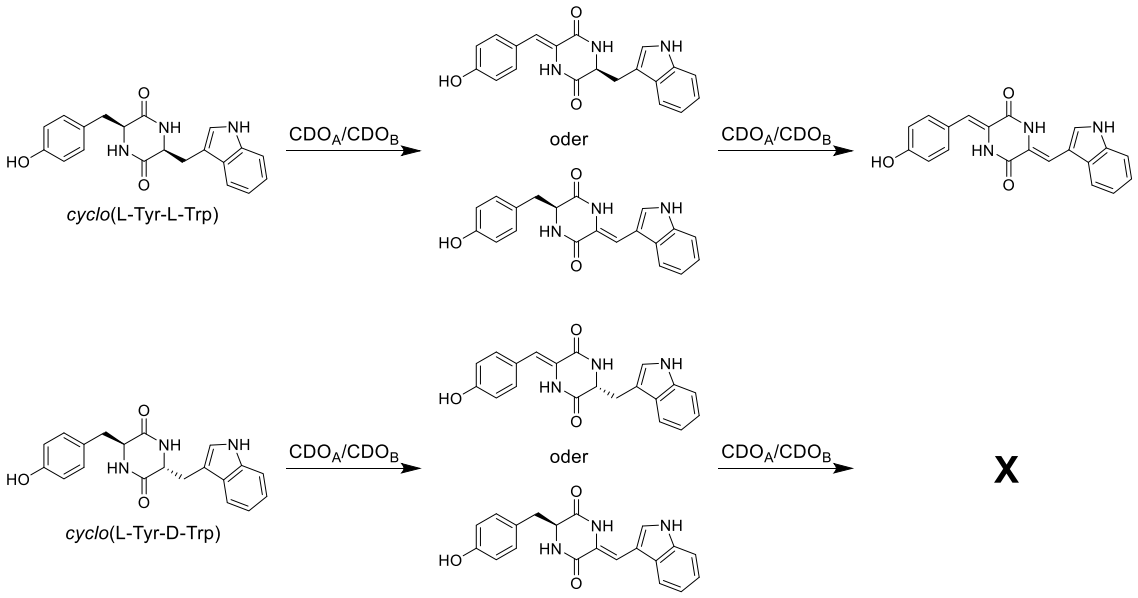


Abbildung 4-75: Enzymatische Umsetzung von cyclo(L-Tyr-L-Trp) und cyclo(L-Tyr-D-Trp) durch CDO$_A$-Np/CDO$_B$-Np, Ndas_1146/Ndas_1147 und AlbA/AlbB (CDO$_A$/CDO$_B$).

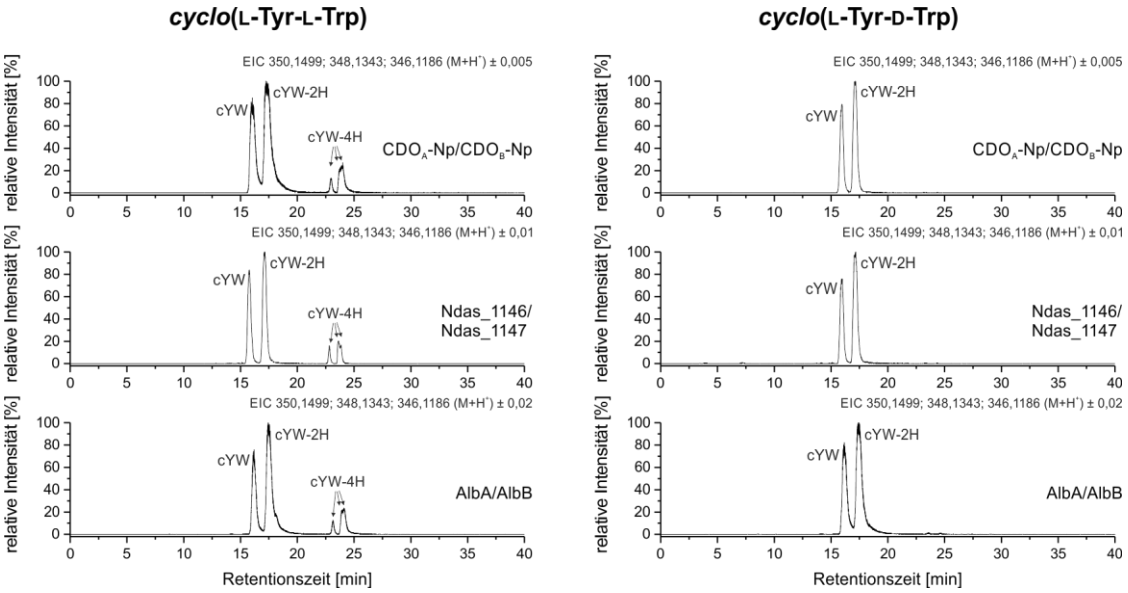


Abbildung 4-76: Enzymatische Umsetzung der beiden Stereoisomere cyclo(L-Tyr-L-Trp) und cyclo(L-Tyr-D-Trp) durch CDO$_A$-Np/CDO$_B$-Np, Ndas_1146/Ndas_1147 und AlbA/AlbB.

In Abbildung 4-78 ist das Verhalten der drei CDOs hinsichtlich deren Umsetzung der vier Stereoisomere *cyclo*(L-Trp-L-Ala), *cyclo*(D-Trp-D-Ala), *cyclo*(L-Trp-D-Ala) und *cyclo*(D-Trp-L-Ala) dargestellt. In allen betrachteten Reaktionen sind entsprechende einfach dehydrierte Produkte (cWA-2H) zu beobachten (Abbildung 4-77). In diesem Vergleich ist eine deutliche Tendenz in der Umsetzung der vier Stereoisomere von Ndas_1146/Ndas_1147 zu erkennen. Während *cyclo*(L-Trp-L-Ala) mit Abstand am besten von Ndas_1146/Ndas_1147 akzeptiert wurde, ist die Umsetzung von *cyclo*(D-Trp-D-Ala), *cyclo*(L-Trp-D-Ala) und *cyclo*(D-Trp-L-Ala) deutlich reduziert. Hierbei ist die Produktbildung bei *cyclo*(D-Trp-D-Ala) deutlich höher als bei *cyclo*(L-Trp-D-Ala) und *cyclo*(D-Trp-L-Ala). Ein vergleichbares Verhalten zeigt AlbA/AlbB gegenüber diesen Stereoisomeren, wobei die Umsetzungen allgemein geringer sind. CDO_A-Np/CDO_B-Np zeigt im Vergleich zu den beiden anderen CDOs die geringsten Umsetzungen der Stereoisomere. Hierbei zeigt *cyclo*(L-Trp-L-Ala) die höchste Produktbildung, während *cyclo*(L-Trp-D-Ala) und *cyclo*(D-Trp-L-Ala) auch hier annähernd gleiche Umsetzung zeigen. Die Akzeptanz von *cyclo*(D-Trp-D-Ala) ist jedoch in diesem Fall geringer als jene von *cyclo*(L-Trp-D-Ala) und *cyclo*(D-Trp-L-Ala). Das Verhalten der drei CDOs gegenüber dieser Stereoisomere ist demnach nicht identisch.

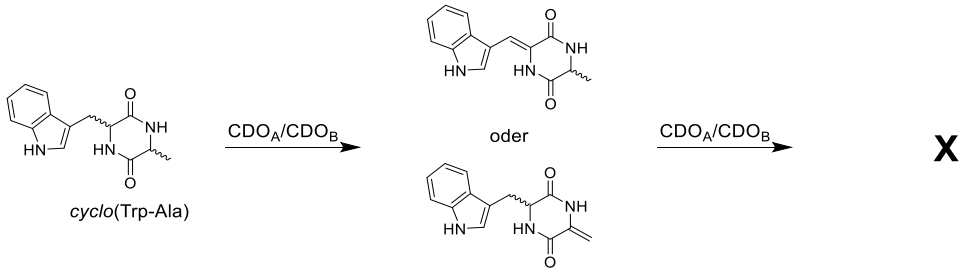


Abbildung 4-77: Enzymatische Umsetzung von cyclo(L-Tyr-L-Ala) durch CDO_A-Np/CDO_B-Np, Ndas_1146/Ndas_1147 und AlbA/AlbB (CDO_A/CDO_B).

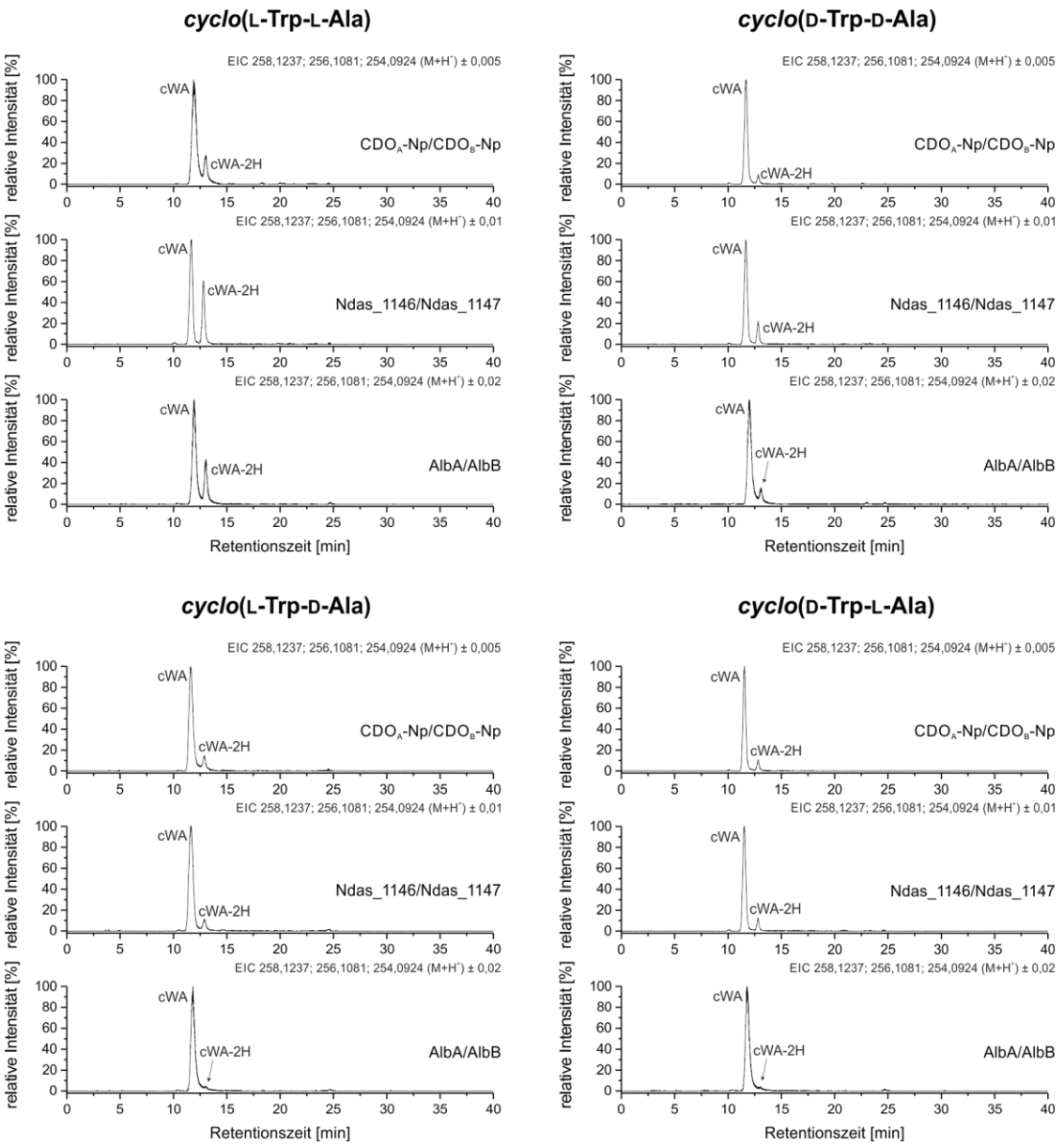


Abbildung 4-78: Enzymatische Umsetzung der vier Stereoisomere von cyclo(Trp-Ala) durch CDO_A-Np/CDO_B-Np, Ndas_1146/ Ndas_1147 und AlbA/AlbB.

In Abbildung 4-79 wurde die Akzeptanz der CDOs gegenüber zwei weiteren aromatischen Substraten getestet, welche aus Anthranilsäure (Ant) und Tryptophan hervorgehen und kein 2,5-Diketopiperazin-Grundgerüst besitzen. Hierbei konnte für weder R-Benzodiazepindion (*cyclo*(D-Trp-Ant)) noch für S-Benzodiazepindion *cyclo*(L-Trp-Ant)) eine Produktbildung durch die CDOs detektiert werden. Dies bestätigt erneut, dass die 2,5-DKP-Struktur der Substrate notwendig ist.

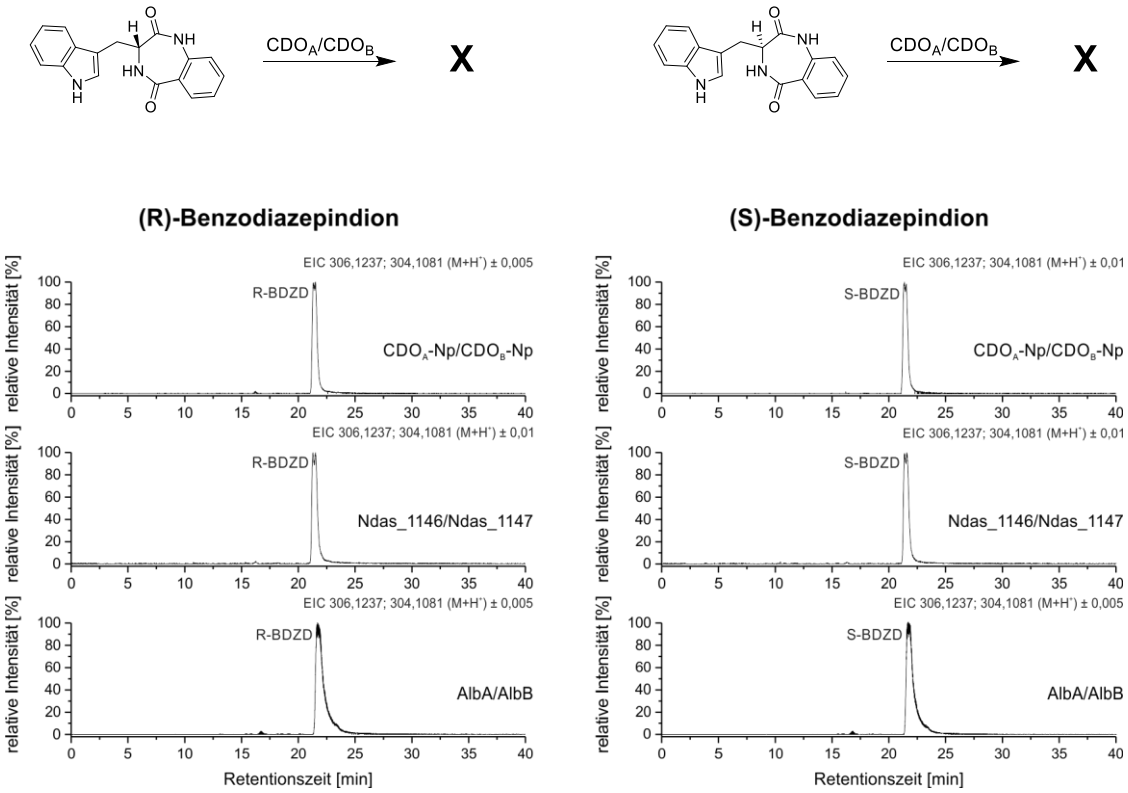


Abbildung 4-79: Enzymatische Umsetzung von R-Benzodiazepindion (R-BDZD) und S-Benzodiazepindion (S-BDZD) durch CDO$_A$-Np/CDO$_B$-Np, Ndas_1146/Ndas_1147 und AlbA/AlbB.

Cyclische Dipeptide mit Diketopiperazin-Struktur, bestehend aus zwei aromatischen Aminosäureresten, werden von den drei CDOs CDO$_A$-Np/CDO$_B$-Np, Ndas_1146/Ndas_1147 und AlbA/AlbB als Substrate in der Regel gut akzeptiert und zu einfach und zweifach dehydrierten Produkten umgesetzt. Aromatische cyclische Dipeptide mit Glycin-Resten, mit Ausnahme von *cyclo*(L-Trp-Gly), und mit Prolin-Resten werden jeweils zu einfach dehydrierten Produkten umgesetzt. Die Akzeptanz dieser prolin-haltigen Substrate hängt sehr wahrscheinlich mit dem aromatischen Anteil zusammen, da weitere prolin-haltige Substrate wie *cyclo*(L-His-L-Pro) mit seinem basischen Rest nicht nennenswert, *cyclo*(L-Pro-L-Leu) und *cyclo*(L-Pro-L-Val) mit ihren hydrophoben Resten gar nicht und *cyclo*(L-Pro-L-Thr) mit seinem saurem Rest ebenso nicht umgesetzt werden. Ähnliches gilt für *cyclo*(L-Trp-L-His), welches durch alle CDOs akzeptiert wird, wogegen *cyclo*(L-His-L-Gly) gar nicht und *cyclo*(L-His-L-Pro) in nicht nennenswerten Mengen umgesetzt wird. Die fehlende Umsetzung von *cyclo*(L-Trp-Gly), die Umsetzung von *cyclo*(L-Trp-L-Ala), mit aromatischen und hydrophoben Resten, zu lediglich einfach dehydrierten Produkten, und *cyclo*(L-Trp-L-Leu) zu einfach und zweifach dehydrierten Produkten, verdeutlicht die

Rolle der Größe des hydrophoben Restes. Die Notwendigkeit des aromatischen Restes auf der anderen Seite wird wiederum durch die fehlende Akzeptanz der CDOs gegenüber von *cyclo*(L-Pro-L-Leu), verdeutlicht. Besonders interessant ist die Umsetzung von *cyclo*(L-Glu-L-Glu) durch die CDOs. Es handelt sich hierbei um ein nicht natürliches Substrat mit sauren Resten, welches zu einfach dehydrierten Produkten umgesetzt wird.

Im Vergleich der drei CDOs miteinander fällt auf, dass CDO_A-Np/CDO_B-Np die tyrosin-haltigen Substraten *cyclo*(L-Tyr-Gly), *cyclo*(L-Tyr-L-Pro) und *cyclo*(L-Tyr-L-Ser) deutlich besser akzeptiert als die anderen beiden CDOs. Aus diesen Untersuchungen ergibt sich eine Tendenz von Ndas_1146/ Ndas_1147 tryptophan-haltige Substrate (*cyclo*(L-Trp-L-Pro), *cyclo*(L-Trp-L-Ala), *cyclo*(L-Trp-L-Phe) und *cyclo*(L-Trp-L-His)) deutlich besser umzusetzen, als dies die anderen beiden CDOs tun. Dies ist erstaunlich, da keines dieser Substrate zu den natürlichen Substraten der CDO gehört. Bei AlbA/AlbB fällt auf, dass diese im Vergleich *cyclo*(L-Phe-L-Gly) deutlich besser akzeptiert.

Die Untersuchungen hinsichtlich verschiedener Stereoisomere als Substrate zeigen, dass das *cyclo*(L-Xxx-L-Xxx) Stereoisomer im Vergleich von den CDOs jeweils am besten akzeptiert wird. So konnten bei allen vier Stereoisomeren von *cyclo*(Trp-Ala) jeweils einfach dehydrierte Produkte detektiert werden. Hierbei wurde jedoch *cyclo*(L-Trp-L-Ala) durch die CDOs deutlich besser akzeptiert als die drei übrigen Stereoisomere. Bei *cyclo*(L-Tyr-L-Trp) führte die Umsetzung zu einfach und zweifach dehydrierten, hingegen bei *cyclo*(L-Tyr-D-Trp) lediglich zu einfach dehydrierten Produkten.

Des Weiteren bekräftigt die fehlende Umsetzung von R-Benzodiazepindion (*cyclo*(D-Trp-Ant)) und S-Benzodiazepindion *cyclo*(L-Trp-Ant)) durch die CDOs wiederum die Notwendigkeit des 2,5-DKP-Grundgerüstes der Substrate.

Aus diesen Reaktionen ergibt sich, dass sich die drei CDOs sehr ähnlich, aber eben nicht gleich verhalten.

4.2.4 Analysen zum putativen Reaktionsmechanismus der Cyclodipeptidoxidasen

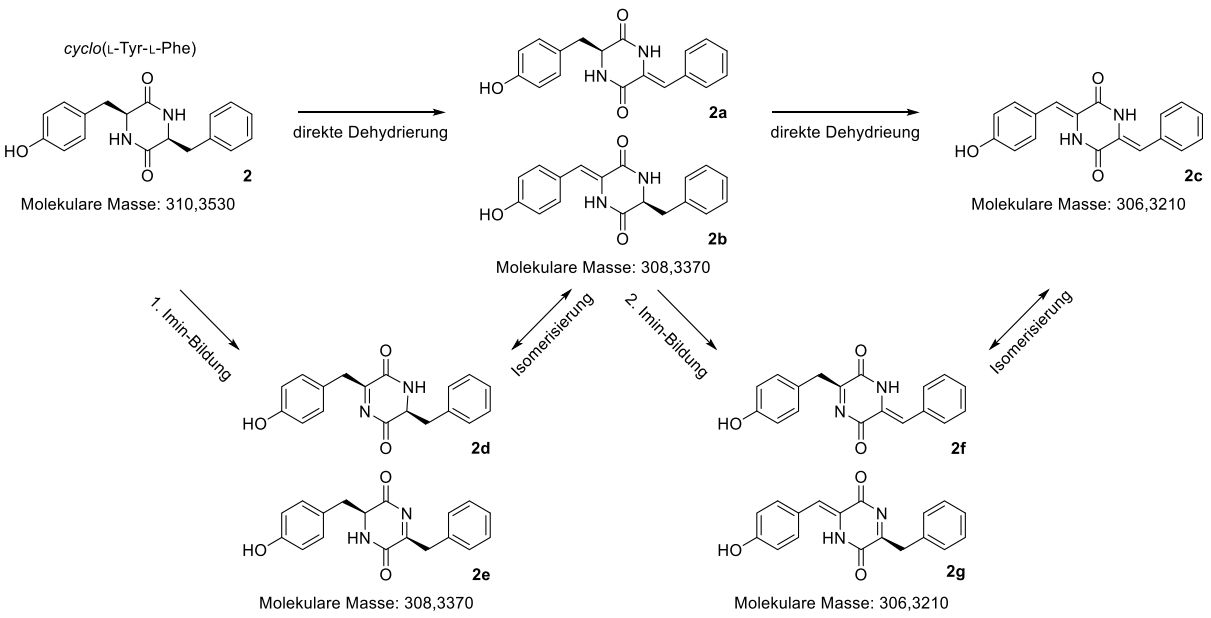


Abbildung 4-80: Putativer Reaktionsmechanismen der Cyclodipeptidoxidasen bei der Umsetzung von cyclo(L-Tyr-L-Phe).

Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass CDOs eine Vielzahl an cyclischen Dipeptiden als Substrate akzeptierten, allerdings konnte der Reaktionsmechanismus bisher nicht geklärt werden. Es besteht hierbei die Möglichkeit einer direkten α,β-Dehydrierung, eine β-Hydroxylierung mit anschließender Dehydratisierung sowie einer Imin-Bildung in Verbindung mit einer anschließenden Isomerisierung zum Enamin (Gondry *et al.*, 2001).

Da sich die molekulare Massen der Strukturen **2a**, **2b**, **2d** und **2e** sowie **2c**, **2f** und **2g** nicht unterscheiden (Abbildung 4-80), ist es nicht möglich im Rahmen der zuvor beschriebenen Reaktionen eventuelle Imin-Strukturen mittels LC-MS zu detektieren. Um genau dies zu ermöglichen wurde von Frau Rixa Kraut freundlicherweise deuteriertes *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) (**5**) synthetisiert. Aufgrund der unterschiedlichen Massen der möglichen Intermediate **5d** und **5e** bzw. **5f** und **5g** ist es nun möglich einen Hinweis auf den Reaktionsmechanismus der CDO zu erhalten (Abbildung 4-81). Zu diesem Zweck wurde in einer Biotransformation mit jeweils einer der drei verfügbaren CDOs CDO_A-Np/CDO_B-Np, Ndas_1146/Ndas_1147 und AlbA/AlbB das Substrat **5** zugegeben (Kapitel 3.7.6.1) und die Reaktion anschließend mittels LC-MS analysiert (Kapitel 3.9.1).

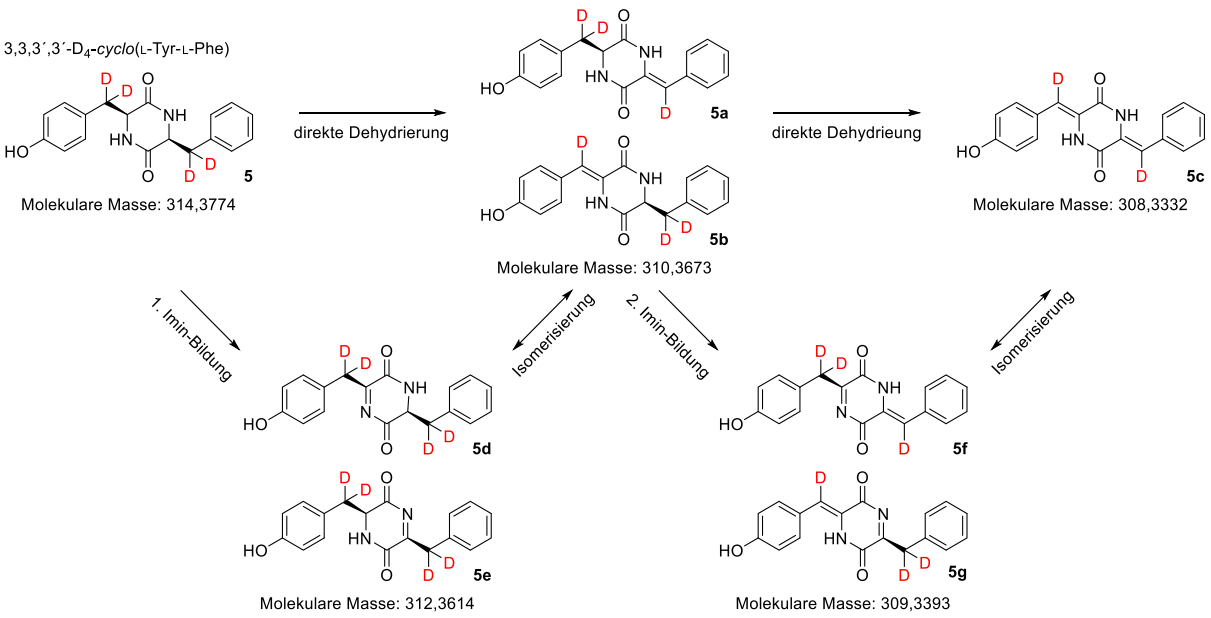


Abbildung 4-81: Putativer Reaktionsmechanismen der Cyclodipeptidoxidasen bei der Umsetzung von deuteriertem cyclo(L-Tyr-L-Phe).

In der Abbildung 4-82 ist das Resultat der Biotransformation von 3-,3-,3‘-,3‘-D_4-*cyclo*(L-Tyr-L-Phe) (**5**) durch CDO_A-Np und CDO_B-Np dargestellt. Es konnten zwei jeweils einfach dehydrierte Produkte identifiziert werden. Einer dieser beiden Peaks weist mit einer Retentionszeit von 23,1 min ein $[M+H]^+$-Ion von m/z = 312,1407 auf, welches mit einer Abweichung von 4,8 ppm gut mit dem berechneten $[M+H]^+$-Ion von 3-,3-,3‘-D_3-*cyclo*(L-Tyr-ΔPhe) (**5a**) oder 3-,3‘-,3‘-D_3-*cyclo*(ΔTyr-L-Phe) (**5b**) mit m/z = 312,1422 übereinstimmt. Der andere dieser beiden Peaks bei einer Retentionszeit von 24,4 min stimmt ebenso mit seinem $[M+H]^+$-Ion von m/z = 312,1416 bei einer Abweichung von 1,9 ppm mit dem berechneten $[M+H]^+$-Ion von **5a** oder **5b** mit m/z = 312,1422 überein. Mit dem Peak bei der Retentionszeit von 28,9 min konnte ein zweifach dehydriertes Produkt identifiziert werden. Das $[M+H]^+$-Ion von mit m/z = 309,1195 weicht mit 2,5 ppm von dem berechneten $[M+H]^+$-Ion von 3-,3‘-D_2-*cyclo*(ΔTyr-ΔPhe) (**5c**) mit m/z = 309,1203 ab (Anhang, Tabelle 7-16). Es konnten hierbei keine Produkte detektiert werden, welche mit den berechneten $[M+H]^+$-Ionen von m/z = 313,1485 bzw. m/z = 310,1265 mit **5d** oder **5e** bzw. **5f** oder **5g** korrespondieren.

Um einen Hinweis darüber zu bekommen, ob es sich bei den einfach dehydrierten Produkten um 3-,3-,3‘-D_3-*cyclo*(L-Tyr-ΔPhe) (**5a**) oder 3-,3‘-,3‘-D_3-*cyclo*(ΔTyr-L-Phe) (**5b**) handelt, wurde das Fragmentierungsmuster von protoniertem *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) (Anhang, Abbildung 7-2) auf das Fragmentierungsmuster von protoniertem 3-,3-,3‘-,3‘-D_4-*cyclo*(L-Tyr-L-Phe) übertragen (Anhang, Abbildung 7-14).

Bei der Untersuchung der Fragmentierung von **5** konnten unter anderem die markanten Fragmente mit m/z = 122,0916 ([M+H-CO-Rest]$^+$), 138,0865 ([M+H-CO-Rest]$^+$) und 207,1094 ([M+H-Substituent]$^+$) zugeordnet werden (Anhang, Abbildung 7-15). Das Fragment mit m/z = 204,0861 ([M+H-Substituent]$^+$) des einfach dehydrierten Produktes mit dem Peak bei der Retentionszeit von 23,1 min weist auf die Struktur von **5a** hin (Anhang, Abbildung 7-16). Hingegen deutet das Fragment mit m/z = 135,0682 ([M+H-CO-Rest]$^+$) des einfach dehydrierten Produktes mit dem Peak bei der Retentionszeit von 24,4 min auf die Anwesenheit von **5b** hin (Anhang, Abbildung 7-17).

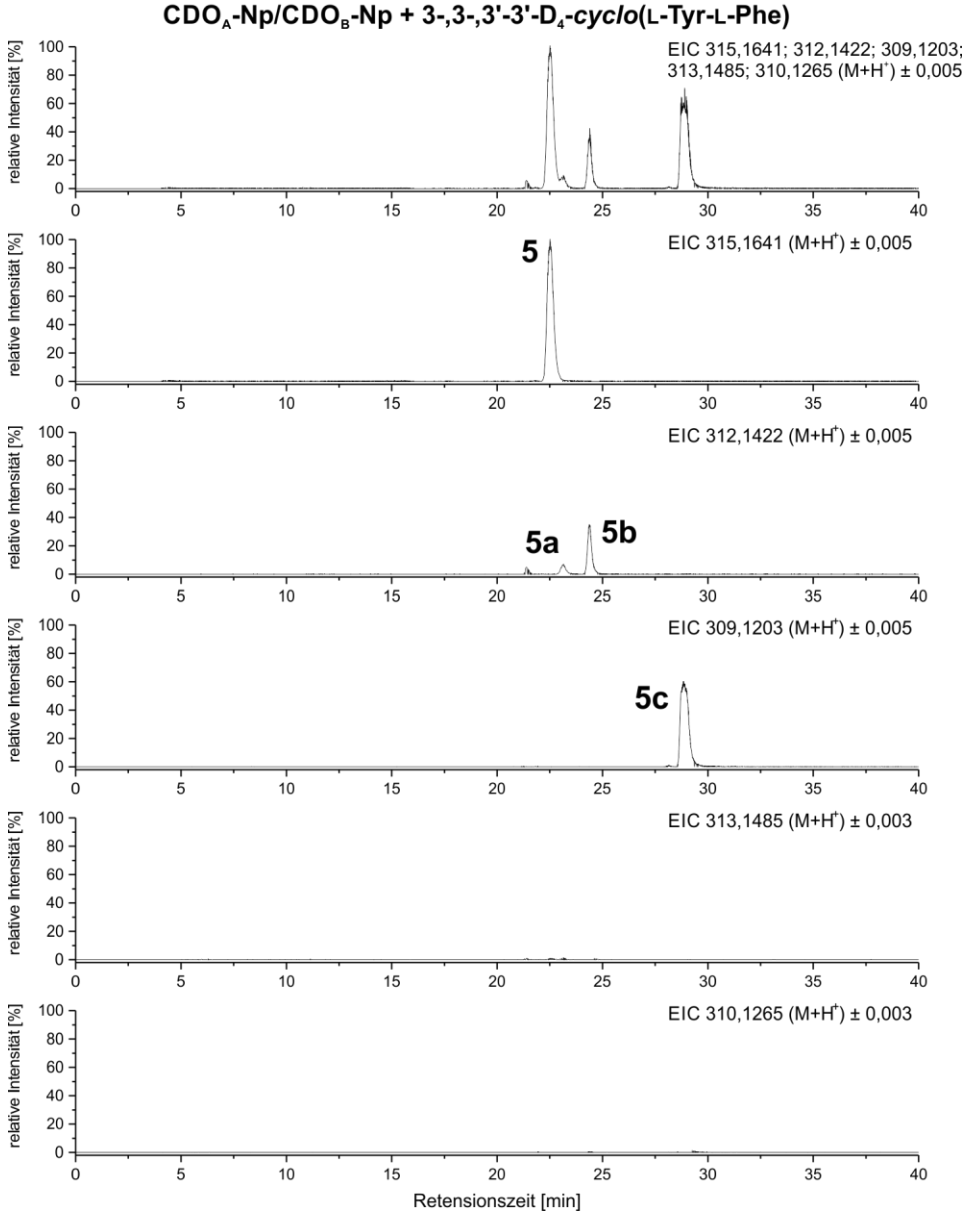


Abbildung 4-82: Biotransformation von deuteriertem cyclo(L-Tyr-L-Phe) durch CDO$_A$-Np und CDO$_B$-Np aus Nocardiopsis prasina NRRL B-16235.

In der Abbildung 4-83 ist das Ergebnis der Biotransformation von **5** durch Ndas_1146 und Ndas_1147 abgebildet. Auch bei dieser Reaktion konnten zwei jeweils einfach dehydrierte Produkte **5a** und **5b** sowie ein zweifach dehydriertes Produkt **5c** identifiziert werden. Die entsprechenden HR-ESI-MS Daten sind im Anhang in Tabelle 7-17 gelistet. Auch in dieser Reaktion konnten weder Produkte identifiziert werden, welche mit dem berechneten $[M+H]^+$-Ion von m/z = 313,1485 auf die Präsenz von **5d** oder **5e** deuten, noch Produkte deren $[M+H]^+$-Ion von m/z = 310,1265 mit **5f** oder **5g** korrespondieren.

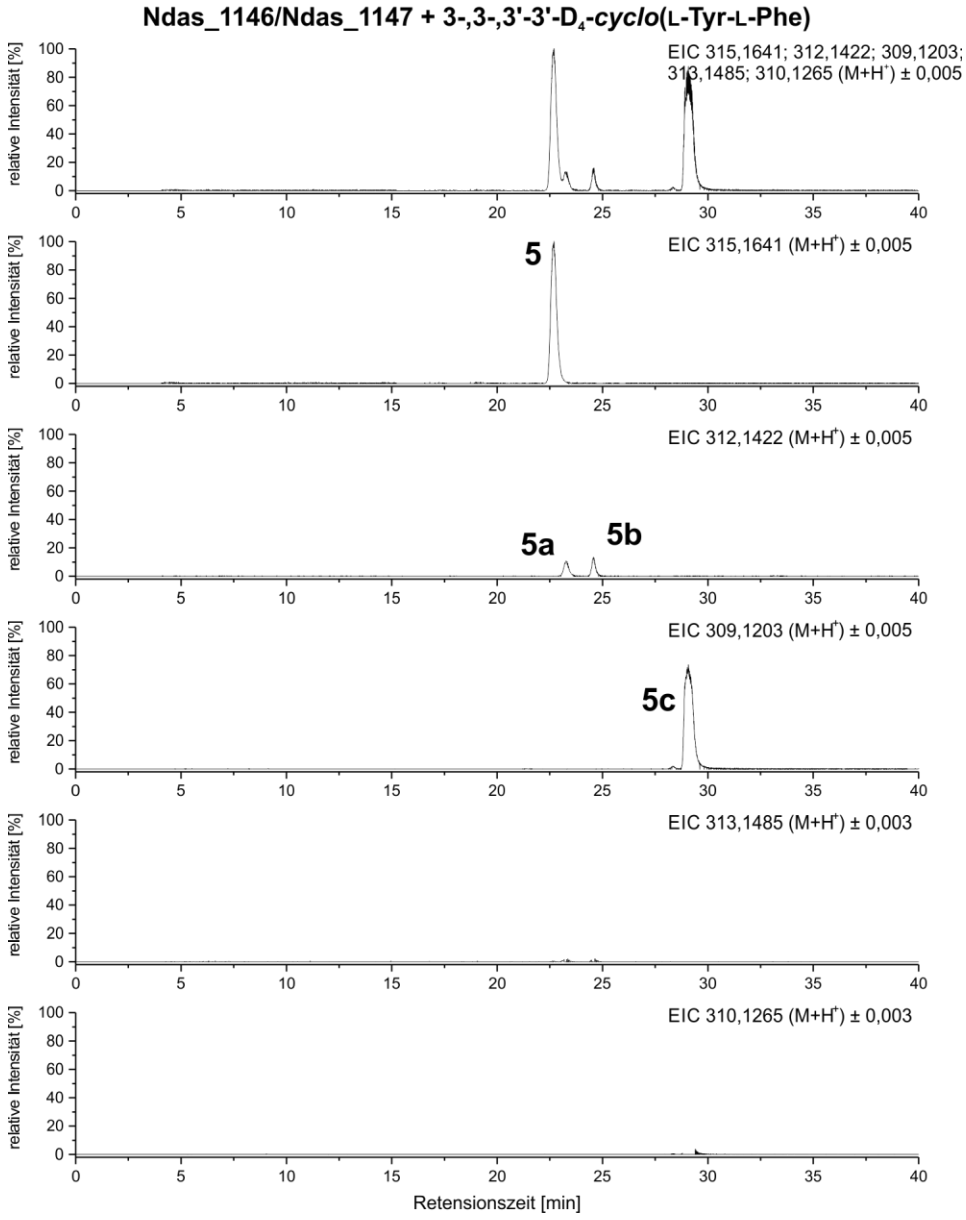


Abbildung 4-83: Biotransformation von deuteriertem cyclo(L-Tyr-L-Phe) durch Ndas_1146 und Ndas_1147 aus Nocardiopsis dassonvillei.

Bei der Analyse der Fragmentierung von **5** konnten wieder die markanten Fragmente mit m/z = 122,0921 ($[M+H-CO-Rest]^+$), 138,0870 ($[M+H-CO-Rest]^+$) und 207,1100 ($[M+H-Substituent]^+$) zugeordnet werden (Anhang, Abbildung 7-18). Die beiden Fragmente von **5a** mit m/z = 138,0875 ($[M+H-CO-Rest]^+$) und 204,0880 ($[M+H-Substituent]^+$) weist ebenso auf die Struktur von 3-,3-,3‘-D_3-

cyclo(L-Tyr-ΔPhe) hin (Anhang, Abbildung 7-19). Das Fragment von **5b** mit m/z = 135,0662 ([M+H-CO-Rest]$^+$) deutet auch hier auf die Anwesenheit von 3-,3‘-,3‘-D_3-*cyclo*(ΔTyr-L-Phe) hin (Anhang, Abbildung 7-20).

Das Resultat der enzymatischen Umsetzung von **5** durch AlbA und AlbB ist in der Abbildung 4-84 dargestellt. Bei dieser Reaktion konnten wieder zwei jeweils einfach dehydrierte Produkte **5a** und **5b** sowie ein zweifach dehydriertes Produkt **5c** identifiziert werden, deren entsprechenden HR-ESI-MS Daten im Anhang in Tabelle 7-18 aufgelistet sind. In dieser Reaktion konnten wiederum keine Produkte identifiziert werden, welche mit dem berechneten [M+H]$^+$-Ion von m/z = 313,1485 bzw. 310,1265 auf die Präsenz von **5d** oder **5e** bzw. **5f** oder **5g** hinweisen.

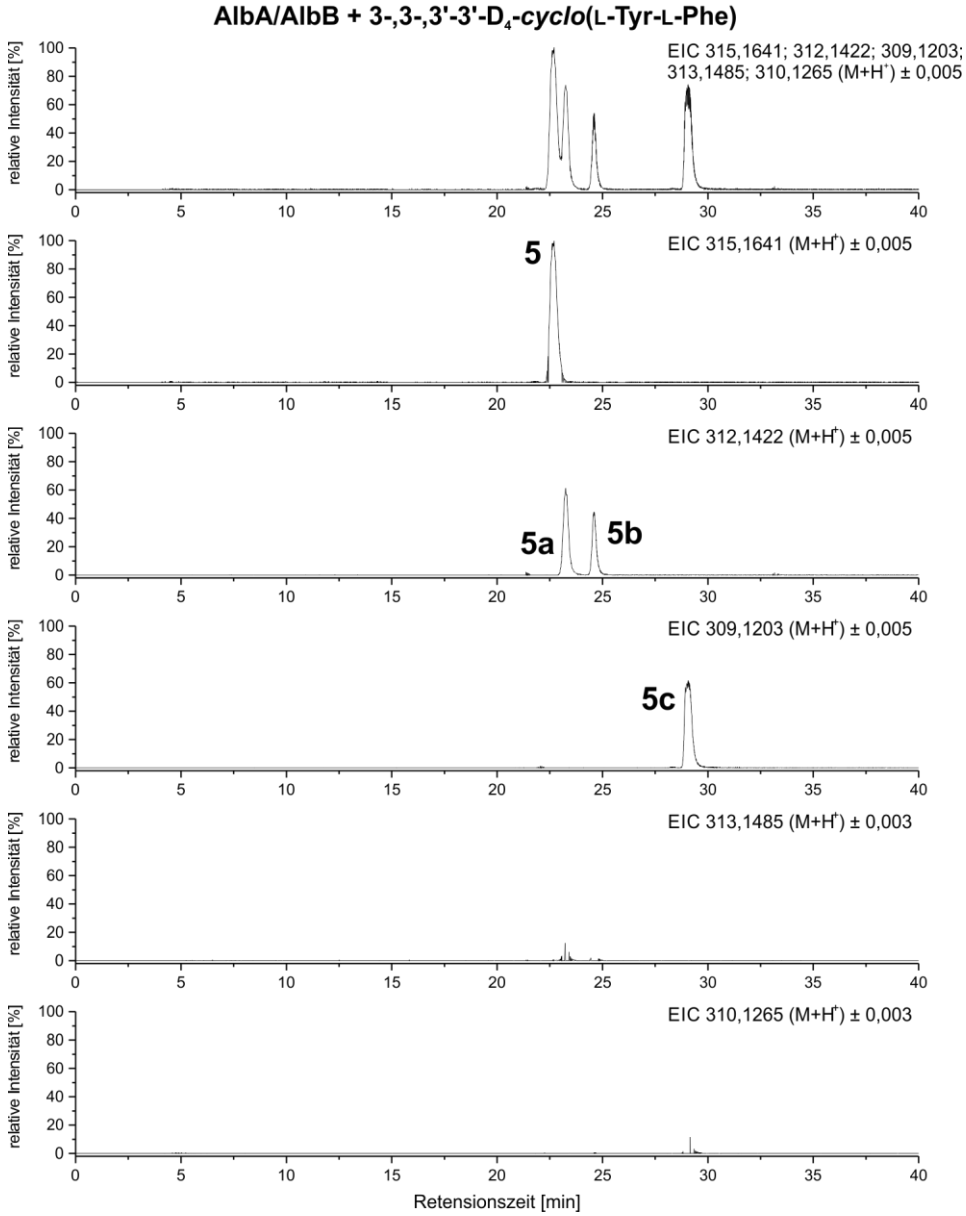


Abbildung 4-84: Biotransformation von deuteriertem cyclo(L-Tyr-L-Phe) durch AlbA und AlbB aus Streptomyces noursei.

Bei der Analyse der Fragmentierung von **5** konnten wieder die markanten Fragmente mit m/z = 122,0895 ([M+H-CO-Rest]$^+$), 138,0863 ([M+H-CO-Rest]$^+$) und 207,1098 ([M+H-Substituent]$^+$) zugeordnet werden (Anhang, Abbildung 7-21). Das Fragment von **5a** mit m/z = 204,0874 ([M+H-Substituent]$^+$) weist ebenso auf die Struktur von 3-,3-,3'-D_3-*cyclo*(L-Tyr-ΔPhe) hin (Anhang, Abbildung 7-22). Die beiden Fragmente von **5b** mit m/z = 122,0909 und 135,0650 ([M+H-CO-Rest]$^+$) deuten auch hier auf die Anwesenheit von 3-,3'-,3'-D_3-*cyclo*(ΔTyr-L-Phe) hin (Anhang, Abbildung 7-23).

In diesen untersuchten Reaktionen der drei CDOs konnten jeweils zwei einfach dehydrierte Produkte 3-,3-,3'-D_3-*cyclo*(L-Tyr-ΔPhe) (**5a**) und 3-,3'-,3'-D_3-*cyclo*(ΔTyr-L-Phe) (**5b**) sowie ein zweifach dehydriertes Produkt 3-,3'-D_2-*cyclo*(ΔPhe-ΔTyr) (**5c**) identifiziert werden (Abbildung 4-86). Es konnten hierbei keine Produkte detektiert werden, welche auf die Bildung einer Imin-Zwischenstufe (**5d**, **5e**, **5f** oder **5g**) hinweisen. Des Weiteren wurde keinerlei Hinweis auf eine Hydroxylierung gefunden (Daten nicht gezeigt). So konnten in keiner dieser Reaktionen Produkte identifiziert werden, welche mit dem berechneten [M+H]$^+$-Ion von m/z = 330,1528 auf die Präsenz von **5h** oder **5i** (Abbildung 4-85) hinweisen.

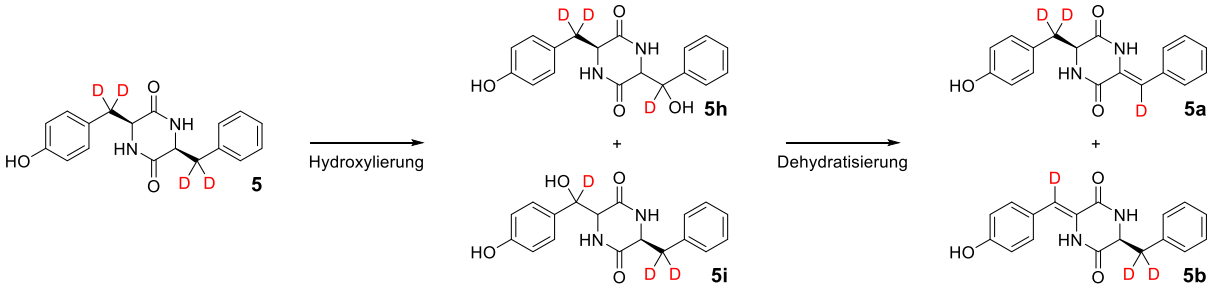


Abbildung 4-85: Putativer Reaktionsmechanismen der Cyclodipeptidoxidasen bei der Umsetzung von deuteriertem cyclo(L-Tyr-L-Phe) durch Hydroxylierung und anschließende Dehydratisierung.

Die Ergebnisse dieser Versuche deuten darauf hin, dass es sich bei dem Reaktionsmechanismus der CDOs wahrscheinlich um eine direkte Dehydrierung handelt (Abbildung 4-86).

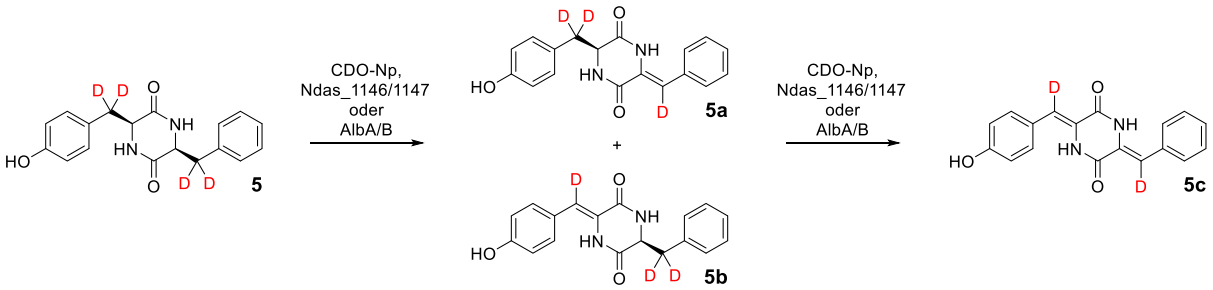


Abbildung 4-86: Enzymatische Reaktion von deuteriertem cyclo(L-Tyr-L-Phe) durch CDO_A-Np/CDO_B-Np, Ndas_1146/Ndas1147 oder AlbA/AlbB.

5 Diskussion

5.1 Die Cyclodipeptidsynthase CDPS-Np aus *Nocardiopsis prasina* NRRL B-16235

Die Cyclodipeptidsynthase CDPS-Np aus *N. prasina* NRRL B-16235 produziert mit *cyclo*(L-Tyr- L-Phe) als Hauptprodukt sowie *cyclo*(L-Tyr-L-Tyr), *cyclo*(L-Tyr-L-Met) und *cyclo*(L-Tyr- L-Leu) oder *cyclo*(L-Tyr- L-Ile) als Nebenprodukte, tyrosin-haltige cyclische Dipeptide. Ndas_1148 synthetisiert die Hauptprodukte *cyclo*(L-Phe-L-Tyr), *cyclo*(L-Phe- L-Phe) und *cyclo*(L-Phe- L-Leu) sowie die Nebenprodukte *cyclo*(L-Phe- L-Met), *cyclo*(L-Phe- L-Ala), *cyclo*(L-Tyr- L-Tyr) und *cyclo*(L-Tyr- L-Leu). Die Aminosäuresequenz von CDPS-Np und Ndas_1148 ist zu 68 % identisch. Eine Produktbildung von phenylalanin-haltigen cyclischen Dipeptiden durch CDPS-Np, mit Ausnahme des Hauptproduktes *cyclo*(L-Tyr-L-Phe), konnte entgegen der vorherigen Vermutung nicht beobachtet werden. Die Identität auf Aminosäureebene zwischen CDPS-Np und den beiden CDPSs WP_015033069.1 aus *Streptomyces venezuelae* (Jacques *et al.*, 2015) und WP_003411681.1 aus *M. tuberculosis* (Belin *et al.*, 2012), welche mit *cyclo*(L-Tyr- L-Tyr) (92 %) bzw. *cyclo*(L-Tyr-L-Tyr) (91 %) und *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) (6 %) ebenso tyrosin-haltige cyclische Dipeptide synthetisieren, beträgt hingegen lediglich 34 bzw. 28 %. In diesen Fällen könnte die vermeintlich geringe Identität die unterschiedlichen Herkünfte dieser Organismen (Phylum) zur Ursache haben. Es ist jedoch bisher keine weitere CDPS aus der Gattung *Nocardiopsis* bekannt, welche wie CDPS-Np lediglich tyrosin-haltige cyclische Dipeptide hervorbringt. Die Identität in den Aminosäuresequenzen der CDPSs lässt also bei bisheriger Datenlage keine zuverlässigen Schlüsse auf deren Produktbildung zu.

Durch Mutagenese-Experimente konnte gezeigt werden, dass die gezielte Mutation von Aminosäuren in der Bindetasche P1 sowie P2 des aktiven Zentrums zu unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten führen kann. Es war, im Rahmen dieser Arbeit, jedoch nicht möglich durch gezielte Mutagenese die Substratspezifität zu ändern. Dies bedeutet, dass die Aminosäuren im aktiven Zentrum ebenso keinen verlässlichen Rückschluss auf die Produktbildung von CDPSs zulassen, sondern lediglich einen begründeten Verdacht. Die Ergebnisse zeigen, dass trotz Mutation aller beschriebenen Positionen innerhalb der Bindetaschen P1 und P2, und somit identischen Sequenzmotiven von CDPS-Np und Ndas_1148, keine Verschiebung der Substratspezifität von CDPS-Np von tyrosin-haltigen zu phenylalanin-haltigen cyclischen Dipeptiden, insbesondere *cyclo*(L-Phe-L-Phe), erzielt werden konnte. Daher wird im Rahmen dieser Arbeit besonders deutlich, dass es nach wie vor notwendig ist, die Funktionen von putativen CDPSs experimentell zu ermitteln.

5.2 Die Cyclodipeptidoxidasen aus Actinobacteria

5.2.1 Die Cyclodipeptidoxidase CDO_A-Np und CDO_B-Np aus *N. prasina*

Die in Kapitel 4.2.1 beschriebene phylogenetische Analyse beruht auf Daten mit dem Stand von 2016. Da sich die Annotierung der CDPSs sowie CDOs im Verlauf dieser Arbeit teilweise verändert hat und CDO_B-Np aktuell nicht in der NCBI Datenbank annotiert ist, wurden diese Daten nicht erneut aktualisiert. Sie geben dennoch einen gewissen Überblick über das Vorkommen von CDOs in Actinobacteria.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde zum Beispiel die Annotierung in der Datenbank von NCBI von CDO_B-Np, von anfangs WP_017544374.1 in später WP_026129216.1, geändert. Für die in Kapitel 4.2.2.4 beschriebenen Experimente spielt die Annotierung von CDO_B-Np zunächst keine Rolle, da das Konstrukt pKB81 die überlappende Sequenz von *CDO_A-Np* und *CDO_B-Np* enthält und somit der Annotierung von CDO_B-Np durch WP_017544374.1 sowie durch WP_026129216.1 gerecht wird. Aufgrund der identischen Größe von WP_026129216.1 im Vergleich zu AlbB und Ndas_1147 sowie die höhere Sequenzidentität zueinander, ist diese Annotierung jedoch wahrscheinlicher als die ursprüngliche Annotierung. Die Annotierung durch WP_026129216.1 konnte später durch die Experimente in Kapitel 4.2.2.9 bestätigt werden.

In Kapitel 4.2.2.5 wurde die *E*- und *Z*-Isomerie der Produkte von CDO-Np betrachtet. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass CDO-Np die drei Produkte *cyclo*(L-Tyr-ΔPhe) (**2a**), *cyclo*(ΔTyr-L-Phe) (**2b**) und *cyclo*(ΔTyr-ΔPhe) (**2c**) hervorbringt. Nach Inkubation der Proben im Licht, konnten weitere Substanzen detektiert werden, welche als *E*- und *Z*-Isomere betrachtet werden können. Da thermodynamisch gesehen die *Z*-Konfiguration die stabilere von beiden ist und die Isolierung von *Z*,*Z*-konfigurierten Albonoursin für bevorzugtes Einbringen von Doppelbindungen durch CDOs in *Z*-Konfiguration spricht (Gondry *et al.*, 2001), liegt es nahe, dass es sich bei **2a** und **2b** um *Z-cyclo*(L-Tyr-ΔPhe) und *Z-cyclo*(ΔTyr-L-Phe) handelt.

In Kapitel 4.2.2.7 konnte gezeigt werden, dass nicht nur CDO_A-Np und CDO_B-Np, sondern auch His_6-CDO_A-Np und CDO_B-Np-His_6 in *E. coli* aktiv sind und jeweils zusammen zur gewünschten CDO-Aktivität führen. Die Umsetzung von cFL zu cFL-2H und cFL-4H war hierbei von 97 % auf 68 % reduziert. Die beiden Untereinheiten der CDO liegen bekanntermaßen als großer Enzymkomplex vor. Die beiden zugefügten His_6-Tags verhindern die Aktivität dieses Enzymkomplexes im Falle von CDO_A-Np und CDO_B-Np also nicht, schränken diese jedoch erheblich ein. Für weitere Versuche im Vergleich zu den CDOs aus *N. dassonvillei* und *S. noursei* wurde folglich auf His_6-Tags verzichtet.

In Kapitel 4.2.2.8 wurden His_6-CDO_A-Np und CDO_B-Np-His_6 in *E. coli* überproduziert und gereinigt. Hierbei war es lediglich möglich CDO_A-Np in der Fraktion mit unlöslichem Protein zu detektieren. Da hierbei für die Proteinüberproduktion die Bedingungen der zuvor erfolgten Biotransformationen verwendet wurden, bedarf es hier sehr wahrscheinlich einer Optimierung der Reinigungs-Methode. Bisher wurde in der Literatur keine Reinigung der CDOs über Nickel-Affinitätschromatographie beschrieben. In Kapitel 4.2.2.13 wurden wiederum CDO_A-His_6 und CDO_B-His_6 bzw. Ndas_1146-His_6 und Ndas_1147-His_6 in *E. coli* überproduziert und gereinigt. Hierbei ist analog eine Optimierung der Reinigung notwendig. Durch die Biotransformation durch His_6-CDO_A und CDO_B-His_6 basierend auf dem Konstrukt pKB83 konnte gezeigt werden, dass diese His_6-Tags die gewünschte CDO-Aktivität nicht verhindern. Der Einfluss des His_6-Tags im Fall von CDO_A-His_6 ist allerdings noch nicht bekannt und sollte untersucht werden.

In Kapitel 4.2.2.10 konnte durch die Biotransformation basierend auf dem Konstrukt pKB158 die Notwendigkeit des Zusammenwirkens von CDO_A-Np und CDO_B-Np bestätigt werden. Gleichzeitig konnte hierbei die Funktionsfähigkeit der in der NCBI Datenbank annotierten Proteine WP_017544373.1 (CDO_A-Np) und WP_026129216.1 (CDO_B-Np) nachgewiesen werden. Das Konstrukt pKB158 steht nun für weiterführende Experimente zur Verfügung. Durch das getrennte Einbringen der beiden Untereinheiten sowie durch die zusätzlich eingefügten Restriktionsschnittstellen ist es nun prinzipiell möglich die unterschiedlichen Untereinheiten von unterschiedlichen CDOs in mehreren Kombinationen zu klonieren und die Auswirkung auf diesen Austausch zu untersuchen. Interessant wäre hierbei eine veränderte Substratspezifität der resultierenden Enzymkomplexe bzw. einen Hinweis auf die tatsächliche Funktion der Untereinheit CDO_B. Des Weiteren ist es möglich, über zwei weitere Restriktionsschnittstellen ein weiteres Gen in dieses Plasmid zu integrieren. So wäre es möglich eine zusätzliche CDPS zu klonieren und somit gezielte dehydrierte Substanzen in *E. coli* synthetisieren zu lassen.

5.2.2 Die drei Cyclodipeptidoxidasen aus *N. prasina*, *N. dassonvillei* und *S. noursei* im Vergleich

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die drei CDOs ein breites Spektrum an cyclischen Dipeptiden mit 2,5-DKP-Grundgerüst als Substrate akzeptieren. Hierbei verhalten sich die drei Enzyme zwar sehr ähnlich, jedoch nicht gleich. Während die Akzeptanz von AlbA/AlbB gegenüber bereits einiger unnatürlicher Substrate untersucht wurde, stellen diese Untersuchungen für CDO_A-Np/CDO_B-Np und Ndas_1146/Ndas_1147 die ersten dieser Art dar. Da vorherige Versuche der Reinigung der CDOs im Rahmen dieser Arbeit erfolglos waren und es nicht möglich war die CDOs zu quantifizieren, wurden die Methodik der Proteinüberproduktion sowie der anschließenden Biotransformation so genau wie möglich eingehalten. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass die Aussagen im Hinblick einer Quantifizierung der enzymatischen Produkte auf Basis der verwendeten Methoden limitiert sind. Trotz alledem wurden bisher keinerlei vergleichende Untersuchungen unterschiedlicher CDOs beschrieben. Aus den Ergebnissen lassen sich unterschiedliche Tendenzen ablesen, die einer weiteren Untersuchung bedürfen.

5.2.3 Der putative Reaktionsmechanismus der Cyclodipeptidoxidasen

Als mögliche Reaktionsmechanismen stehen eine direkte Dehydrierung, eine Hydroxylierung mit anschließender Dehydratisierung oder eine Imin-Bildung mit anschließender Isomerisierung zum Enamin zur Verfügung. Die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit deuten auf einen Reaktions-mechanimus der direkten Dehydrierung. Es kann an dieser Stelle jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Bildung von Imin-Zwischenstufen oder eine Hydroxylierung der Zwischenstufen aufgrund der Geschwindigkeit der Reaktion in diesem Rahmen nicht nachweisbar sein könnten. Chemisch betrachtet stellt das Enamin-Tautomer die stabilere Form da, da es sich zum einen bei 2,5-DKPs um sekundäre Amine handelt und zum anderen die Doppelbindung bei vielen aromatischen 2,5-DKPs in Konjugation zu weiteren Doppelbindungen steht. Um eine mögliche Verschiebung des Enamin-Imin-Gleichgewichtes zum Enamin durch eine Extraktion zu begünstigen, wurden die Reaktionen unmittelbar direkt anhand der Kultur analysiert und somit äußere Einflüsse minimiert.

6 Referenzen

Alqahtani, N., Porwal, S. K., James, E. D., Bis, D. M., Karty, J. A., Lane, A. L. & Viswanathan, R. (2015). Synergism between genome sequencing, tandem mass spectrometry and bio-inspired synthesis reveals insights into nocardioazine B biogenesis. *Org. Biomol. Chem* **13**, 7177-7192.

Aninat, C., Hayashi, Y., Andre, F. & Delaforge, M. (2001). Molecular requirements for inhibition of cytochrome p450 activities by roquefortine. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 1259-1265.

Arunrattiyakorn, P., Ikeda, B., Nitoda, T. & Kanzaki, H. (2007). Enzymatic synthesis of dehydroderivatives from proline-containing cyclic dipeptides and their effects toward cell division. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 830-833.

Arunrattiyakorn, P., Nitoda, T. & Kanzaki, H. (2006). Enzymatic conversion-based method for screening cyclic dipeptide-producing microbes. *Peptides* **27**, 633-639.

Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y. & Van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* **80**, 1-43.

Beau, F., Bollet, C., Coton, T., Garnotel, E. & Drancourt, M. (1999). Molecular identification of a *Nocardiopsis dassonvillei* blood isolate. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3366-3368.

Belin, P., Le Du, M. H., Fielding, A., Lequin, O., Jacquet, M., Charbonnier, J. B., Lecoq, A., Thai, R., Courcon, M., Masson, C., Dugave, C., Genet, R., Pernodet, J. L. & Gondry, M. (2009). Identification and structural basis of the reaction catalyzed by CYP121, an essential cytochrome P450 in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 7426-7431.

Belin, P., Moutiez, M., Lautru, S., Seguin, J., Pernodet, J. L. & Gondry, M. (2012). The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways. *Nat. Prod. Rep.* **29**, 961-979.

Bonnefond, L., Arai, T., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Ishitani, R. & Nureki, O. (2011). Structural basis for nonribosomal peptide synthesis by an aminoacyl-tRNA synthetase paralog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **108**, 3912-3917.

Borgman, P., Lopez, R. D. & Lane, A. L. (2019). The expanding spectrum of diketopiperazine natural product biosynthetic pathways containing cyclodipeptide synthases. *Org Biomol Chem* **17**, 2305-2314.

Borthwick, A. D. (2012). 2,5-diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products. *Chem. Rev.* **112**, 3641-3716.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Brautaset, T., Sekurova, O. N., Sletta, H., Ellingsen, T. E., StrLm, A. R., Valla, S. & Zotchev, S. B. (2000). Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chem. Biol.* **7**, 395-403.

Brockmeyer, K. & Li, S.-M. (2017). Mutations of residues in pocket P1 of a cyclodipeptide synthase strongly increase product formation. *J. Nat. Prod.* **80**, 2917-2922.

Brocq-Rousseu, D. (1904). Sur un Streptothrix cause de l'altération des avoines moisies. *Rev. Gen. Bot.* **16**, 219-230.

Bryans, J., Charlton, P., Chicarelli-Robinson, I., Collins, M., Faint, R., Latham, C., Shaw, I. & Trew, S. (1996). Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1 activity by two diketopiperazines, XR330 and XR334 produced by *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.* **49**, 1014-1021.

Cryle, M. J., Bell, S. G. & Schlichting, I. (2010). Structural and biochemical characterization of the cytochrome P450 CypX (CYP134A1) from *Bacillus subtilis*: a cyclo-L-leucyl-L-leucyl dipeptide oxidase. *Biochemistry* **49**, 7282-7296.

Cui, C. B., Kakeya, H., Okada, G., Onose, R., Ubukata, M., Takahashi, I., Isono, K. & Osada, H. (1995). Tryprostatins A and B, novel mammalian cell cycle inhibitors produced by *Aspergillus fumigatus*. *J. Antibiot.* **48**, 1382-1384.

Ettlinger, L., Corbaz, R. & Hütter, R. (1958). Zur Systematik der *Actinomyceten*. *Archiv. Mikrobiol.* **31**, 326-358.

Finoli, C., Vecchio, A., Galli, A. & Dragoni, I. (2001). Roquefortine C occurrence in blue cheese. *J. Food Prot.* **64**, 246-251.

Fu, P., Liu, P., Qu, H., Wang, Y., Chen, D., Wang, H., Li, J. & Zhu, W. (2011). α-pyrones and diketopiperazine derivatives from the marine-derived actinomycete *Nocardiopsis dassonvillei* HR10-5. *J. Nat. Prod.* **74**, 2219-2223.

Fukushima, K., Yazawa, K. & Arai, T. (1973). Biological activities of Albonoursin. *J. Antibiot.* **26**, 175-176.

Giessen, T. W. & Marahiel, M. A. (2014). The tRNA-dependent biosynthesis of modified cyclic dipeptides. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 14610-14631.

Giessen, T. W. & Marahiel, M. A. (2015). Rational and combinatorial tailoring of bioactive cyclic dipeptides. *Front Microbiol.* **6**, 785.

Giessen, T. W., von Tesmar, A. M. & Marahiel, M. A. (2013a). A tRNA-dependent two-enzyme pathway for the generation of singly and doubly methylated ditryptophan 2,5-diketopiperazines. *Biochemistry* **52**, 4274-4283.

Giessen, T. W., von Tesmar, A. M. & Marahiel, M. A. (2013b). Insights into the generation of structural diversity in a tRNA-dependent pathway for highly modified bioactive cyclic dipeptides. *Chem. Biol.* **20**, 828-838.

Gondry, M., Jacques, I. B., Thai, R., Babin, M., Canu, N., Seguin, J., Belin, P., Pernodet, J. L. & Moutiez, M. (2018). A comprehensive overview of the cyclodipeptide synthase family enriched with the characterization of 32 new enzymes. *Front Microbiol.* **9**, 46.

Gondry, M., Lautru, S., Fusai, G., Meunier, G., Menez, A. & Genet, R. (2001). Cyclic dipeptide oxidase from *Streptomyces noursei*. Isolation, purification and partial characterization of a novel, amino acyl α,β-dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **268**, 1712-1721.

Gondry, M., Sauguet, L., Belin, P., Thai, R., Amouroux, R., Tellier, C., Tuphile, K., Jacquet, M., Braud, S., Courcon, M., Masson, C., Dubois, S., Lautru, S., Lecoq, A., Hashimoto, S., Genet, R. & Pernodet, J. L. (2009). Cyclodipeptide synthases are a family of tRNA-dependent peptide bond-forming enzymes. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 414-420.

Gordon, R. E. & Horan, A. C. (1968). *Nocardia dassonvillei*, a macroscopic replica of *Streptomyces griseus*. *J. gen. Microbiol.* **50**, 235-240.

Grund, E. & Kroppenstedt, R. M. (1990). Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardiopsis* Meyer 1976. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**, 5-11.

Guo, Y.-C., Cao, S.-X., Zong, X.-K., Liao, X.-C. & Zhao, Y.-F. (2009). ESI-MS^n study on the fragmentation of protonated cyclic-dipeptides. *Spectroscopy* **23**, 131-139.

Hazen, E. L. & Brown, R. (1951). Fungicidin, an antibiotic produced by a soil *Actinomycete*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **76**, 93-7.

Huang, R. M., Yi, X. X., Zhou, Y., Su, X., Peng, Y. & Gao, C. H. (2014). An update on 2,5-diketopiperazines from marine organisms. *Mar. Drugs* **12**, 6213-6235.

Jacques, I. B., Moutiez, M., Witwinowski, J., Darbon, E., Martel, C., Seguin, J., Favry, E., Thai, R., Lecoq, A., Dubois, S., Pernodet, J. L., Gondry, M. & Belin, P. (2015). Analysis of 51 cyclodipeptide synthases reveals the basis for substrate specificity. *Nat. Chem Biol.* **11**, 721-727.

James, E. D., Knuckley, B., Alqahtani, N., Porwal, S., Ban, J., Karty, J. A., Viswanathan, R. & Lane, A. L. (2016). Two distinct cyclodipeptide synthases from a marine actinomycete catalyze biosynthesis of the same diketopiperazine natural product. *ACS Synth. Biol.* **5**, 547-553.

Jez, J. M., Ferrer, J. L., Bowman, M. E., Dixon, R. A. & Noel, J. P. (2000). Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry* **39**, 890-902.

Kanoh, K., Kohno, S., Asari, T., Harada, T., Karada, J., Muramatsu, M., Kawashima, H., Sekiya, H. & Uno, I. (1997). (-)-Phenylahistin: a new mammalian celll cycle inhibitor produced by *Aspergillus ustus*. *Bioorg. Med. Chem.* **7**, 2847-2852.

Kanoh, K., Kohno, S., Katada, J., Hayashi, Y., Muramatsu, M. & Uno, I. (1999). Antitumor activity of phenylahistin in vitro and in vivo. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 1130-1133.

Kanzaki, H., Imura, D., Nitoda, T. & Kawazu, K. (1999). Enzymatic dehydrogenation of cyclo(L-Phe-L-Leu) to a bioactive derivative, albonoursin. *J. Mol. Cat. B: Enzym* **6**, 265-270.

Kanzaki, H., Imura, D., Nitoda, T. & Kawazu, K. (2000a). Effective production of dehydro cyclic dipeptide albonoursin exhibiting pronuclear fusion inhibitory activity. II. Biosynthetic and bioconversion studies. *J Antibiot.* **53**, 58-62.

Kanzaki, H., Imura, D., Nitoda, T. & Kawazu, K. (2000b). Enzymatic conversion of cyclic dipeptides to dehydro derivatives that inhibit cell division. *J Biosci. Bioeng.* **90**, 86-89.

Kanzaki, H., Yanagisawa, S., Kanoh, K. & Nitoda, T. (2002). A novel potent cell cycle inhibitor dehydrophenylahistin--enzymatic synthesis and inhibitory activity toward sea urchin embryo. *J. Antibiot.* **55**, 1042-1047.

Kanzaki, H., Yanagisawa, S. & Nitoda, T. (2000c). Biosynthetic intermediates of the tetradehydro cyclic dipeptide albonoursin produced by *Streptomyces albulus* KO-23. *J Antibiot.* **53**, 1257-1264.

Kanzaki, H., Yanagisawa, S. & Nitoda, T. (2004). Enzymatic synthesis of dehydro cyclo(His-Phe)s, analogs of the potent cell cycle inhibitor, dehydrophenylahistin, and their inhibitory activities toward cell division. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 2341-2345.

Kopp-Holtwiesche, B. & Rehm, H. J. (1990). Antimicrobial action of roquefortine. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **10**, 41-44.

Lautru, S., Gondry, M., Genet, R. & Pernodet, J. L. (2002). The albonoursin gene cluster of *S. noursei*: Biosynthesis of diketopiperazine metabolites independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol.* **9**, 1355-1364.

Lechevalier, H. A. and Lechevalier, M. P. (1970). A critical evaluation of the genera of aerobic actinomycetes. (ed. Prauser,H.). pp. 393-405. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

Li, H.-W., Zhi, X.-Y., Yao, J.-C., Zhou, Y., Tang, S.-K., Klenk, H.-P., Zhao, J. & Li, W.-J. (2013). Comparative genomic analysis of the genus *Nocardiopsis* provides new insights into its genetic mechanisms of environmental adaptability. *PLoS One.* **8**, e61528.

Li, Y., Lai, Y. M., Lu, Y., Yang, Y. L. & Chen, S. (2014). Analysis of the biosynthesis of antibacterial cyclic dipeptides in *Nocardiopsis alba*. *Arch. Microbiol.* **196**, 765-774.

Liu, J., Yu, H. & Li, S.-M. (2018a). Correction to: Expanding tryptophan-containing cyclodipeptide synthase spectrum by identification of nine members from *Streptomyces s*trains. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **102**, 5787-5789.

Liu, J., Yu, H. & Li, S.-M. (2018b). Expanding tryptophan-containing cyclodipeptide synthase spectrum by identification of nine members from *Streptomyces* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **102**, 4435-4444.

Meng, S., Han, W., Zhao, J., Jian, X. H., Pan, H. X. & Tang, G. L. (2018). A six-oxidase cascade for tandem C-H bond activation revealed by reconstitution of bicyclomycin biosynthesis. *Angew. Chem Int. Ed. Engl.* **57**, 719-723.

Meyer, J. (1976). *Nocardiopsis*, a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**, 487-493.

Mishra, A. K., Choi, J., Choi, S. J. & Baek, K. H. (2017). Cyclodipeptides: An overview of their biosynthesis and biological activity. *Molecules.* **22**, E1796.

Miyashita, K., Mikami, Y. & Arai, T. (1984). Alkalophilic actinomycete, *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *prasina* subsp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**, 405-409.

Moutiez, M., Belin, P. & Gondry, M. (2017). Aminoacyl-tRNA-utilizing enzymes in natural product biosynthesis. *Chem Rev.* **117**, 5578-5618.

Moutiez, M., Schmitt, E., Seguin, J., Thai, R., Favry, E., Belin, P., Mechulam, Y. & Gondry, M. (2014a). Unravelling the mechanism of non-ribosomal peptide synthesis by cyclodipeptide synthases. *Nat. Commun.* **5**, 5141.

Moutiez, M., Seguin, J., Fonvielle, M., Belin, P., Jacques, I. B., Favry, E., Arthur, M. & Gondry, M. (2014b). Specificity determinants for the two tRNA substrates of the cyclodipeptide synthase AlbC from *Streptomyces noursei*. *Nucleic Acids Res.* **42**, 7247-7258.

Nicholson, B., Lloyd, G. K., Miller, B. R., Palladino, M. A., Kiso, Y., Hayashi, Y. & Neuteboom, S. T. (2006). NPI-2358 is a tubulin-depolymerizing agent: in-vitro evidence for activity as a tumor vascular-disrupting agent. *Anticancer Drugs* **17**, 25-31.

Nouioui, I., Carro, L., Garcia-Lopez, M., Meier-Kolthoff, J. P., Woyke, T., Kyrpides, N. C., Pukall, R., Klenk, H.-P., Goodfellow, M. & Göker, M. (2018). Genome-based taxonomic classification of the phylum *Actinobacteria*. *Front. Microbiol.* **9**, 2007.

Patteson, J. B., Cai, W., Johnson, R. A., Santa Maria, K. C. & Li, B. (2017). Identification of the biosynthetic pathway for the antibiotic Bicyclomycin. *Biochemistry.* **57**, 61-65.

Rao, H. C. Y., Rakshith, D., Gurudatt, D. M. & Satish, S. (2016). Implication of PKS type I gene and chromatographic strategy for the biodiscovery of antimicrobial polyketide metabolites from endosymbiotic *Nocardiopsis prasina* CLA68. *Sci Nat* **103**, 45.

Sauguet, L., Moutiez, M., Li, Y., Belin, P., Seguin, J., Le Du, M. H., Thai, R., Masson, C., Fonvielle, M., Pernodet, J. L., Charbonnier, J. B. & Gondry, M. (2011). Cyclodipeptide synthases, a family of class-I aminoacyl-tRNA synthetase-like enzymes involved in non-ribosomal peptide synthesis. *Nucleic Acids Res.* **39**, 4475-4489.

Schmitt, E., Bourgeois, G., Gondry, M. & Aleksandrov, A. (2018). Cyclization reaction catalyzed by cyclodipeptide synthases relies on a conserved tyrosine residue. *Sci. Rep.* **8**, 7031.

Seguin, J., Moutiez, M., Li, Y., Belin, P., Lecoq, A., Fonvielle, M., Charbonnier, J. B., Pernodet, J. L. & Gondry, M. (2011). Nonribosomal peptide synthesis in animals: the cyclodipeptide synthase of *Nematostella*. *Chem. Biol.* **18**, 1362-1368.

Shenoy, A. R. & Visweswariah, S. S. (2003). Site-directed mutagenesis using a single mutagenic oligonucleotide and *Dpn*I digestion of template DNA. *Anal. Biochem.* **319**, 335-336.

Skerman, V. B. D., McGowan, V. & Sneath, P. H. A. (1980). Approved lists of bacterial names. *INT. J. SYST. BACTERIOL* **30**, 225-420.

Sun, H., Lapidus, A., Nolan M., Lucas, S., Glavina Del Rino, T. & Tice, H. (2010). Complete genome sequence of Nocardiopsis dassonvillei type strain (IMRU 509^{T}). *Stand. Genomic. Sci.* **3**, 325-336.

Tian, W., Sun, C., Zheng, M., Harmer, J. R., Yu, M., Zhang, Y., Peng, H., Zhu, D., Deng, Z., Chen, S. L., Mobli, M., Jia, X. & Qu, X. (2018). Efficient biosynthesis of heterodimeric C^3-aryl pyrroloindoline alkaloids. *Nat. Commun.* **9**, 4428.

Tsujibo, H., Sakamoto, T., Miyamoto, K., Kusano, G., Ogura, M., Hasegawa, T. & Inamori, Y. (1990). Isolation of cytotoxic substance, Kalafungin from an alkalophilic actinomycete, *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *prasina*. *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 2299-2300.

Vetting, M. W., Hegde, S. S. & Blanchard, J. S. (2010). The structure and mechanism of the *Mycobacterium tuberculosis* cyclodityrosine synthetase. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 797-799.

Walsh, C. T. (2016). Insights into the chemical logic and enzymatic machinery of NRPS assembly lines. *Nat. Prod. Rep.* **33**, 127-135.

Yamazaki, Y., Tanaka, K., Nicholson, B., Deyanat-Yazdi, G., Potts, B., Yoshida, T., Oda, A., Kitagawa, T., Orikasa, S., Kiso, Y., Yasui, H., Akamatsu, M., Chinen, T., Usui, T., Shinozaki, Y., Yakushiji, F., Miller, B. R., Neuteboom, S., Palladino, M., Kanoh, K., Lloyd, G. K. & Hayashi, Y. (2012). Synthesis and structure-activity relationship study of antimicrotubule agents phenylahistin derivatives with a didehydropiperazine-2,5-dione structure. *J. Med. Chem* **55**, 1056-1071.

Yao, T., Liu, J., Liu, Z., Li, T., Li, H., Che, Q., Zhu, T., Li, D., Gu, Q. & Li, W. (2018). Genome mining of cyclodipeptide synthases unravels unusual tRNA-dependent diketopiperazine-terpene biosynthetic machinery. *Nat. Commun.* **9**, 4091.

Yassin, A. F., Rainey, F. A., Burghardt, J., Gierth, D., Ungerechts J., Lux, I., Seifert, P., Bal, C. & Schaal, K. P. (1997). Description of *Nocardiopsis synnemataformans* sp. nov., elevation of *Nocardiopsis alba* subsp. *prasina* to *Nocardiopsis prasina* comb. nov., and designation of *Nocardiopsis antarctica* and *Nocardiopsis alborubida* as later subjective synonyms of *Nocardiopsis dassonvillei*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 983-988.

Yu, H., Xie, X. & Li, S.-M. (2018). Coupling of guanine with *cyclo*-L-Trp-L-Trp mediated by a cytochrome P450 homologue from *Streptomyces purpureus*. *Org Lett.* **20**, 4921-4925.

Zhao, S., Smith, K. S., Deveau, A. M., Dieckhaus, C. M., Johnson, M. A., Macdonald, T. L. & Cook, J. M. (2002). Biological activity of the tryprostatins and their diastereomers on human carcinoma cell lines. *J. Med. Chem.* **45**, 1559-1562.

Zheng, L., Baumann, U. & Reymond, J. L. (2004). An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res.* **32**, e115.

Zou, G., Liao, X.-J., Peng, Q., Chen, G.-D., Wei, F.-Y., Xu, Z.-X., Zhao, B.-X. & Xu, S.-H. (2017). A new α-pyrone from the deep-sea actinomycete *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43111(T). *J. Asian. Nat. Prod. Res.* **19**, 1232-1238.

7 Anhang

7.1 Identifizierung der enzymatischen Produkte von CDPS-Np und deren Mutanten

Tabelle 7-1: HR-ESI-MS Daten der enzymatischen Produkte von CDPS-Np und deren Mutanten.

Enzym	Produkt	RT [min]	Summenformel $[M+H]^+$	m/z (berechnet) $[M+H]^+$	m/z (gemessen) $[M+H]^+$	Abweichung [ppm]
CDPS-Np	**1**	9,7	$C_{18}H_{19}N_2O_4$	327,1339	327,1317	6,8
	2	15,4	$C_{18}H_{19}N_2O_3$	311,1390	311,1378	3,8
	3	9,0	$C_{14}H_{19}N_2O_3S$	295,1111	295,1081	10,0
	4	11,0	$C_{14}H_{21}N_2O_3$	277,1547	277,1529	6,2
CDPS-Np_T82A	**1**	9,7	$C_{18}H_{19}N_2O_4$	327,1339	327,1320	5,9
	2	15,4	$C_{18}H_{19}N_2O_3$	311,1390	311,1384	2,0
	3		$C_{14}H_{19}N_2O_3S$	295,1111		
	4	11,1	$C_{14}H_{21}N_2O_3$	277,1547	277,1539	2,7
CDPS-Np_T82V	**1**	9,9	$C_{18}H_{19}N_2O_4$	327,1339	327,1337	0,8
	2	15,3	$C_{18}H_{19}N_2O_3$	311,1390	311,1393	-1,1
	3	9,2	$C_{14}H_{19}N_2O_3S$	295,1111	295,1105	1,9
	4	11,3	$C_{14}H_{21}N_2O_3$	277,1547	277,1540	2,4
CDPS-Np_Y196L	**1**	9,9	$C_{18}H_{19}N_2O_4$	327,1339	327,1348	-2,5
	2	15,6	$C_{18}H_{19}N_2O_3$	311,1390	311,1397	-2,2
	3	9,1	$C_{14}H_{19}N_2O_3S$	295,1111	295,1113	-0,6
	4	11,3	$C_{14}H_{21}N_2O_3$	277,1547	277,1554	-2,6
CDPS-Np_Y196F	**1**	9,7	$C_{18}H_{19}N_2O_4$	327,1339	327,1320	5,9
	2	15,4	$C_{18}H_{19}N_2O_3$	311,1390	311,1384	2,1
	3	9,0	$C_{14}H_{19}N_2O_3S$	295,1111	295,1083	9,5
	4	11,0	$C_{14}H_{21}N_2O_3$	277,1547	277,1533	4,9
CDPS-Np_T82A_Y196L	**1**	9,7	$C_{18}H_{19}N_2O_4$	327,1339	327,1317	6,9
	2	15,4	$C_{18}H_{19}N_2O_3$	311,1390	311,1379	3,6
	3		$C_{14}H_{19}N_2O_3S$	295,1111		
	4	11,1	$C_{14}H_{21}N_2O_3$	277,1547	277,1536	3,9
CDPS-Np_T82V_Y196L	**1**	9,7	$C_{18}H_{19}N_2O_4$	327,1339	327,1321	5,5
	2	15,4	$C_{18}H_{19}N_2O_3$	311,1390	311,1391	-0,1
	3	9,0	$C_{14}H_{19}N_2O_3S$	295,1111	295,1088	7,6
	4	11,0	$C_{14}H_{21}N_2O_3$	277,1547	277,1537	3,4
CDPS-Np_T82A_Y196F	**1**	9,7	$C_{18}H_{19}N_2O_4$	327,1339	327,1321	5,5
	2	15,4	$C_{18}H_{19}N_2O_3$	311,1390	311,1390	-0,1
	3	9,0	$C_{14}H_{19}N_2O_3S$	295,1111	295,1087	8,2
	4	11,1	$C_{14}H_{21}N_2O_3$	277,1547	277,1534	4,4
CDPS-Np_T82V_Y196F	**1**	9,7	$C_{18}H_{19}N_2O_4$	327,1339	327,1332	2,2
	2	15,4	$C_{18}H_{19}N_2O_3$	311,1390	311,1397	-2,2
	3	9,0	$C_{14}H_{19}N_2O_3S$	295,1111	295,1101	3,4
	4	11,1	$C_{14}H_{21}N_2O_3$	277,1547	277,1540	2,6

Tabelle 7-2: HR-ESI-MS Daten der enzymatischen Produkte von CDPS-Np und deren Mutanten.

Enzym	Produkt	RT [min]	Summenformel $[M+H]^+$	m/z (berechnet) $[M+H]^+$	m/z (gemessen) $[M+H]^+$	Abweichung [ppm]
CDPS-Np (pKB25)	**1**	9,6	$C_{18}H_{19}N_2O_4$	327,1339	327,1306	10,1
	2	15,6	$C_{18}H_{19}N_2O_3$	311,1390	311,1388	0,9
CDPS-Np (pKB150)	**1**	9,8	$C_{18}H_{19}N_2O_4$	327,1339	327,1309	9,4
	2	15,7	$C_{18}H_{19}N_2O_3$	311,1390	311,1379	3,5
CDPS-Np (pKB151)	**1**	9,6	$C_{18}H_{19}N_2O_4$	327,1339	327,1309	9,4
	2	15,6	$C_{18}H_{19}N_2O_3$	311,1390	311,1380	3,3

7.2 Aminosäure-Motive der beiden Bindungstaschen im aktiven Zentrum ausgewählter CDPSs

Tabelle 7-3: Aminosäure-Motive der beiden Bindungstaschen im aktiven Zentrum ausgewählter CDPSs.

CDPS	Aminosäuren in der Bindetasche P1								Aminosäuren in der Bindetasche P2							gebildetes 2,5-DKPs
AlbC	L_{33}	G_{35}	V_{65}	V_{67}	L_{119}	L_{185}	F_{186}	L_{200}	M_{152}	A_{155}	V_{156}	N_{159}	I_{204}	T_{206}	P_{207}	cFL, cFF, cFY, cFM, cYL, cYM, cYY, cYA, cLL, cMM, cLM, cVL
Ndas_1148	L_{37}	G_{39}	L_{69}	A_{71}	L_{123}	L_{185}	L_{186}	C_{200}	H_{156}	H_{159}	V_{160}	A_{163}	A_{204}	M_{206}	P_{207}	cFY, cFF, cFL, cYL, cYY, cFA, cFM
AFR08860 (B005_4463)	L_{36}	G_{38}	L_{68}	A_{70}	L_{122}	F_{184}	L_{185}	C_{199}	H_{155}	H_{158}	V_{159}	P_{162}	V_{203}	M_{205}	P_{206}	cYL, cFL
Rv2275	V_{84}	G_{86}	V_{116}	T_{118}	M_{170}	L_{236}	F_{237}	N_{251}	L_{203}	R_{206}	F_{207}	T_{210}	Q_{255}	L_{257}	P_{258}	cYY, cYF, cYL, cYA, cYM, cYW
Amir_4627	V_{33}	G_{35}	V_{65}	P_{67}	M_{119}	F_{184}	F_{185}	N_{199}	M_{152}	E_{155}	V_{156}	L_{159}	R_{203}	L_{205}	P_{206}	cWW
CDPS-Np	L_{48}	G_{50}	L_{80}	T_{82}	L_{134}	Y_{196}	L_{197}	C_{211}	H_{167}	Q_{170}	I_{171}	G_{174}	E_{215}	L_{217}	P_{218}	cYF, cYY, cYL, cYM
T82**A**	L_{48}	G_{50}	L_{80}	$\mathbf{A}_{82}$	L_{134}	Y_{196}	L_{197}	C_{211}	H_{167}	Q_{170}	I_{171}	G_{174}	E_{215}	L_{217}	P_{218}	cYF, cYY, cYL, cYM
T82**V**	L_{48}	G_{50}	L_{80}	$\mathbf{V}_{82}$	L_{134}	Y_{196}	L_{197}	C_{211}	H_{167}	Q_{170}	I_{171}	G_{174}	E_{215}	L_{217}	P_{218}	cYF, cYY, cYL, cYM
Y196**L**	L_{48}	G_{50}	L_{80}	T_{82}	L_{134}	$\mathbf{L}_{196}$	L_{197}	C_{211}	H_{167}	Q_{170}	I_{171}	G_{174}	E_{215}	L_{217}	P_{218}	cYF, cYY, cYL, cYM
Y196**F**	L_{48}	G_{50}	L_{80}	T_{82}	L_{134}	$\mathbf{F}_{196}$	L_{197}	C_{211}	H_{167}	Q_{170}	I_{171}	G_{174}	E_{215}	L_{217}	P_{218}	cYF, cYY, cYL, cYM
T82**A**_Y196**L**	L_{48}	G_{50}	L_{80}	$\mathbf{A}_{82}$	L_{134}	$\mathbf{L}_{196}$	L_{197}	C_{211}	H_{167}	Q_{170}	I_{171}	G_{174}	E_{215}	L_{217}	P_{218}	cYF, cYY, cYL, cYM
T82**V**_Y196**L**	L_{48}	G_{50}	L_{80}	$\mathbf{V}_{82}$	L_{134}	$\mathbf{L}_{196}$	L_{197}	C_{211}	H_{167}	Q_{170}	I_{171}	G_{174}	E_{215}	L_{217}	P_{218}	cYF, cYY, cYL, cYM
T82**A**_Y196**F**	L_{48}	G_{50}	L_{80}	$\mathbf{A}_{82}$	L_{134}	$\mathbf{F}_{196}$	L_{197}	C_{211}	H_{167}	Q_{170}	I_{171}	G_{174}	E_{215}	L_{217}	P_{218}	cYF, cYY, cYL, cYM
T82**V**_Y196**F**	L_{48}	G_{50}	L_{80}	$\mathbf{V}_{82}$	L_{134}	$\mathbf{F}_{196}$	L_{197}	C_{211}	H_{167}	Q_{170}	I_{171}	G_{174}	E_{215}	L_{217}	P_{218}	cYF, cYY, cYL, cYM

AlbC (Moutiez *et al.*, 2014a; Moutiez *et al.*, 2014b), Ndas_1148 (Giessen *et al.*, 2013b; Moutiez *et al.*, 2014a), Rv2275 (Moutiez *et al.*, 2014a), AFR08860 (B005_4463) (Li *et al.*, 2014) und Amir_4627 (Giessen *et al.*, 2013a; Moutiez *et al.*, 2014a) wurden bereits charakterisiert. CDPs mit geringen Ausbeuten sind in grau markiert. Mutationen sind durch fette Buchstaben gekennzeichnet. Mutanten von CDPS-Np in Position 82 und 196 sind blau und rot markiert. Doppel-Mutanten sind in lila markiert.

7.3 Multipler Sequenzvergleich von putativen CDOs benachbarten CDPS aus Actinobacteria

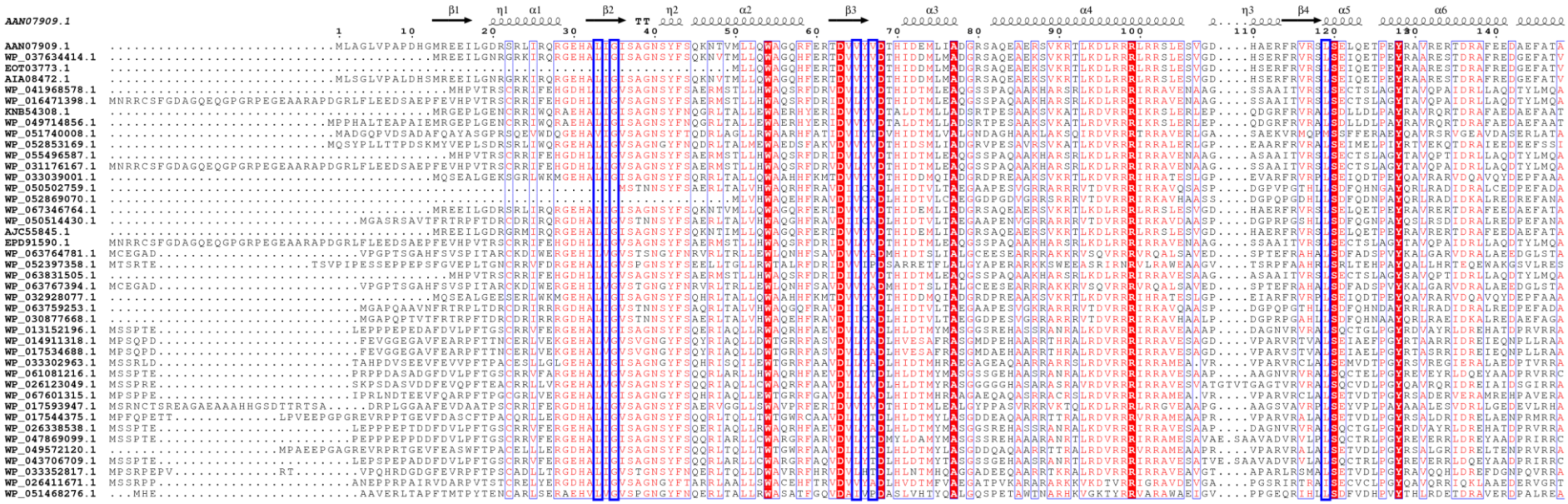
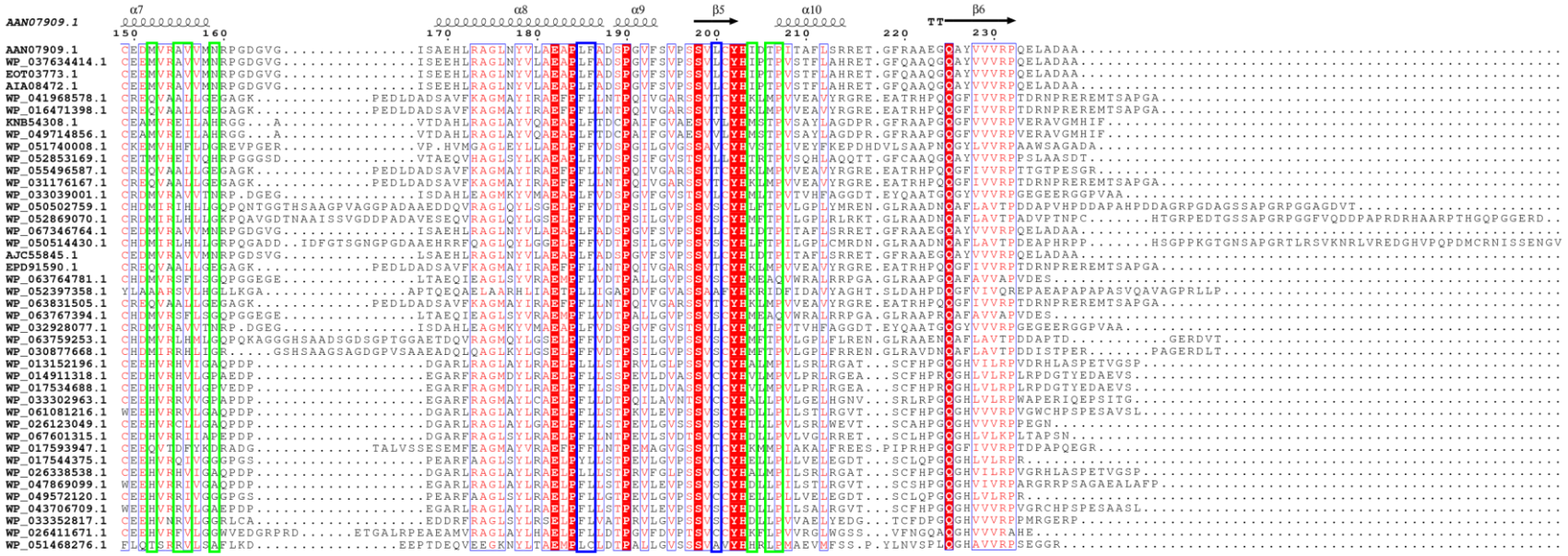


Abbildung 7-1: Multipler Sequenzvergleich von putativen CDPS in Actinobacteria. Die dargestellten CDPSs kommen aus den in Abbildung 4-15 dargestellten Actinomadura, Nocardiopsis und Streptomyces Stämmen.



Fortsetzung von Abbildung 7-1.

Tabelle 7-4: Die Identitäten der putativen CDO_A- bzw. CDO_B-Homologe zu AlbA und Ndas_1146 bzw. zu AlbB und Ndas_1147. CDOs, welche in unmittelbarer Nachbarschaft zusammen mit einer CDPS vorkommen, sind in grün gekennzeichnet. CDOs, welche zusätzlich zur CDPS zusammen mit einer bzw. zwei Methyltransferase vorkommen, sind in orange bzw. rot gekennzeichnet. CDOs, welche zusätzlich zur CDPS zusammen mit einem Cytochrom P450 Enzym bzw. einem Cytochrom P450 Enzym und einer Methyltransferase auftreten, sind in lila bzw. blau gekennzeichnet.

Organismus	**Putative CDO_A** NCBI Accession No.	**Größe [aa]**	**Identität [%] zu AlbA**	**Identität [%] zu Ndas_1146**	**Putative CDO_B** NCBI Accession No.	**Größe [aa]**	**Identität [%] zu AlbB**	**Identität [%] zu Ndas_1147**
***Actinomadura oligospora* ATCC 43269**	WP_026411673.1	191	42.8	53.7	WP_026411672.1	109	44.5	54.1
***Streptomyces ahygroscopicus* subsp. *wuyiensis* CK-15**	WP_038524927.1	196	82.2	50.0	WP_037634412.1	105	93.3	46.0
***Streptomyces albulus* CCRC 11814**	WP_037634410.1	196	82.6	50.5	WP_037634412.1	105	93.3	46.0
***Streptomyces albulus* CCRC 11814**	EOT03771.2	183	77.2	48.1	EOT03772.1	99	86.7	45.0
***Streptomyces albulus* NK660**	AIA08474.1	196	82.2	50.0	AIA08473.1	105	93.3	46.0
***Streptomyces albulus* PD-1**	WP_037634410.1	196	82.6	50.5	WP_037634412.1	105	93.3	46.0
***Streptomyces* AmelKG-E11A**	SCK05932.1	174	42.0	60.2	SCK05923.1	113	41.7	53.1
***Streptomyces caatingaensis* CMAA 1322**	KNB54108.1	192	55.5	48.1	KNB54109.1	108	59.3	45.5
***Streptomyces caatingaensis* CMAA 1322**	WP_049715081.1	162	49.3	46.0	WP_049714855.1	108	59.3	45.5
***Streptomyces celluloflavus* NRRL B-2493**	WP_052853393.1	184	57.3	51.2	WP_052853170.1	112	5.3	14.7
Streptomyces diastatochromogenes	WP_038524927.1	196	82.2	50.0	WP_037634412.1	105	93.3	46.0
***Streptomyces laurentii* ATCC 31255**	BAU83480.1	187	43.2	60.2	BAU83479.1	113	41.9	51.3
***Streptomyces monomycini* NRRL B-24309**	WP_030022688.1	197	59.5	52.2	WP_030022686.1	94	51.4	44.3
***Streptomyces noursei* ATCC 11455**	WP_067346766.1	196	89.5	49.3	WP_039632579.1	105	100.0	45.1
***Streptomyces noursei* ATCC 11455**	AAN07907.1	219	100.0	44.4	AAN07908.1	105	100.0	45.1
***Streptomyces* sp. NRRL F-5123**	WP_052397370.1	189	43.0	61.7	WP_031516032.1	111	39.3	49.5
***Streptomyces* sp. NRRL WC-3773**	WP_031010146.1	197	60.0	52.7	WP_031010144.1	94	51.4	44.3
***Nocardiopsis potens* DSM 45234**	WP_051065445.1	174	38.8	54.	WP_051065442.1	115	37.9	43.5
***Nocardiopsis synnemataformans* DSM 44143**	WP_017566637.1	168	42.0	76.3	WP_017566636.1	105	45.5	92.4
***Streptomyces albus* NBRC 13014**	WP_041968570.1	171	40.2	55.2	WP_016471397.1	111	46.0	53.2
***Streptomyces albus* subsp. *albus* NRRL B-1811**	WP_041968570.1	171	40.2	55.2	WP_016471397.1	111	46.0	53.2
***Streptomyces albus* subsp. *albus* NRRL B-2362**	WP_041968570.1	171	40.2	55.2	WP_016471397.1	111	46.0	53.2
***Streptomyces almquistii* NRRL B-1685**	WP_041968570.1	171	40.2	55.2	WP_016471397.1	111	46.0	53.2
***Streptomyces flocculus* NRRL B-2465**	WP_051705784.1	171	40.2	55.2	WP_055496574.1	111	45.1	53.2
***Streptomyces gibsonii* NRRL B-1335**	WP_041968570.1	171	40.2	55.2	WP_016471397.1	111	46.0	53.2
***Streptomyces graminis* NRRL B-1570**	WP_041968570.1	171	40.2	55.2	WP_016471397.1	111	46.0	53.2
***Streptomyces rangoonensis* NRRL B-12378**	WP_041968570.1	171	40.2	55.2	WP_016471397.1	111	46.0	53.2
***Streptomyces* sp. 769**	AJC55847.1	183	81.3	47.1	AJC55846.1	99	93.3	44.0
***Streptomyces* sp. HPH0547**	WP_041968570.1	171	40.2	55.2	WP_016471397.1	111	46.0	53.2
***Streptomyces* sp. HPH0547**	EPD91588.1	145	34.7	49.8	EPD91589.1	111	46.0	53.2
***Streptomyces* sp. NRRL F-5639**	WP_051705784.1	171	40.2	55.2	WP_016471397.1	111	46.0	53.2

Fortsetzung von Tabelle 7-4.

Organismus	Putative CDO_A NCBI Accession No.	Größe [aa]	Identität [%] zu AlbA	Identität [%] zu Ndas_1146	Putative CDO_B NCBI Accession No.	Größe [aa]	Identität [%] zu AlbB	Identität [%] zu Ndas_1147
***Nocardiopsis alba* ATCC BAA-2165**	WP_042281961.1	168	40.6	67.2	WP_014908976.1	96	42.3	60.4
***Nocardiopsis alba* ATCC BAA-2165**	AFR09804.1	184	42.5	67.7	AFR06509.1	96	42.3	60.4
***Nocardiopsis alba* DSM 43377**	WP_042281961.1	168	40.6	67.2	WP_017534687.1	96	42.3	60.4
***Nocardiopsis alkaliphila* YIM 80379**	WP_017602839.1	184	39.6	67.0	WP_017602838.1	105	45.9	64.5
***Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *albirubida* NBRC 13392**	WP_061081218.1	162	41.1	76.9	WP_061081217.1	105	44.5	91.4
***Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43111**	Ndas_1146	195	39.2	100.0	WP_013152195.1	105	45.1	100.0
***Nocardiopsis halotolerans* DSM 44410**	WP_017573922.1	160	40.2	73.8	WP_017573921.1	105	41.8	81.0
***Nocardiopsis listeri* NBRC 13360**	WP_067601309.1	181	39.1	64.3	WP_067601312.1	105	47.7	58.5
***Nocardiopsis prasina* DSM 43845**	WP_017544373.1	185	40.9	68.2	WP_026129216.1	105	47.7	66.0
***Nocardiopsis* sp. CNS-639**	WP_019610348.1	160	38.8	77.8	WP_019610347.1	105	46.0	97.1
***Nocardiopsis* sp. RV163**	WP_047869097.1	157	38.8	75.4	WP_047869098.1	105	44.7	93.3
***Nocardiopsis* sp. SBT366**	WP_049572039.1	185	40.0	68.2	WP_049572043.1	105	46.8	65.1
***Nocardiopsis* sp. TP-A0876**	WP_042281961.1	168	40.6	67.2	WP_017534687.1	96	42.3	60.4
***Nocardiopsis xinjiangensis* YIM 90004**	WP_017608305.1	183	44.7	48.0	WP_017608304.1	106	44.4	65.4
***Streptomyces catenulae* NRRL B-2342**	WP_030289447.1	180	46.4	52.7	WP_051740007.1	114	41.7	42.1
***Actinomadura oligospora* ATCC 43269**	WP_026414937.1	166	34.7	45.6	WP_051468277.1	114	37.5	33.9
***Streptomyces niger* NRRL B-3857**	WP_052869069.1	198	39.3	52.2	WP_052869068.1	117	11.9	7.1
***Streptomyces monomycini* NRRL B-24309**	WP_033038824.1	158	38.5	51.8	WP_050502761.1	114	41.7	37.5
***Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* NRRL WC-3904**	WP_050514429.1	196	42.6	55.2	WP_030659934.1	111	41.7	37.5
***Streptomyces* sp. NRRL F-5053**	WP_037853137.1	165	37.2	42.4	WP_063764780.1	102	39.5	35.6
***Streptomyces* sp. NRRL S-1868**	WP_051856637.1	145	34.5	39.9	WP_063767395.1	102	39.5	36.2
***Streptomyces* sp. NRRL WC-3773**	WP_050510272.1	178	38.0	49.8	WP_050510263.1	114	40.9	37.5
***Streptomyces varsoviensis* NRRL B-3589**	WP_048832786.1	175	39.7	51.2	WP_030877661.1	112	43.1	40.5
***Streptomyces varsoviensis* NRRL ISP-5346**	WP_048832786.1	175	39.7	51.2	WP_030877661.1	112	43.1	40.5

7.4 Identifizierung der enzymatischen Produkte der Biotransformation von *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) durch CDO_A-Np und CDO_B-Np (pKB81)

Tabelle 7-5: HR-ESI-MS Daten der enzymatischen Umsetzung von cyclo*(L-Tyr-L-Phe) (2) durch CDO_A-Np und CDO_B-Np.*

	RT [min]	**Summenformel $[M+H]^+$**	**m/z $[M+H]^+$ (berechnet)**	**m/z $[M+H]^+$ (gemessen)**	**Abweichung [ppm]**
2	20,3	$C_{18}H_{19}N_2O_3$	311,1390	311,1392	-0,5
2a	20,9	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1225	3,0
2b	22,4	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1227	2,3
2c	27,5	$C_{18}H_{15}N_2O_3$	307,1077	307,1072	1,7

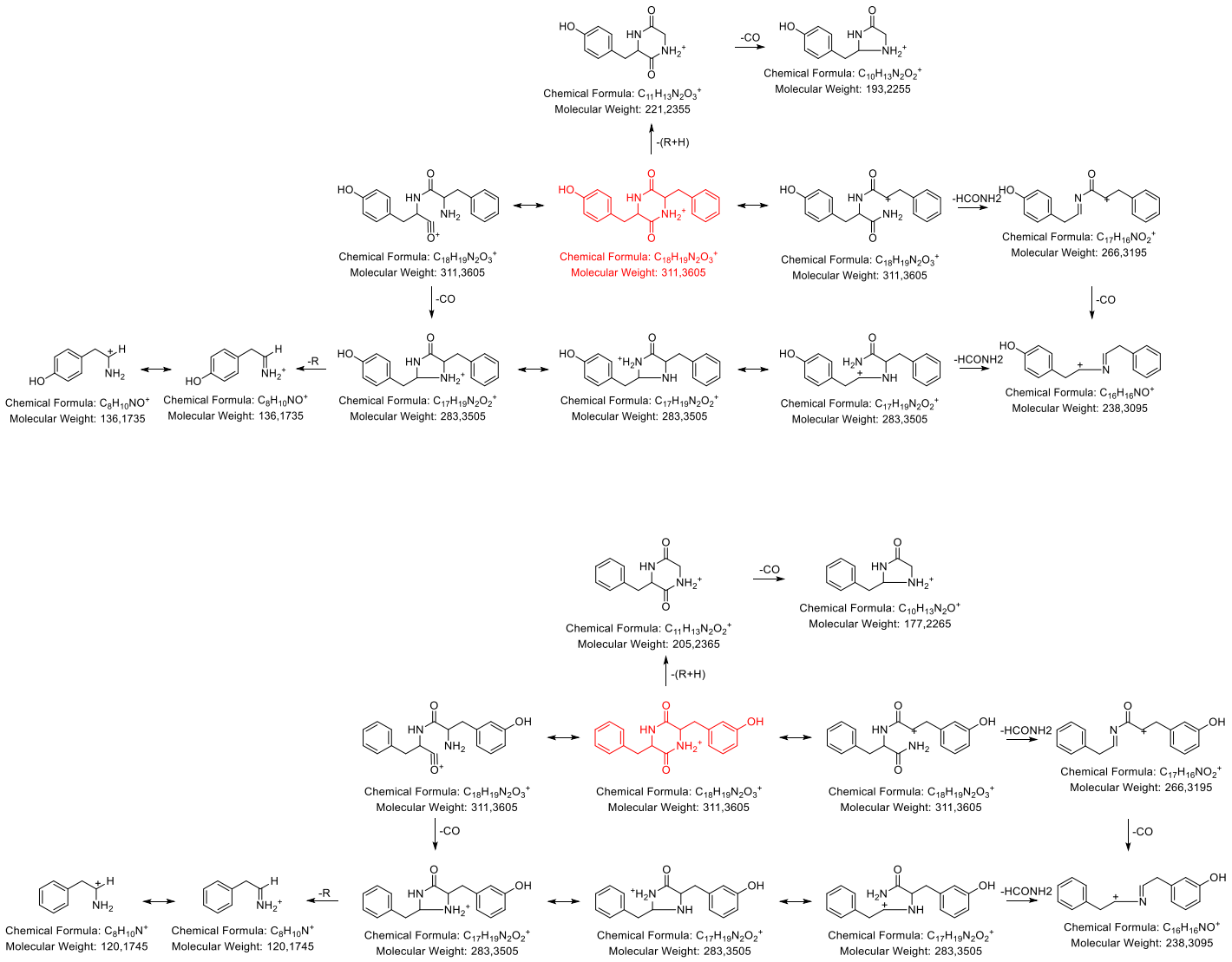


Abbildung 7-2: Putative Fragmentierungsmuster von protoniertem cyclo(*L-Tyr-L-Phe*).

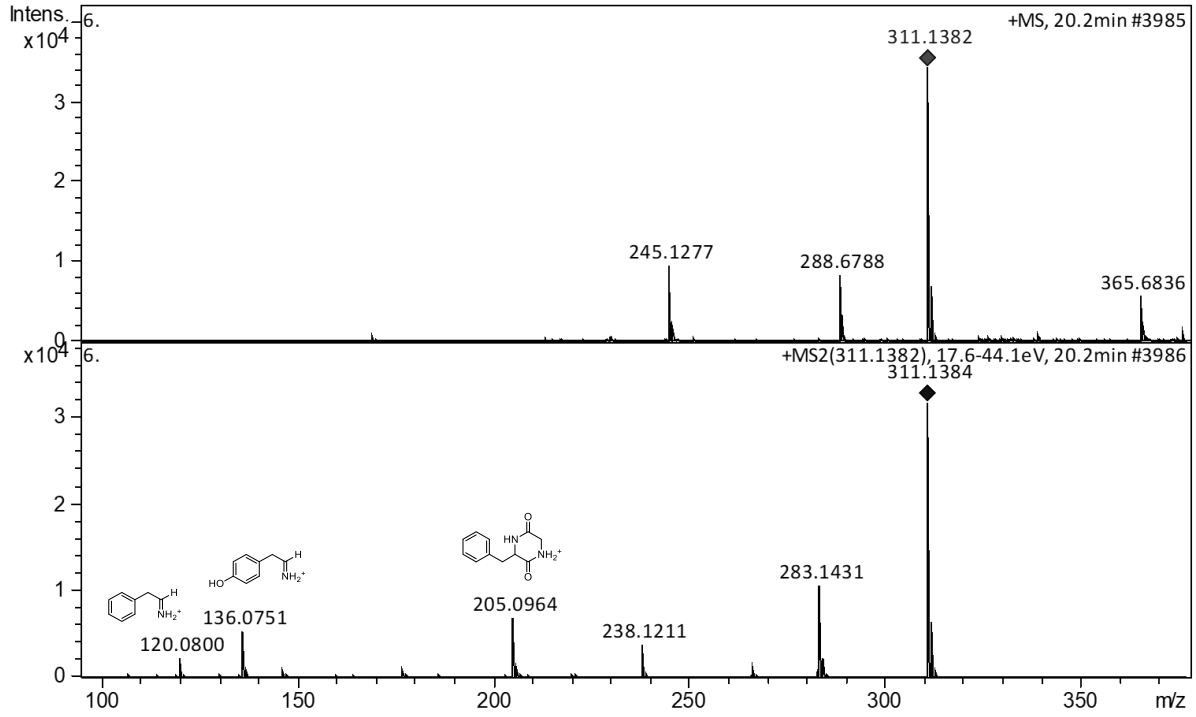


*Abbildung 7-3: MS^2 Analyse von cyclo(L-Tyr-L-Phe) (**2**) aus der Kultur mit CDO_A-Np und CDO_B-Np.*

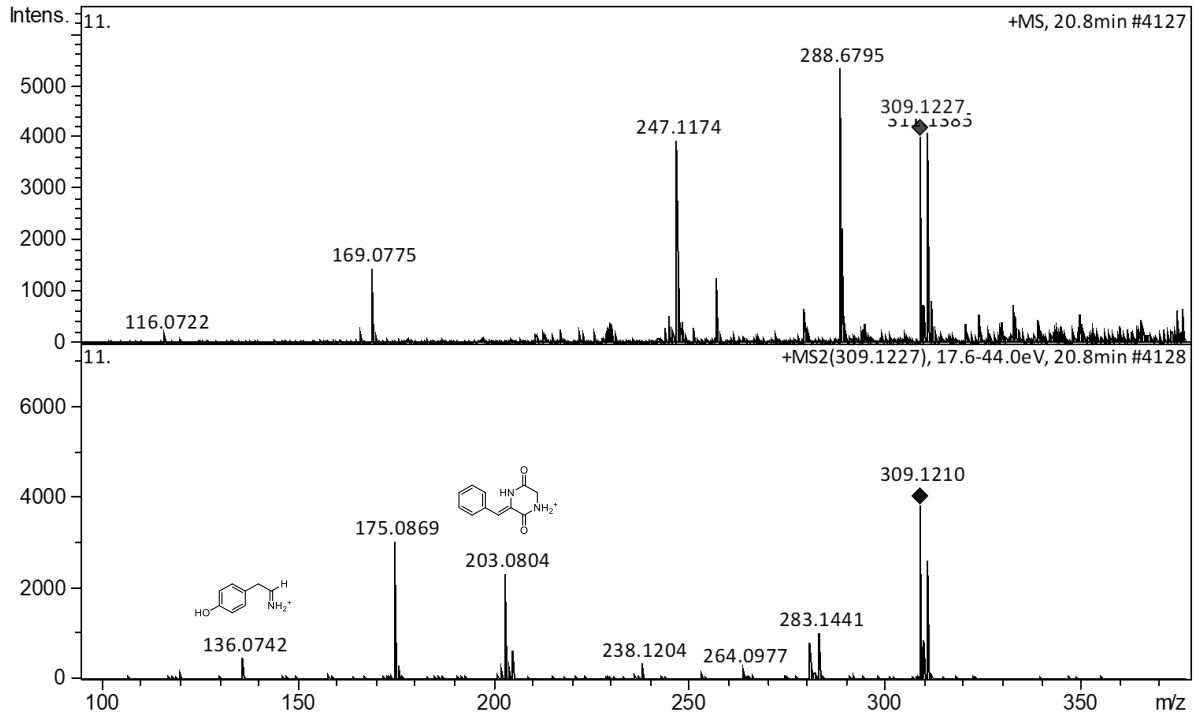


*Abbildung 7-4: MS^2 Analyse von einfach dehydriertem cyclo(L-Tyr-L-Phe) (**2a**) aus der Kultur mit CDO_A-Np und CDO_B-Np.*

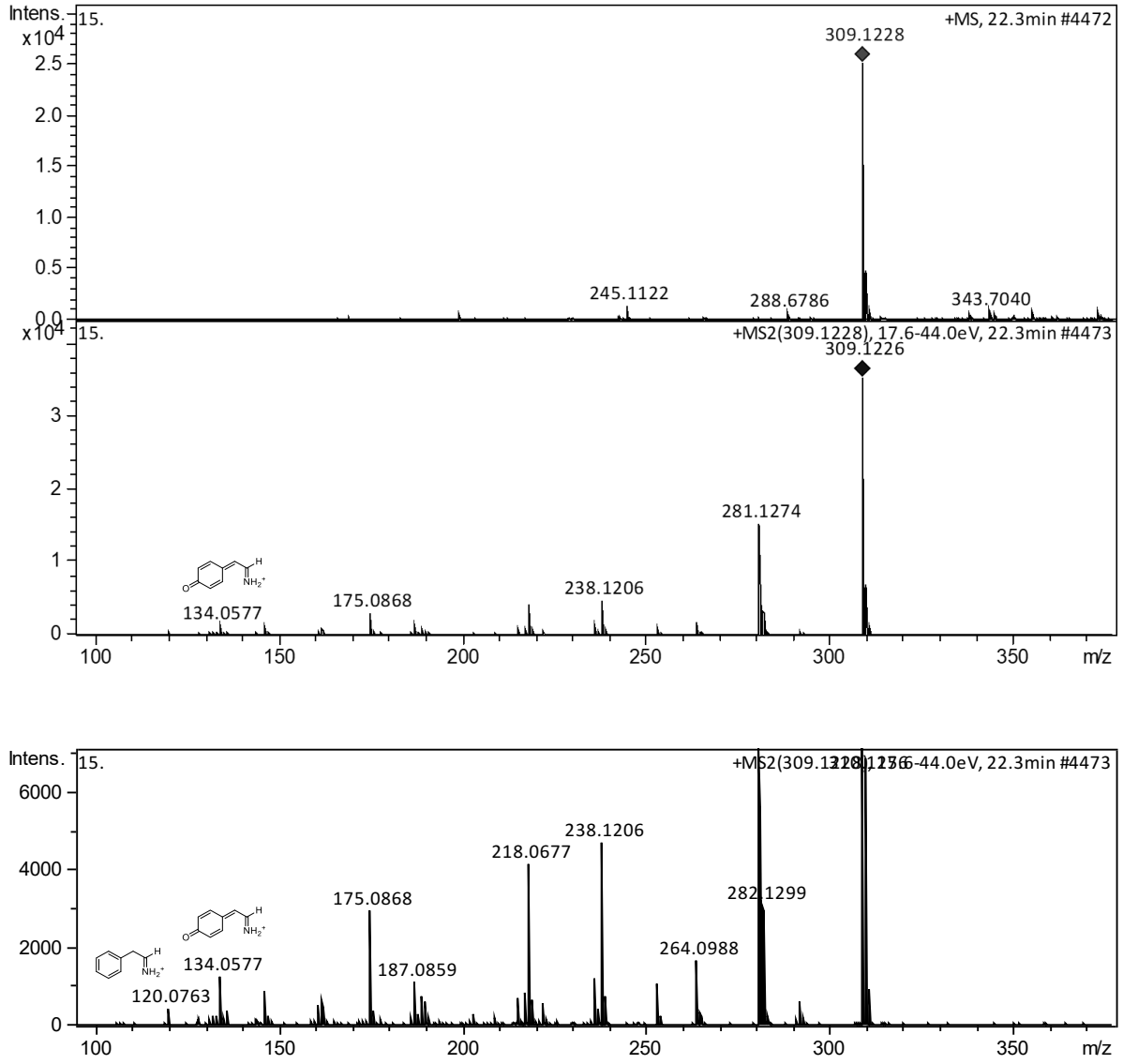


*Abbildung 7-5: MS^2 Analyse von einfach dehydriertem cyclo(L-Tyr-L-Phe) (**2b**) aus der Kultur mit CDO_A-Np und CDO_B-Np.*

7.5 Identifizierung der Bildung von *E*- und *Z*-Isomeren der Produkte der enzymatischen Umsetzung von *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) durch CDO_A-Np und CDO_B-Np (pKB81)

Tabelle 7-6: HR-ESI-MS Daten der enzymatischen Umsetzung von cyclo*(L-Tyr-L-Phe) (2) durch CDO_A-Np und CDO_B-Np.*

	RT [min]	Summenformel $[M+H]^+$	m/z $[M+H]^+$ (berechnet)	m/z $[M+H]^+$ (gemessen)	Abweichung [ppm]
cYF	15,5	$C_{18}H_{19}N_2O_3$	311,1390	311,1406	-5,2
cYF-2H	16,3	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1218	5,2
cYF-2H	17,9	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1216	5,8
cYF-4H	23,3	$C_{18}H_{15}N_2O_3$	307,1077	307,1072	1,7

Tabelle 7-7: HR-ESI-MS Daten der enzymatischen Umsetzung von cyclo*(L-Tyr-L-Phe) (2) durch CDO_A-Np und CDO_B-Np nach der Exposition mit Licht.*

	RT [min]	Summenformel $[M+H]^+$	m/z $[M+H]^+$ (berechnet)	m/z $[M+H]^+$ (gemessen)	Abweichung [ppm]
cYF	15,5	$C_{18}H_{19}N_2O_3$	311,1390	311,1407	-5,4
cYF-2H	16,3	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1204	9,6
cYF-2H	17,0	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1194	12,9
cYF-2H	17,9	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1216	5,7
cYF-4H	22,4	$C_{18}H_{15}N_2O_3$	307,1077	307,1064	4,4
cYF-4H	23,3	$C_{18}H_{15}N_2O_3$	307,1077	307,1072	1,6

7.6 Identifizierung der enzymatischen Produkte der Biotransformation von *cyclo*(L-Phe-L-Leu) durch His_6-CDO_A-Np und CDO_B-Np-His_6 (pKB83)

Tabelle 7-8: HR-ESI-MS Daten der enzymatischen Umsetzung von cyclo*(L-Tyr-L-Phe) (cYF) durch CDO_A-Np und CDO_B-Np (pKB81).*

	RT [min]	Summenformel $[M+H]^+$	m/z $[M+H]^+$ (berechnet)	m/z $[M+H]^+$ (gemessen)	Abweichung [ppm]
cFL	19,2	$C_{15}H_{21}N_2O_2$	261,1589	261,1626	-10,8
cFL-2H	19,6	$C_{15}H_{19}N_2O_2$	259,1441	259,1463	-8,7
cFL-2H	23,0	$C_{15}H_{19}N_2O_2$	259,1441	259,1477	-14,0
cFL-4H	23,5	$C_{15}H_{17}N_2O_2$	257,1285	257,1316	-12,1
cFL-4H	24,6	$C_{15}H_{17}N_2O_2$	257,1285	257,1321	-14,3

Tabelle 7-9: HR-ESI-MS Daten der enzymatischen Umsetzung von cyclo*(L-Tyr-L-Phe) (cYF) durch His_6-CDO_A-Np und CDO_B-Np-His_6 (pKB83).*

	RT [min]	Summenformel $[M+H]^+$	m/z $[M+H]^+$ (berechnet)	m/z $[M+H]^+$ (gemessen)	Abweichung [ppm]
cFL	19,2	$C_{15}H_{21}N_2O_2$	261,1589	261,1630	-12,4
cFL-2H	19,6	$C_{15}H_{19}N_2O_2$	259,1441	259,1469	-10,9
cFL-2H	23,0	$C_{15}H_{19}N_2O_2$	259,1441	259,1470	-11,0
cFL-4H	23,5	$C_{15}H_{17}N_2O_2$	257,1285	257,1306	-8,5
cFL-4H	24,7	$C_{15}H_{17}N_2O_2$	257,1285	257,1314	-11,3

7.7 Identifizierung der enzymatischen Produkte der Biotransformation von *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) und *cyclo*(L-Tyr-L-Tyr) durch CDO_A-Np und CDO_B-Np (pKB158 und pKB81)

Tabelle 7-10: HR-ESI-MS Daten der enzymatischen Umsetzung von cyclo*(L-Tyr-L-Tyr) (1) und cyclo(L-Tyr-L-Phe) (2) durch CDO_A-Np und CDO_B-Np (pKB157).*

	RT [min]	Summenformel $[M+H]^+$	m/z $[M+H]^+$ (berechnet)	m/z $[M+H]^+$ (gemessen)	Abweichung [ppm]
1	9,8	$C_{18}H_{19}N_2O_4$	327,1339	327,1339	0,2
2	15,3	$C_{18}H_{19}N_2O_3$	311,1390	311,1390	-0,1

Tabelle 7-11: HR-ESI-MS Daten der enzymatischen Umsetzung von cyclo*(L-Tyr-L-Tyr) (1) und cyclo(L-Tyr-L-Phe) (2) durch CDO_A-Np und CDO_B-Np (pKB158).*

	RT [min]	Summenformel $[M+H]^+$	m/z $[M+H]^+$ (berechnet)	m/z $[M+H]^+$ (gemessen)	Abweichung [ppm]
1	9,6	$C_{18}H_{19}N_2O_4$	327,1339	327,1333	1,8
1a	12,2	$C_{18}H_{17}N_2O_4$	325,1183	325,1171	3,8
1b	19,5	$C_{18}H_{15}N_2O_4$	323,1026	323,1015	3,6
2	15,4	$C_{18}H_{19}N_2O_3$	311,1390	311,1390	-0,0
2a	15,8	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1228	1,8
2b	17,6	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1232	0,6
2c	22,7	$C_{18}H_{15}N_2O_3$	307,1077	307,1078	-0,4

Tabelle 7-12: HR-ESI-MS Daten der enzymatischen Umsetzung von cyclo*(L-Tyr-L-Tyr) (1) und cyclo(L-Tyr-L-Phe) (2) durch CDO_A-Np und CDO_B-Np (pKB81).*

	RT [min]	Summenformel $[M+H]^+$	m/z $[M+H]^+$ (berechnet)	m/z $[M+H]^+$ (gemessen)	Abweichung [ppm]
1	9,6	$C_{18}H_{19}N_2O_4$	327,1339	327,1335	1,4
1a	12,2	$C_{18}H_{17}N_2O_4$	325,1183	325,1172	3,4
1b	19,5	$C_{18}H_{15}N_2O_4$	323,1026	323,1010	5,2
2	15,3	$C_{18}H_{19}N_2O_3$	311,1390	311,1397	-2,3
2a	15,9	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1236	-0,8
2b	17,6	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1240	-1,9
2c	22,8	$C_{18}H_{15}N_2O_3$	307,1077	307,1081	-1,4

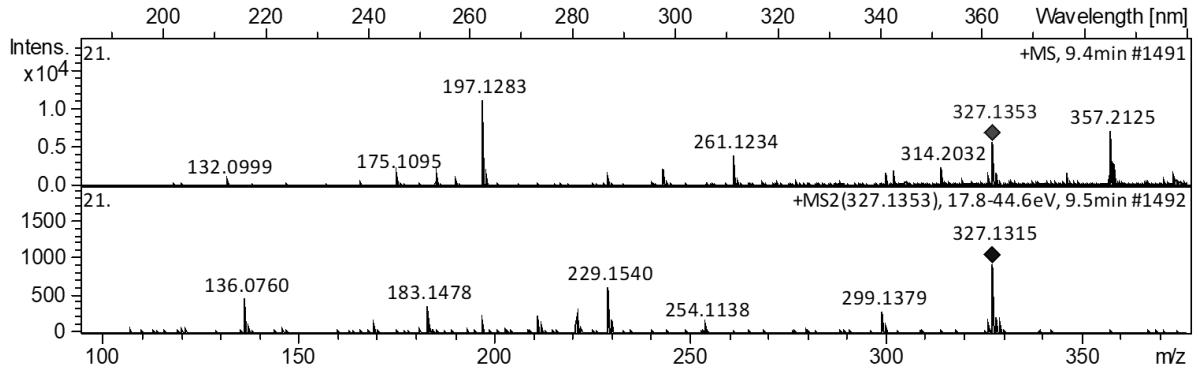


*Abbildung 7-6: MS² Analyse von cyclo(L-Tyr-L-Tyr) (**1**) aus der Kultur mit CDO_A-Np (pKB157).*

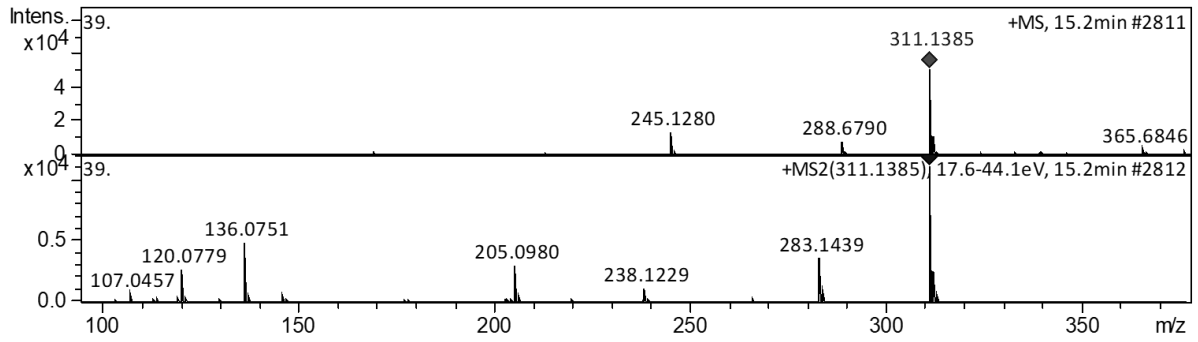


*Abbildung 7-7: MS² Analyse von cyclo(L-Tyr-L-Phe) (**2**) aus der Kultur mit CDO_A-Np (pKB157).*

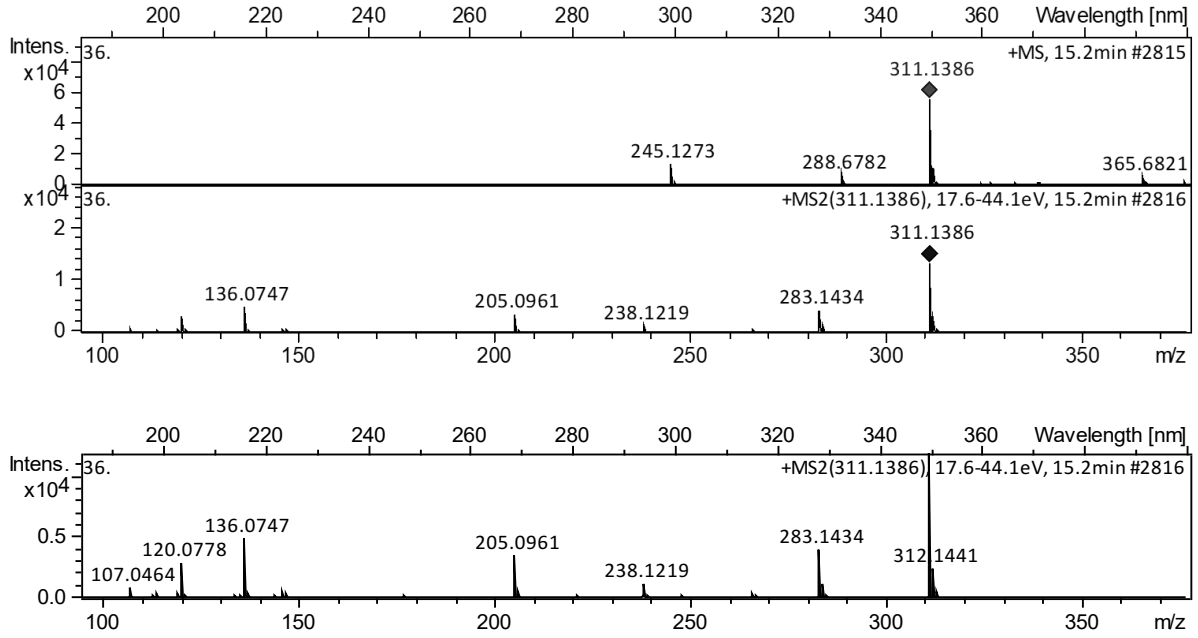


*Abbildung 7-8: MS² Analyse von cyclo(L-Tyr-L-Phe) (**2**) aus der Kultur mit CDO_A-Np und CDO_B-Np (pKB158).*

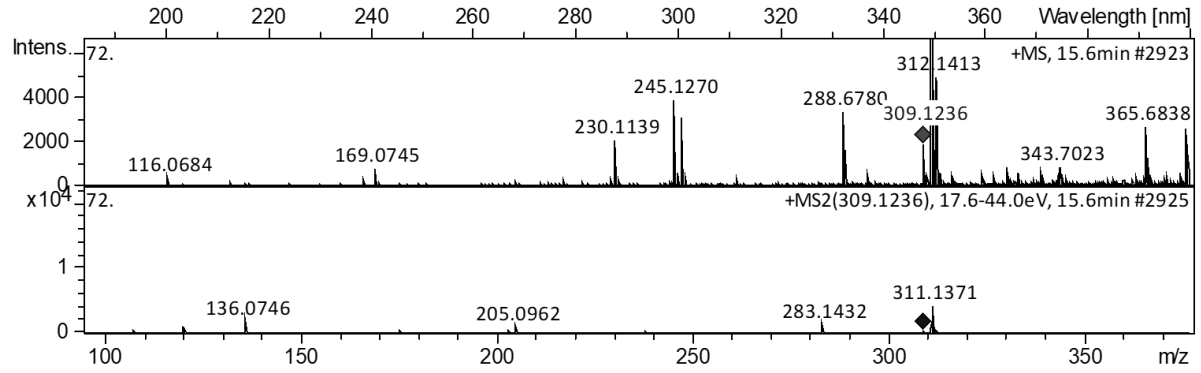


*Abbildung 7-9: MS² Analyse von einfach dehydriertem cyclo(L-Tyr-L-Phe) (**2a**) aus der Kultur mit CDO_A-Np und CDO_B-Np (pKB158).*

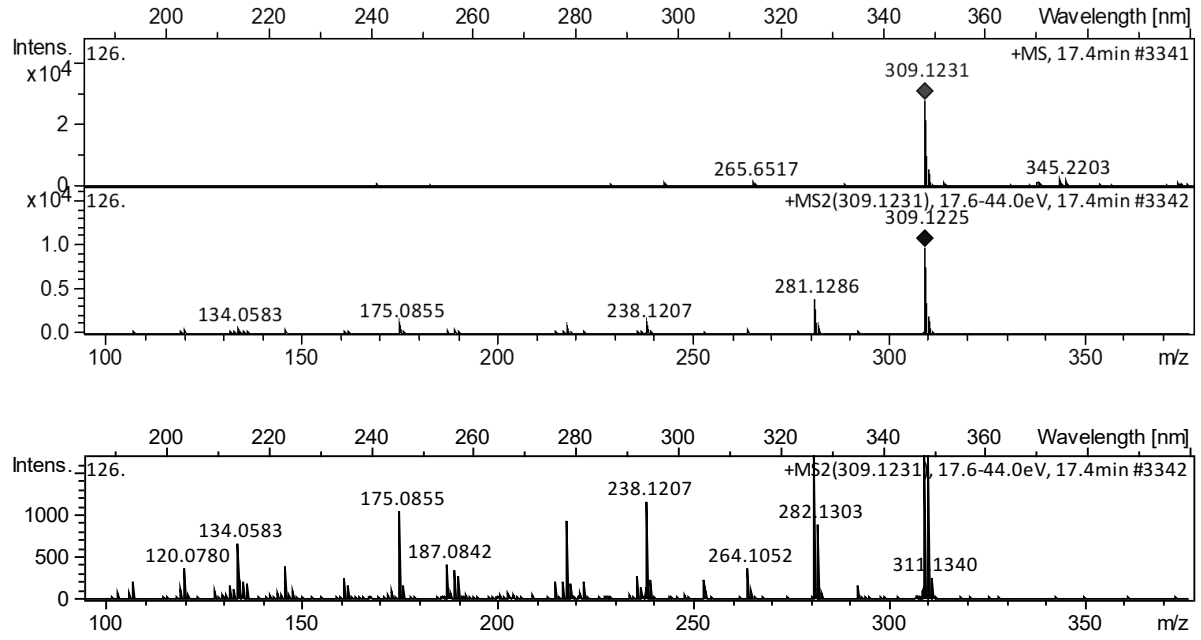


*Abbildung 7-10: MS² Analyse von einfach dehydriertem cyclo(L-Tyr-L-Phe) (**2b**) aus der Kultur mit CDO_A-Np und CDO_B-Np (pKB158).*

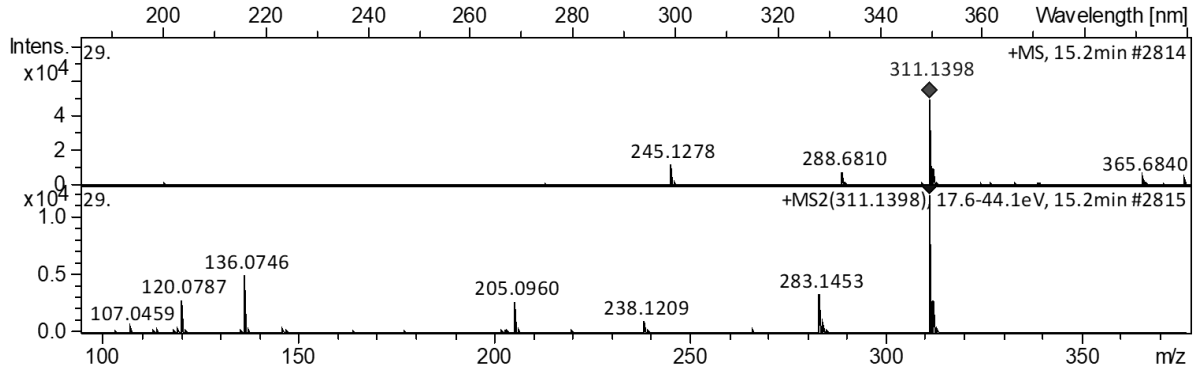


*Abbildung 7-11: MS² Analyse von cyclo(L-Tyr-L-Phe) (**2**) aus der Kultur mit CDO_A-Np und CDO_B-Np (pKB81).*

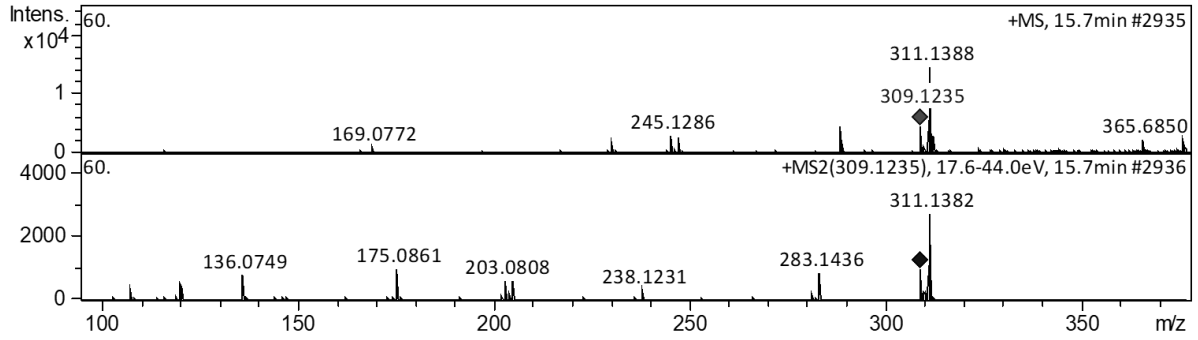


*Abbildung 7-12: MS² Analyse von einfach dehydriertem cyclo(L-Tyr-L-Phe) (**2a**) aus der Kultur mit CDO_A-Np und CDO_B-Np (pKB81).*

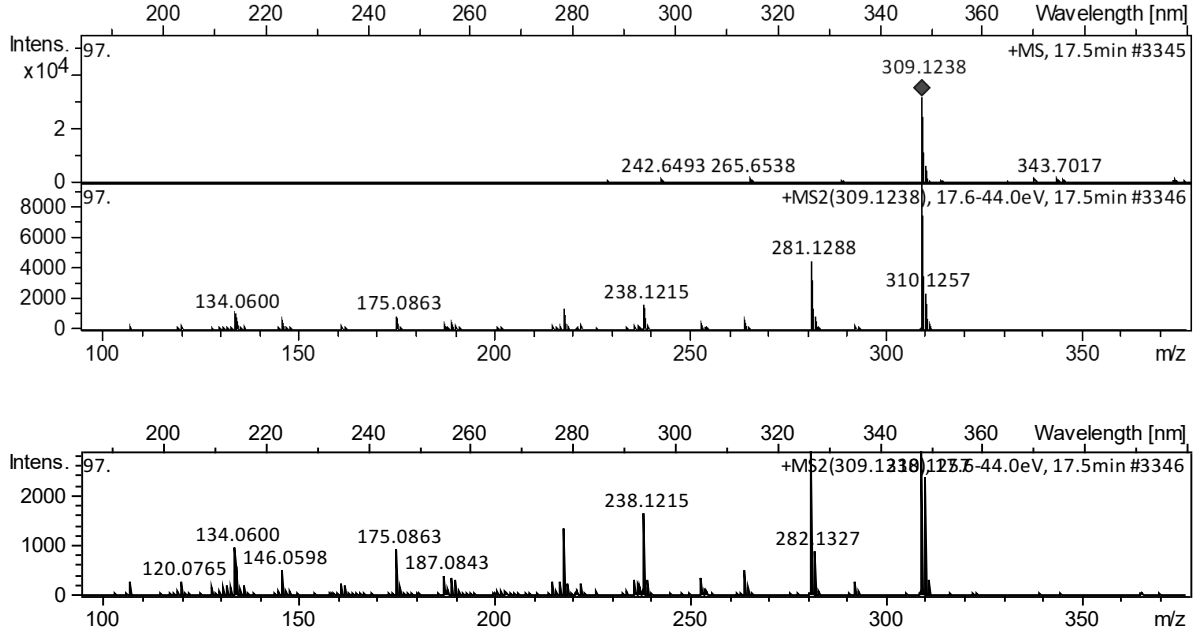


*Abbildung 7-13: MS² Analyse von einfach dehydriertem cyclo(L-Tyr-L-Phe) (**2b**) aus der Kultur mit CDO_A-Np und CDO_B-Np (pKB81).*

7.8 Identifizierung der enzymatischen Produkte der Biotransformation von cyclischen Dipeptiden durch CDO_A-Np und CDO_B-Np (pKB81)

Tabelle 7-13: HR-ESI-MS Daten der enzymatischen Umsetzung von cyclischen Dipeptiden durch CDO_A-Np und CDO_B-Np.

cyclische Peptide	RT [min]	Summenformel $[M+H]^+$	m/z $[M+H]^+$ (berechnet)	m/z $[M+H]^+$ (gemessen)	Abweichung [ppm]
***cyclo*(L-Phe-Gly)**	8,5	$C_{11}H_{13}N_2O_2$	205,0972	205,0971	0,3
cyclo(ΔPhe-Gly)	14,0	$C_{11}H_{11}N_2O_2$	203,0815	203,0815	0,2
***cyclo*(L-Phe-L-Ser)**	7,1	$C_{12}H_{15}N_2O_3$	235,1077	235,1078	-0,3
cyclo(ΔPhe-L-Ser) / *cyclo*(L-Phe-ΔSer)	11,9	$C_{12}H_{13}N_2O_3$	233,0921	233,0911	4,2
cyclo(ΔPhe-ΔSer)	-	$C_{12}H_{11}N_2O_3$	231,0764	-	-
***cyclo*(L-Phe-L-Leu)**	19,4	$C_{15}H_{21}N_2O_2$	261,1598	261,1603	-2,1
cyclo(ΔPhe-L-Leu) /	19,7	$C_{15}H_{19}N_2O_2$	259,1441	259,1436	1,9
cyclo(L-Phe-ΔLeu)	22,6	$C_{15}H_{19}N_2O_2$	259,1441	259,1429	4,5
	23,1	$C_{15}H_{19}N_2O_2$	259,1441	259,1444	-1,3
cyclo(ΔPhe-ΔLeu)	24,6	$C_{15}H_{17}N_2O_2$	257,1285	257,1293	-3,3
	25,4	$C_{15}H_{17}N_2O_2$	257,1285	257,1292	-3,0
***cyclo*(L-Phe-L-Pro)**	13,9	$C_{14}H_{17}N_2O_2$	245,1285	245,1280	1,8
	15,1	$C_{14}H_{17}N_2O_2$	245,1285	245,1296	-4,8
cyclo(ΔPhe-L-Pro)	18,0	$C_{14}H_{15}N_2O_2$	243,1128	243,1137	-3,5
***cyclo*(L-Phe-L-Phe)**	20,8	$C_{18}H_{19}N_2O_2$	295,1441	295,1448	-2,2
cyclo(ΔPhe-L-Phe) / *cyclo*(L-Phe-ΔPhe)	22,3	$C_{18}H_{17}N_2O_2$	293,1285	293,1280	1,6
cyclo(ΔPhe-ΔPhe)	26,2	$C_{18}H_{15}N_2O_2$	291,1128	291,1118	3,3
	27,1	$C_{18}H_{15}N_2O_2$	291,1128	291,1120	2,9
***cyclo*(L-Phe-L-Tyr)**	15,4	$C_{18}H_{19}N_2O_3$	311,1390	311,1370	6,4
cyclo(ΔPhe-L-Tyr) /	16,2	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1208	8,2
cyclo(L-Phe-ΔTyr)	17,8	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1213	6,8
	20,4	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1198	11,5
	20,5	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1202	10,4
cyclo(ΔPhe-ΔTyr)	22,5	$C_{18}H_{15}N_2O_3$	307,1077	307,1051	8,5
	23,4	$C_{18}H_{15}N_2O_3$	307,1077	307,1054	7,4
	23,5	$C_{18}H_{15}N_2O_3$	307,1077	307,1038	12,8
***cyclo*(L-Phe-L-Trp)**	20,5	$C_{20}H_{20}N_3O_2$	334,1550	334,1555	-1,4
cyclo(ΔPhe-L-Trp) / *cyclo*(L-Phe-ΔTrp)	21,8	$C_{20}H_{18}N_3O_2$	332,1394	332,1399	-1,7
cyclo(ΔPhe-ΔTrp)	25,9	$C_{20}H_{16}N_3O_2$	330,1237	330,1222	4,5
	27,1	$C_{20}H_{16}N_3O_2$	330,1237	330,1236	0,3
***cyclo*(L-Phe-L-His)**	5,5	$C_{15}H_{17}N_4O_2$	285,1346	285,1344	0,7
cyclo(ΔPhe-L-His) /	8,8	$C_{15}H_{15}N_4O_2$	283,1190	283,1182	2,6
cyclo(L-Phe-ΔHis)	11,0	$C_{15}H_{15}N_4O_2$	283,1190	283,1185	1,5
cyclo(ΔPhe-ΔHis)	18,9	$C_{15}H_{13}N_4O_2$	281,1033	281,1032	0,2
	20,9	$C_{15}H_{13}N_4O_2$	281,1033	281,1047	-5,1
***cyclo*(L-Tyr-Gly)**	4,6	$C_{11}H_{13}N_2O_3$	221,0921	221,0916	2,0
cyclo(ΔTyr-Gly)	9,9	$C_{11}H_{11}N_2O_3$	219,0764	219,0761	1,6
***cyclo*(L-Tyr-L-Ser)**	4,3	$C_{12}H_{15}N_2O_4$	251,1026	251,1001	10,1
cyclo(ΔTyr-L-Ser) / *cyclo*(L-Tyr-ΔSer)	7,3	$C_{12}H_{13}N_2O_4$	249,0870	249,0854	6,2
cyclo(ΔTyr-ΔSer)	-	$C_{12}H_{11}N_2O_4$	247,0713	-	-
***cyclo*(L-Tyr-L-Pro)**	8,8	$C_{14}H_{17}N_2O_3$	261,1234	261,1233	0,3
cyclo(ΔTyr-L-Pro)	12,9	$C_{14}H_{15}N_2O_3$	259,1077	259,1063	5,4
	14,5	$C_{14}H_{15}N_2O_3$	259,1077	259,1075	0,7

cyclische Peptide	RT [min]	Summenformel $[M+H]^+$	m/z $[M+H]^+$ (berechnet)	m/z $[M+H]^+$ (gemessen)	Abweichung [ppm]
***cyclo*(L-Tyr-L-Tyr)**	9,7	$C_{18}H_{19}N_2O_4$	327,1339	327,1340	-0,2
cyclo(ΔTyr-L-Tyr)	12,6	$C_{18}H_{17}N_2O_4$	325,1183	325,1190	-2,1
cyclo(ΔTyr-ΔTyr)	19,3	$C_{18}H_{15}N_2O_4$	323,1026	323,1028	-0,6
	20,1	$C_{18}H_{15}N_2O_4$	323,1026	323,1031	-1,4
***cyclo*(L-Tyr-L-Trp)**	16,0	$C_{20}H_{20}N_3O_3$	350,1499	350,1512	-3,7
cyclo(ΔTyr-L-Trp) / *cyclo*(L-Tyr-ΔTrp)	17,2	$C_{20}H_{18}N_3O_3$	348,1343	348,1355	-3,6
cyclo(ΔTyr-ΔTrp)	23,0	$C_{20}H_{16}N_3O_3$	346,1186	346,1181	1,6
	23,8	$C_{20}H_{16}N_3O_3$	346,1186	346,1188	-0,6
	24,0	$C_{20}H_{16}N_3O_3$	346,1186	346,1184	0,5
***cyclo*(L-Tyr-D-Trp)**	15,9	$C_{20}H_{20}N_3O_3$	350,1499	350,1525	-7,5
cyclo(ΔTyr-D-Trp) / *cyclo*(L-Tyr-ΔTrp)	17,1	$C_{20}H_{18}N_3O_3$	348,1343	348,1359	-4,7
cyclo(ΔTyr-ΔTrp)	-	$C_{20}H_{16}N_3O_3$	346,1186	-	-
***cyclo*(L-Trp-Gly)**	10,6	$C_{13}H_{14}N_3O_2$	244,1081	244,1082	-0,7
cyclo(ΔTrp-Gly)	16,8	$C_{13}H_{12}N_3O_2$	242,0924	242,0925	-0,5
***cyclo*(L-Trp-L-Ala)**	11,9	$C_{14}H_{16}N_3O_2$	258,1237	258,1234	1,3
cyclo(ΔTrp-L-Ala) / *cyclo*(L-Trp-ΔAla)	13,0	$C_{14}H_{14}N_3O_2$	256,1081	256,1074	2,4
cyclo(ΔTrp-ΔAla)	-	$C_{14}H_{12}N_3O_2$	254,0924	-	-
***cyclo*(L-Trp-D-Ala)**	11,6	$C_{14}H_{16}N_3O_2$	258,1237	258,1242	-1,9
cyclo(ΔTrp-D-Ala) / *cyclo*(L-Trp-ΔAla)	12,9	$C_{14}H_{14}N_3O_2$	256,1081	256,1073	2,9
cyclo(ΔTrp-ΔAla)	-	$C_{14}H_{12}N_3O_2$	254,0924	-	-
***cyclo*(D-Trp-L-Ala)**	11,5	$C_{14}H_{16}N_3O_2$	258,1237	258,1258	-8,2
cyclo(ΔTrp-L-Ala) / *cyclo*(D-Trp-ΔAla)	12,8	$C_{14}H_{14}N_3O_2$	256,1081	256,1086	-2,2
cyclo(ΔTrp-ΔAla)	-	$C_{14}H_{12}N_3O_2$	254,0924	-	-
***cyclo*(D-Trp-D-Ala)**	11,7	$C_{14}H_{16}N_3O_2$	258,1237	258,1253	-6,2
cyclo(ΔTrp-D-Ala) / *cyclo*(D-Trp-ΔAla)	12,8	$C_{14}H_{14}N_3O_2$	256,1081	256,1080	0,0
cyclo(ΔTrp-ΔAla)	-	$C_{14}H_{12}N_3O_2$	254,0924	-	-
***cyclo*(L-Trp-L-Leu)**	18,3	$C_{17}H_{22}N_3O_2$	300,1707	300,1716	-3,1
cyclo(ΔTrp-L-Leu) /	19,1	$C_{17}H_{20}N_3O_2$	298,1550	298,1556	-2,0
cyclo(L-Trp-ΔLeu)	22,9	$C_{17}H_{20}N_3O_2$	298,1550	298,1541	3,1
cyclo(ΔTrp-ΔLeu)	24,7	$C_{17}H_{18}N_3O_2$	296,1394	296,1399	-1,8
***cyclo*(L-Trp-L-Pro)**	15,0	$C_{16}H_{18}N_3O_2$	284,1394	284,1396	-0,9
	16,3	$C_{16}H_{18}N_3O_2$	284,1394	284,1420	-9,3
cyclo(ΔTrp-L-Pro) / *cyclo*(L-Trp-ΔPro)	15,4	$C_{16}H_{16}N_3O_2$	282,1237	282,1238	-0,3
***cyclo*(L-Trp-D-Pro)**	15,0	$C_{16}H_{18}N_3O_2$	284,1394	284,1448	-19,1
	16,3	$C_{16}H_{18}N_3O_2$	284,1394	284,1412	-6,4
cyclo(ΔTrp-D-Pro) / *cyclo*(L-Trp-ΔPro)	15,4	$C_{16}H_{16}N_3O_2$	282,1237	282,1247	-3,7
***cyclo*(D-Trp-L-Pro)**	15,0	$C_{16}H_{18}N_3O_2$	284,1394	284,1428	-12,1
	16,2	$C_{16}H_{18}N_3O_2$	284,1394	284,1406	-4,4
cyclo(ΔTrp-L-Pro) / *cyclo*(D-Trp-ΔPro)	15,4	$C_{16}H_{16}N_3O_2$	282,1237	282,1252	-5,5
***cyclo*(D-Trp-D-Pro)**	15,0	$C_{16}H_{18}N_3O_2$	284,1394	284,1389	1,7
	16,4	$C_{16}H_{18}N_3O_2$	284,1394	284,1408	-5,1
cyclo(ΔTrp-D-Pro) / *cyclo*(D-Trp-ΔPro)	17,9	$C_{16}H_{16}N_3O_2$	282,1237	282,1236	0,2
***cyclo*(L-Trp-L-Trp)**	20,4	$C_{22}H_{21}N_4O_2$	373,1659	373,1668	-2,5
cyclo(ΔTrp-L-Trp) /	21,4	$C_{22}H_{19}N_4O_2$	371,1503	371,1500	0,6
cyclo(L-Trp-ΔTrp)	22,1	$C_{22}H_{19}N_4O_2$	371,1503	371,1479	6,2

cyclische Peptide	RT [min]	Summenformel $[M+H]^+$	m/z $[M+H]^+$ (berechnet)	m/z $[M+H]^+$ (gemessen)	Abweichung [ppm]
cyclo(ΔTrp-ΔTrp)	26,8	$C_{22}H_{17}N_4O_2$	369,1346	369,1301	12,3
***cyclo*(L-Trp-L-His)**	8,2	$C_{17}H_{18}N_5O_2$	324,1455	324,1454	0,2
cyclo(ΔTrp-L-His) / *cyclo*(L-Trp-ΔHis)	8,8	$C_{17}H_{16}N_5O_2$	322,1299	322,1295	1,1
cyclo(ΔTrp-ΔHis)	20,7	$C_{17}H_{14}N_5O_2$	320,1142	320,1133	3,0
	21,4	$C_{17}H_{14}N_5O_2$	320,1142	320,1136	2,0
***cyclo*(L-His-Gly)**	2,6	$C_8H_{11}N_4O_2$	195,0877	195,0869	3,7
cyclo(ΔHis-Gly)	-	$C_8H_9N_4O_2$	193,0720	-	-
***cyclo*(L-His-L-Ala)**	2,8	$C_9H_{13}N_4O_2$	209,1033	209,1022	5,5
cyclo(ΔHis-L-Ala) / *cyclo*(L-His-ΔAla)	4,2	$C_9H_{11}N_4O_2$	207,0877	207,0857	9,4
cyclo(ΔHis-ΔAla)	5,5	$C_9H_9N_4O_2$	205,0720	205,0698	10,7
	6,4	$C_9H_9N_4O_2$	205,0720	205,0708	5,7
	7,8	$C_9H_9N_4O_2$	205,0720	205,0706	7,0
	10,6	$C_9H_9N_4O_2$	205,0720	205,0700	9,9
	11,9	$C_9H_9N_4O_2$	205,0720	205,0695	12,0
***cyclo*(L-His-L-Pro)**	3,6	$C_{11}H_{15}N_4O_2$	235,1190	235,1186	1,4
cyclo(ΔHis-L-Pro)	5,4	$C_{11}H_{13}N_4O_2$	233,1033	233,0997	15,3
***cyclo*(L-Ala-L-Ser)**	-	$C_6H_{11}N_2O_3$	159,0764	-	-
cyclo(ΔAla-L-Ser) / *cyclo*(L-Ala-ΔSer)	-	$C_6H_9N_2O_3$	157,0608	-	-
cyclo(ΔAla-ΔSer)	-	$C_6H_7N_2O_3$	155,0451	-	-
***cyclo*(L-Pro-L-Thr)**	3,7	$C_9H_{15}N_2O_2$	199,1077	199,1067	5,0
cyclo(L-Pro-ΔThr)	-	$C_9H_{13}N_2O_2$	197,0921	-	-
***cyclo*(L-Pro-L-Val)**	8,5	$C_{10}H_{17}N_2O_2$	197,1285	197,1300	-1,5
cyclo(L-Pro-ΔVal)	-	$C_{10}H_{15}N_2O_2$	195,1128	-	-
***cyclo*(L-Pro-L-Leu)**	11,5	$C_{11}H_{19}N_2O_2$	211,1441	211,1442	-0,3
	13,0	$C_{11}H_{19}N_2O_2$	211,1441	211,1461	-9,3
cyclo(L-Pro-ΔLeu)	13,4	$C_{11}H_{17}N_2O_2$	209,1285	209,1286	-0,8
***cyclo*(L-Glu-L-Glu)**	14,3	$C_{10}H_{15}N_2O_6$	259,0925	259,1090	-63,7
cyclo(ΔGlu-L-Glu)	14,6	$C_{10}H_{13}N_2O_6$	257,0768	257,0891	-47,7
	15,9	$C_{10}H_{13}N_2O_6$	257,0768	257,0922	-59,9
cyclo(ΔGlu-ΔGlu)	16,1	$C_{10}H_{11}N_2O_6$	255,0612	255,0739	-49,9
(R)-Benzodiazepindion	21,5	$C_{18}H_{16}N_3O_2$	306,1237	306,1270	-10,8
	-	$C_{18}H_{14}N_3O_2$	304,1081	-	-
(S)-Benzodiazepindion	21,4	$C_{18}H_{16}N_3O_2$	306,1237	306,1185	17,1
	-	$C_{18}H_{14}N_3O_2$	304,1081	-	-

7.9 Identifizierung der enzymatischen Produkte der Biotransformation von cyclischen Dipeptiden durch Ndas_1146 und Ndas_1147

Tabelle 7-14: HR-ESI-MS Daten der enzymatischen Umsetzung von cyclischen Dipeptiden durch Ndas_1146 und Ndas_1147.

cyclische Peptide	RT [min]	Summenformel $[M+H]^+$	m/z $[M+H]^+$ (berechnet)	m/z $[M+H]^+$ (gemessen)	Abweichung [ppm]
***cyclo*(L-Phe-Gly)**	8,4	$C_{11}H_{13}N_2O_2$	205,0972	205,0981	-4,8
cyclo(ΔPhe-Gly)	14,0	$C_{11}H_{11}N_2O_2$	203,0815	203,0813	1,1
***cyclo*(L-Phe-L-Ser)**	6,9	$C_{12}H_{15}N_2O_3$	235,1077	235,1081	-1,7
cyclo(ΔPhe-L-Ser) / *cyclo*(L-Phe-ΔSer)	11,6	$C_{12}H_{13}N_2O_3$	233,0921	233,0896	10,6
cyclo(ΔPhe-ΔSer)	-	$C_{12}H_{11}N_2O_3$	231,0764	-	-
***cyclo*(L-Phe-L-Leu)**	19,4	$C_{15}H_{21}N_2O_2$	261,1598	261,1604	-2,4
cyclo(ΔPhe-L-Leu) /	22,4	$C_{15}H_{19}N_2O_2$	259,1441	259,1448	-2,7
cyclo(L-Phe-ΔLeu)	22,9	$C_{15}H_{19}N_2O_2$	259,1441	259,1451	-4,0
cyclo(ΔPhe-ΔLeu)	23,4	$C_{15}H_{17}N_2O_2$	257,1285	257,1294	-3,7
	24,5	$C_{15}H_{17}N_2O_2$	257,1285	257,1309	-9,6
	24,7	$C_{15}H_{17}N_2O_2$	257,1285	257,1309	-9,4
	25,5	$C_{15}H_{17}N_2O_2$	257,1285	257,1283	0,5
***cyclo*(L-Phe-L-Pro)**	13,9	$C_{14}H_{17}N_2O_2$	245,1285	245,1290	-2,3
	15,1	$C_{14}H_{17}N_2O_2$	245,1285	245,1302	-7,0
cyclo(ΔPhe-L-Pro)	14,3	$C_{14}H_{15}N_2O_2$	243,1128	243,1134	-2,3
	18,0	$C_{14}H_{15}N_2O_2$	243,1128	243,1136	-3,3
***cyclo*(L-Phe-L-Phe)**	20,5	$C_{18}H_{19}N_2O_2$	295,1441	295,1457	-5,3
cyclo(ΔPhe-L-Phe) / *cyclo*(L-Phe-ΔPhe)	22,1	$C_{18}H_{17}N_2O_2$	293,1285	293,1283	0,5
cyclo(ΔPhe-ΔPhe)	26,1	$C_{18}H_{15}N_2O_2$	291,1128	291,1126	0,7
	27,0	$C_{18}H_{15}N_2O_2$	291,1128	291,1131	-0,9
***cyclo*(L-Phe-L-Tyr)**	15,6	$C_{18}H_{19}N_2O_3$	311,1390	311,1381	3,0
cyclo(ΔPhe-L-Tyr) /	16,4	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1228	1,9
cyclo(L-Phe-ΔTyr)	17,9	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1240	-2,2
	20,5	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1222	3,7
	21,4	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1231	1,0
cyclo(ΔPhe-ΔTyr)	22,6	$C_{18}H_{15}N_2O_3$	307,1077	307,1072	-7,0
	23,4	$C_{18}H_{15}N_2O_3$	307,1077	307,1073	1,2
	23,5	$C_{18}H_{15}N_2O_3$	307,1077	307,1076	0,4
***cyclo*(L-Phe-L-Trp)**	20,3	$C_{20}H_{20}N_3O_2$	334,1550	344,1552	-0,5
cyclo(ΔPhe-L-Trp) /	21,6	$C_{20}H_{18}N_3O_2$	332,1394	332,1408	-4,2
cyclo(L-Phe-ΔTrp)	21,8	$C_{20}H_{18}N_3O_2$	332,1394	332,1402	-2,5
cyclo(ΔPhe-ΔTrp)	26,0	$C_{20}H_{16}N_3O_2$	330,1237	330,1241	-1,2
	27,1	$C_{20}H_{16}N_3O_2$	330,1237	330,1239	-0,6
***cyclo*(L-Phe-L-His)**	6,0	$C_{15}H_{17}N_4O_2$	285,1346	285,1351	-1,8
cyclo(ΔPhe-L-His) /	8,1	$C_{15}H_{15}N_4O_2$	283,1190	283,1201	-4,2
cyclo(L-Phe-ΔHis)	10,7	$C_{15}H_{15}N_4O_2$	283,1190	283,1179	3,6
cyclo(ΔPhe-ΔHis)	18,8	$C_{15}H_{13}N_4O_2$	281,1033	281,1048	-5,3
	20,8	$C_{15}H_{13}N_4O_2$	281,1033	281,1064	-11,2
***cyclo*(L-Tyr-Gly)**	4,4	$C_{11}H_{13}N_2O_3$	221,0921	221,0917	1,8
cyclo(ΔTyr-Gly)	9,6	$C_{11}H_{11}N_2O_3$	219,0764	219,0759	2,4
***cyclo*(L-Tyr-L-Ser)**	4,0	$C_{12}H_{15}N_2O_4$	251,1026	251,1031	-1,7
cyclo(ΔTyr-L-Ser) / *cyclo*(L-Tyr-ΔSer)	7,2	$C_{12}H_{13}N_2O_4$	249,0870	249,0895	-9,9
cyclo(ΔTyr-ΔSer)	-	$C_{12}H_{11}N_2O_4$	247,0713	-	-
***cyclo*(L-Tyr-L-Pro)**	8,5	$C_{14}H_{17}N_2O_3$	261,1234	261,1270	-13,8

cyclische Peptide	RT [min]	Summenformel $[M+H]^+$	m/z $[M+H]^+$ (berechnet)	m/z $[M+H]^+$ (gemessen)	Abweichung [ppm]
cyclo(ΔTyr-L-Pro)	8,1	$C_{14}H_{15}N_2O_3$	259,1077	259,1092	-5,7
	14,1	$C_{14}H_{15}N_2O_3$	259,1077	259,1100	-8,8
***cyclo*(L-Tyr-L-Tyr)**	9,6	$C_{18}H_{19}N_2O_4$	327,1339	327,1344	-1,4
cyclo(ΔTyr-L-Tyr)	12,4	$C_{18}H_{17}N_2O_4$	325,1183	325,1183	-0,0
cyclo(ΔTyr-ΔTyr)	19,0	$C_{18}H_{15}N_2O_4$	323,1026	323,1041	-4,6
	19,8	$C_{18}H_{15}N_2O_4$	323,1026	323,1029	-0,9
***cyclo*(L-Tyr-L-Trp)**	15,8	$C_{20}H_{20}N_3O_3$	350,1499	350,1543	-12,4
cyclo(ΔTyr-L-Trp) / *cyclo*(L-Tyr-ΔTrp)	17,1	$C_{20}H_{18}N_3O_3$	348,1343	348,1392	-14,2
cyclo(ΔTyr-ΔTrp)	22,8	$C_{20}H_{16}N_3O_3$	346,1186	346,1212	-7,4
	23,6	$C_{20}H_{16}N_3O_3$	346,1186	346,1215	-8,4
	23,9	$C_{20}H_{16}N_3O_3$	346,1186	346,1211	-7,3
***cyclo*(L-Tyr-D-Trp)**	15,9	$C_{20}H_{20}N_3O_3$	350,1499	350,1549	-14,3
cyclo(ΔTyr-D-Trp) / *cyclo*(L-Tyr-ΔTrp)	17,2	$C_{20}H_{18}N_3O_3$	348,1343	348,1402	-17,1
cyclo(ΔTyr-ΔTrp)	-	$C_{20}H_{16}N_3O_3$	346,1186	-	-
***cyclo*(L-Trp-Gly)**	10,2	$C_{13}H_{14}N_3O_2$	244,1081	244,1117	-14,9
cyclo(ΔTrp-Gly)	-	$C_{13}H_{12}N_3O_2$	242,0924	-	-
***cyclo*(L-Trp-L-Ala)**	11,7	$C_{14}H_{16}N_3O_2$	258,1237	258,1278	-15,7
cyclo(ΔTrp-L-Ala) / *cyclo*(L-Trp-ΔAla)	12,8	$C_{14}H_{14}N_3O_2$	256,1081	256,1124	-16,9
cyclo(ΔTrp-ΔAla)	-	$C_{14}H_{12}N_3O_2$	254,0924	-	-
***cyclo*(L-Trp-D-Ala)**	11,7	$C_{14}H_{16}N_3O_2$	258,1237	258,1247	-3,8
cyclo(ΔTrp-D-Ala) / *cyclo*(L-Trp-ΔAla)	12,9	$C_{14}H_{14}N_3O_2$	256,1081	256,1073	3,1
cyclo(ΔTrp-ΔAla)	-	$C_{14}H_{12}N_3O_2$	254,0924	-	-
***cyclo*(D-Trp-L-Ala)**	11,5	$C_{14}H_{16}N_3O_2$	258,1237	258,1276	-15,1
cyclo(ΔTrp-L-Ala) / *cyclo*(D-Trp-ΔAla)	12,8	$C_{14}H_{14}N_3O_2$	256,1081	256,1115	-13,6
cyclo(ΔTrp-ΔAla)	-	$C_{14}H_{12}N_3O_2$	254,0924	-	-
***cyclo*(D-Trp-D-Ala)**	11,7	$C_{14}H_{16}N_3O_2$	258,1237	258,1280	-16,8
cyclo(ΔTrp-D-Ala) / *cyclo*(D-Trp-ΔAla)	12,8	$C_{14}H_{14}N_3O_2$	256,1081	256,1117	-14,3
cyclo(ΔTrp-ΔAla)	-	$C_{14}H_{12}N_3O_2$	254,0924	-	-
***cyclo*(L-Trp-L-Leu)**	18,3	$C_{17}H_{22}N_3O_2$	300,1707	300,1767	-20,3
cyclo(ΔTrp-L-Leu) /	19,2	$C_{17}H_{20}N_3O_2$	298,1550	298,1607	-19,2
cyclo(L-Trp-ΔLeu)	23,0	$C_{17}H_{20}N_3O_2$	298,1550	298,1596	-15,6
cyclo(ΔTrp-ΔLeu)	24,8	$C_{17}H_{18}N_3O_2$	296,1394	296,1440	-15,6
***cyclo*(L-Trp-L-Pro)**	16,2	$C_{16}H_{18}N_3O_2$	284,1394	284,1461	-23,8
cyclo(ΔTrp-L-Pro) / *cyclo*(L-Trp-ΔPro)	15,4	$C_{16}H_{16}N_3O_2$	282,1237	282,1291	-19,0
***cyclo*(L-Trp-D-Pro)**	14,9	$C_{16}H_{18}N_3O_2$	284,1394	284,1450	-20,0
cyclo(ΔTrp-D-Pro) / *cyclo*(L-Trp-ΔPro)	15,4	$C_{16}H_{16}N_3O_2$	282,1237	282,1276	-13,8
***cyclo*(D-Trp-L-Pro)**	15,0	$C_{16}H_{18}N_3O_2$	284,1394	284,1443	-17,3
cyclo(ΔTrp-L-Pro) / *cyclo*(D-Trp-ΔPro)	15,3	$C_{16}H_{16}N_3O_2$	282,1237	282,1264	-9,4
***cyclo*(D-Trp-D-Pro)**	16,4	$C_{16}H_{18}N_3O_2$	284,1394	284,1412	-6,6
cyclo(ΔTrp-D-Pro) /	15,5	$C_{16}H_{16}N_3O_2$	282,1237	282,1221	5,7
cyclo(D-Trp-ΔPro)	17,8	$C_{16}H_{16}N_3O_2$	282,1237	282,1233	1,6
***cyclo*(L-Trp-L-Trp)**	20,3	$C_{22}H_{21}N_4O_2$	373,1659	373,1659	0,1
cyclo(ΔTrp-L-Trp) /	21,4	$C_{22}H_{19}N_4O_2$	371,1503	371,1503	-0,2
cyclo(L-Trp-ΔTrp)	22,1	$C_{22}H_{19}N_4O_2$	371,1503	371,1497	1,4
cyclo(ΔTrp-ΔTrp)	26,9	$C_{22}H_{17}N_4O_2$	369,1346	369,1342	1,0

cyclische Peptide	RT [min]	Summenformel $[M+H]^+$	m/z $[M+H]^+$ (berechnet)	m/z $[M+H]^+$ (gemessen)	Abweichung [ppm]
***cyclo*(L-Trp-L-His)**	7,6	$C_{17}H_{18}N_5O_2$	324,1455	324,1502	-14,6
cyclo(ΔTrp-L-His) / *cyclo*(L-Trp-ΔHis)	8,4	$C_{17}H_{16}N_5O_2$	322,1299	322,1328	-9,2
cyclo(ΔTrp-ΔHis)	20,5	$C_{17}H_{14}N_5O_2$	320,1142	320,1183	-12,7
	21,2	$C_{17}H_{14}N_5O_2$	320,1142	320,1186	-13,6
***cyclo*(L-His-Gly)**	2,6	$C_8H_{11}N_4O_2$	195,0877	195,0870	3,2
cyclo(ΔHis-Gly)	-	$C_8H_9N_4O_2$	193,0720	-	-
***cyclo*(L-His-L-Ala)**	2,6	$C_9H_{13}N_4O_2$	209,1033	209,1069	-17,2
cyclo(ΔHis-L-Ala) /	15,2	$C_9H_{11}N_4O_2$	207,0877	207,0840	17,8
cyclo(L-His-ΔAla)	24,5	$C_9H_{11}N_4O_2$	207,0877	207,0837	19,3
		$C_9H_{11}N_4O_2$	207,0877	207,	
cyclo(ΔHis-ΔAla)	5,4	$C_9H_9N_4O_2$	205,0720	205,0735	-7,4
	10,4	$C_9H_9N_4O_2$	205,0720	205,0742	-10,9
	11,7	$C_9H_9N_4O_2$	205,0720	205,0734	-7,0
	13,2	$C_9H_9N_4O_2$	205,0720	205,0758	-18,5
	14,7	$C_9H_9N_4O_2$	205,0720	205,0742	-10,9
	15,9	$C_9H_9N_4O_2$	205,0720	205,0699	10,3
***cyclo*(L-His-L-Pro)**	2,7	$C_{11}H_{15}N_4O_2$	235,1190	235,1190	-0,2
cyclo(ΔHis-L-Pro)	17,8	$C_{11}H_{13}N_4O_2$	233,1033	233,1040	-3,1
***cyclo*(L-Ala-L-Ser)**	-	$C_6H_{11}N_2O_3$	159,0764	-	-
cyclo(ΔAla-L-Ser) / *cyclo*(L-Ala-ΔSer)	-	$C_6H_9N_2O_3$	157,0608	-	-
cyclo(ΔAla-ΔSer)	-	$C_6H_7N_2O_3$	155,0451	-	-
***cyclo*(L-Pro-L-Thr)**	3,7	$C_9H_{15}N_2O_2$	199,1077	199,1078	-0,2
cyclo(L-Pro-ΔThr)	-	$C_9H_{13}N_2O_2$	197,0921	-	-
***cyclo*(L-Pro-L-Val)**	8,5	$C_{10}H_{17}N_2O_2$	197,1285	197,1300	-7,6
cyclo(L-Pro-ΔVal)	-	$C_{10}H_{15}N_2O_2$	195,1128	-	-
***cyclo*(L-Pro-L-Leu)**	12,1	$C_{11}H_{19}N_2O_2$	211,1441	211,1455	-6,5
	13,0	$C_{11}H_{19}N_2O_2$	211,1441	211,1457	-7,4
cyclo(L-Pro-ΔLeu)	13,6	$C_{11}H_{17}N_2O_2$	209,1285	209,1278	3,1
***cyclo*(L-Glu-L-Glu)**	14,3	$C_{10}H_{15}N_2O_6$	259,0925	259,1073	-57,4
cyclo(ΔGlu-L-Glu)	15,9	$C_{10}H_{13}N_2O_6$	257,0768	257,0915	-57,2
cyclo(ΔGlu-ΔGlu)	-	$C_{10}H_{11}N_2O_6$	255,0612	-	-
(R)-Benzodiazepindion	21,5	$C_{18}H_{16}N_3O_2$	306,1237	306,1289	-17,0
	-	$C_{18}H_{14}N_3O_2$	304,1081	-	-
(S)-Benzodiazepindion	21,6	$C_{18}H_{16}N_3O_2$	306,1237	306,1284	-15,2
	-	$C_{18}H_{14}N_3O_2$	304,1081	-	-

7.10 Identifizierung der enzymatischen Produkte der Biotransformation von cyclischen Dipeptiden durch AlbA und AlbB (pKB90)

Tabelle 7-15: HR-ESI-MS Daten der enzymatischen Umsetzung von cyclischen Dipeptiden durch AlbA und AlbB.

cyclische Peptide	RT [min]	Summenformel $[M+H]^+$	m/z $[M+H]^+$ (berechnet)	m/z $[M+H]^+$ (gemessen)	Abweichung [ppm]
***cyclo*(L-Phe-Gly)**	8,6	$C_{11}H_{13}N_2O_2$	205,0972	205,0972	-0,4
cyclo(ΔPhe-Gly)	14,2	$C_{11}H_{11}N_2O_2$	203,0815	203,0814	0,6
	14,8	$C_{11}H_{11}N_2O_2$	203,0815	203,0805	5,0
***cyclo*(L-Phe-L-Ser)**	7,1	$C_{12}H_{15}N_2O_3$	235,1077	235,1072	2,1
cyclo(ΔPhe-L-Ser) / *cyclo*(L-Phe-ΔSer)	11,8	$C_{12}H_{13}N_2O_3$	233,0921	233,0902	8,0
cyclo(ΔPhe-ΔSer)	-	$C_{12}H_{11}N_2O_3$	231,0764	-	-
***cyclo*(L-Phe-L-Leu)**	19,5	$C_{15}H_{21}N_2O_2$	261,1598	261,1596	0,6
cyclo(ΔPhe-L-Leu) /	19,7	$C_{15}H_{19}N_2O_2$	259,1441	259,1441	0,1
cyclo(L-Phe-ΔLeu)	23,1	$C_{15}H_{19}N_2O_2$	259,1441	259,1437	1,5
cyclo(ΔPhe-ΔLeu)	23,4	$C_{15}H_{17}N_2O_2$	257,1285	257,1276	3,2
	24,7	$C_{15}H_{17}N_2O_2$	257,1285	257,1282	0,9
***cyclo*(L-Phe-L-Pro)**	14,1	$C_{14}H_{17}N_2O_2$	245,1285	245,1283	0,6
	15,3	$C_{14}H_{17}N_2O_2$	245,1285	245,1292	-3,0
cyclo(ΔPhe-L-Pro)	18,2	$C_{14}H_{15}N_2O_2$	243,1128	243,1133	-2,2
***cyclo*(L-Phe-L-Phe)**	20,8	$C_{18}H_{19}N_2O_2$	295,1441	295,1445	-1,4
cyclo(ΔPhe-L-Phe) / *cyclo*(L-Phe-ΔPhe)	22,3	$C_{18}H_{17}N_2O_2$	293,1285	293,1281	-8,0
cyclo(ΔPhe-ΔPhe)	26,3	$C_{18}H_{15}N_2O_2$	291,1128	291,1126	0,7
	27,1	$C_{18}H_{15}N_2O_2$	291,1128	291,1129	-0,4
***cyclo*(L-Phe-L-Tyr)**	15,7	$C_{18}H_{19}N_2O_3$	311,1390	311,1390	0,2
cyclo(ΔPhe-L-Tyr) /	16,5	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1230	1,2
cyclo(L-Phe-ΔTyr)	18,1	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1228	1,8
	20,5	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1214	6,4
	21,5	$C_{18}H_{17}N_2O_3$	309,1234	309,1221	4,3
cyclo(ΔPhe-ΔTyr)	22,7	$C_{18}H_{15}N_2O_3$	307,1077	307,1071	2,1
	23,4	$C_{18}H_{15}N_2O_3$	307,1077	307,1073	1,5
	23,7	$C_{18}H_{15}N_2O_3$	307,1077	307,1067	3,2
***cyclo*(L-Phe-L-Trp)**	20,7	$C_{20}H_{20}N_3O_2$	334,1550	334,1550	0,0
cyclo(ΔPhe-L-Trp) / *cyclo*(L-Phe-ΔTrp)	21,9	$C_{20}H_{18}N_3O_2$	332,1394	332,1398	-1,4
cyclo(ΔPhe-ΔTrp)	26,0	$C_{20}H_{16}N_3O_2$	330,1237	330,1234	1,0
	27,2	$C_{20}H_{16}N_3O_2$	330,1237	330,1232	1,7
***cyclo*(L-Phe-L-His)**	7,3	$C_{15}H_{17}N_4O_2$	285,1346	285,1345	0,5
cyclo(ΔPhe-L-His) /	9,5	$C_{15}H_{15}N_4O_2$	283,1190	283,1199	-3,5
cyclo(L-Phe-ΔHis)	11,2	$C_{15}H_{15}N_4O_2$	283,1190	283,1183	1,3
cyclo(ΔPhe-ΔHis)	19,2	$C_{15}H_{13}N_4O_2$	281,1033	281,1032	0,5
	21,1	$C_{15}H_{13}N_4O_2$	281,1033	281,1039	-2,3
	23,2	$C_{15}H_{13}N_4O_2$	281,1033	281,1037	-1,5
***cyclo*(L-Tyr-Gly)**	4,6	$C_{11}H_{13}N_2O_3$	221,0921	221,0913	3,3
cyclo(ΔTyr-Gly)	7,4	$C_{11}H_{11}N_2O_3$	219,0764	219,0770	-2,8
	9,9	$C_{11}H_{11}N_2O_3$	219,0764	219,0757	3,4
***cyclo*(L-Tyr-L-Ser)**	4,2	$C_{12}H_{15}N_2O_4$	251,1026	251,1107	-32,0
cyclo(ΔTyr-L-Ser) / *cyclo*(L-Tyr-ΔSer)	-	$C_{12}H_{13}N_2O_4$	249,0870	-	-
cyclo(ΔTyr-ΔSer)	23,3	$C_{12}H_{11}N_2O_4$	247,0713	247,0852	-56,3
***cyclo*(L-Tyr-L-Pro)**	8,9	$C_{14}H_{17}N_2O_3$	261,1234	261,1236	-0,7

cyclische Peptide	RT [min]	Summenformel $[M+H]^+$	m/z $[M+H]^+$ (berechnet)	m/z $[M+H]^+$ (gemessen)	Abweichung [ppm]
cyclo(ΔTyr-L-Pro)	14,5	$C_{14}H_{15}N_2O_3$	259,1077	259,1071	2,4
***cyclo*(L-Tyr-L-Tyr)**	9,7	$C_{18}H_{19}N_2O_4$	327,1339	327,1335	1,3
cyclo(ΔTyr-L-Tyr)	11,5	$C_{18}H_{17}N_2O_4$	325,1183	325,1179	1,1
	12,7	$C_{18}H_{17}N_2O_4$	325,1183	325,1180	0,9
cyclo(ΔTyr-ΔTyr)	19,4	$C_{18}H_{15}N_2O_4$	323,1026	323,1024	0,8
	20,2	$C_{18}H_{15}N_2O_4$	323,1026	323,1024	0,8
***cyclo*(L-Tyr-L-Trp)**	16,2	$C_{20}H_{20}N_3O_3$	350,1499	350,1500	-0,2
cyclo(ΔTyr-L-Trp) / *cyclo*(L-Tyr-ΔTrp)	17,4	$C_{20}H_{18}N_3O_3$	348,1343	348,1344	-0,5
cyclo(ΔTyr-ΔTrp)	23,1	$C_{20}H_{16}N_3O_3$	346,1186	347,1180	1,8
	24,0	$C_{20}H_{16}N_3O_3$	346,1186	347,1189	-0,7
	24,1	$C_{20}H_{16}N_3O_3$	346,1186	347,1173	3,8
***cyclo*(L-Tyr-D-Trp)**	16,2	$C_{20}H_{20}N_3O_3$	350,1499	350,1492	2,2
cyclo(ΔTyr-D-Trp) / *cyclo*(L-Tyr-ΔTrp)	17,4	$C_{20}H_{18}N_3O_3$	348,1343	348,1338	1,5
cyclo(ΔTyr-ΔTrp)	-	$C_{20}H_{16}N_3O_3$	346,1186	-	-
***cyclo*(L-Trp-Gly)**	10,6	$C_{13}H_{14}N_3O_2$	244,1081	244,1081	-0,3
cyclo(ΔTrp-Gly)	-	$C_{13}H_{12}N_3O_2$	242,0924	-	-
***cyclo*(L-Trp-L-Ala)**	11,9	$C_{14}H_{16}N_3O_2$	258,1237	258,1234	1,0
cyclo(ΔTrp-L-Ala) / *cyclo*(L-Trp-ΔAla)	13,1	$C_{14}H_{14}N_3O_2$	256,1081	256,1076	1,8
cyclo(ΔTrp-ΔAla)	-	$C_{14}H_{12}N_3O_2$	254,0924	-	-
***cyclo*(L-Trp-D-Ala)**	11,8	$C_{14}H_{16}N_3O_2$	258,1237	258,1234	1,3
cyclo(ΔTrp-D-Ala) / *cyclo*(L-Trp-ΔAla)	13,0	$C_{14}H_{14}N_3O_2$	256,1081	256,1060	8,1
cyclo(ΔTrp-ΔAla)	-	$C_{14}H_{12}N_3O_2$	254,0924	-	-
***cyclo*(D-Trp-L-Ala)**	11,8	$C_{14}H_{16}N_3O_2$	258,1237	258,1236	0,4
cyclo(ΔTrp-L-Ala) / *cyclo*(D-Trp-ΔAla)	13,1	$C_{14}H_{14}N_3O_2$	256,1081	256,1074	2,6
cyclo(ΔTrp-ΔAla)	-	$C_{14}H_{12}N_3O_2$	254,0924	-	-
***cyclo*(D-Trp-D-Ala)**	12,0	$C_{14}H_{16}N_3O_2$	258,1237	258,1234	1,3
cyclo(ΔTrp-D-Ala) / *cyclo*(D-Trp-ΔAla)	13,1	$C_{14}H_{14}N_3O_2$	256,1081	256,1073	3,1
cyclo(ΔTrp-ΔAla)	-	$C_{14}H_{12}N_3O_2$	254,0924	-	-
***cyclo*(L-Trp-L-Leu)**	18,7	$C_{17}H_{22}N_3O_2$	300,1707	300,1704	0,8
cyclo(ΔTrp-L-Leu) /	19,5	$C_{17}H_{20}N_3O_2$	298,1550	298,1547	1,1
cyclo(L-Trp-ΔLeu)	23,3	$C_{17}H_{20}N_3O_2$	298,1550	298,1534	5,3
cyclo(ΔTrp-ΔLeu)	25,0	$C_{17}H_{18}N_3O_2$	296,1394	296,1384	3,2
***cyclo*(L-Trp-L-Pro)**	15,3	$C_{16}H_{18}N_3O_2$	284,1394	248,1382	4,1
	16,6	$C_{16}H_{18}N_3O_2$	284,1394	284,1393	0,1
cyclo(ΔTrp-L-Pro) / *cyclo*(L-Trp-ΔPro)	15,8	$C_{16}H_{16}N_3O_2$	282,1237	282,1233	1,6
***cyclo*(L-Trp-D-Pro)**	15,3	$C_{16}H_{18}N_3O_2$	284,1394	284,1398	-1,7
	16,6	$C_{16}H_{18}N_3O_2$	284,1394	248,1388	1,9
cyclo(ΔTrp-D-Pro) / *cyclo*(L-Trp-ΔPro)	15,8	$C_{16}H_{16}N_3O_2$	282,1237	282,1229	2,9
***cyclo*(D-Trp-L-Pro)**	15,4	$C_{16}H_{18}N_3O_2$	284,1394	284,1392	0,5
	16,7	$C_{16}H_{18}N_3O_2$	284,1394	284,1384	3,4
cyclo(ΔTrp-L-Pro) / *cyclo*(D-Trp-ΔPro)	15,8	$C_{16}H_{16}N_3O_2$	282,1237	282, 1220	6,1
***cyclo*(D-Trp-D-Pro)**	15,3	$C_{16}H_{18}N_3O_2$	284,1394	284,1387	2,2
	16,6	$C_{16}H_{18}N_3O_2$	284,1394	284,1401	-2,6
cyclo(ΔTrp-D-Pro) / *cyclo*(D-Trp-ΔPro)	15,8	$C_{16}H_{16}N_3O_2$	282,1237	282,1229	2,7
	18,2	$C_{16}H_{16}N_3O_2$	282,1237	282,1242	-1,8

cyclische Peptide	RT [min]	Summenformel $[M+H]^+$	m/z $[M+H]^+$ (berechnet)	m/z $[M+H]^+$ (gemessen)	Abweichung [ppm]
***cyclo*(L-Trp-L-Trp)**	20,7	$C_{22}H_{21}N_4O_2$	373,1659	373,1658	0,2
cyclo(ΔTrp-L-Trp) /	21,7	$C_{22}H_{19}N_4O_2$	371,1503	371,1499	0,9
cyclo(L-Trp-ΔTrp)	22,4	$C_{22}H_{19}N_4O_2$	371,1503	371,1496	1,8
cyclo(ΔTrp-ΔTrp)	27,1	$C_{22}H_{17}N_4O_2$	369,1346	369,1334	3,2
***cyclo*(L-Trp-L-His)**	8,0	$C_{17}H_{18}N_5O_2$	324,1455	324,1462	-2,2
	8,5	$C_{17}H_{18}N_5O_2$	324,1455	324,1480	-7,6
cyclo(ΔTrp-L-His) /	9,0	$C_{17}H_{16}N_5O_2$	322,1299	322,1299	-0,3
cyclo(L-Trp-ΔHis)					
cyclo(ΔTrp-ΔHis)	21,0	$C_{17}H_{14}N_5O_2$	320,1142	320,1144	-0,7
	21,6	$C_{17}H_{14}N_5O_2$	320,1142	320,1146	-1,3
***cyclo*(L-His-Gly)**	2,8	$C_8H_{11}N_4O_2$	195,0877	195,0871	2,9
cyclo(ΔHis-Gly)	-	$C_8H_9N_4O_2$	193,0720	-	-
***cyclo*(L-His-L-Ala)**	2,9	$C_9H_{13}N_4O_2$	209,1033	209,1027	3,0
cyclo(ΔHis-L-Ala) /	-	$C_9H_{11}N_4O_2$	207,0877	-	-
cyclo(L-His-ΔAla)					
cyclo(ΔHis-ΔAla)	5,4	$C_9H_9N_4O_2$	205,0720	205,0700	9,9
	10,5	$C_9H_9N_4O_2$	205,0720	205,0704	7,8
	11,8	$C_9H_9N_4O_2$	205,0720	205,0701	9,5
***cyclo*(L-His-L-Pro)**	3,6	$C_{11}H_{15}N_4O_2$	235,1190	235,1189	0,1
cyclo(ΔHis-L-Pro)	5,5	$C_{11}H_{13}N_4O_2$	233,1033	233,1065	-13,9
***cyclo*(L-Ala-L-Ser)**	-	$C_6H_{11}N_2O_3$	159,0764	-	-
cyclo(ΔAla-L-Ser) /	-	$C_6H_9N_2O_3$	157,0608	-	-
cyclo(L-Ala-ΔSer)					
cyclo(ΔAla-ΔSer)	-	$C_6H_7N_2O_3$	155,0451	-	-
***cyclo*(L-Pro-L-Thr)**	3,9	$C_9H_{15}N_2O_2$	199,1077	199,1070	3,5
cyclo(L-Pro-ΔThr)	-	$C_9H_{13}N_2O_2$	197,0921	-	-
***cyclo*(L-Pro-L-Val)**	8,0	$C_{10}H_{17}N_2O_2$	197,1285	197,1277	3,8
	8,8	$C_{10}H_{17}N_2O_2$	197,1285	197,1286	-0,5
cyclo(L-Pro-ΔVal)	-	$C_{10}H_{15}N_2O_2$	195,1128	-	-
***cyclo*(L-Pro-L-Leu)**	12,5	$C_{11}H_{19}N_2O_2$	211,1441	211,1441	-0,1
	13,4	$C_{11}H_{19}N_2O_2$	211,1441	211,1445	-1,9
cyclo(L-Pro-ΔLeu)	13,8	$C_{11}H_{17}N_2O_2$	209,1285	209,1283	0,9
***cyclo*(L-Glu-L-Glu)**	14,7	$C_{10}H_{15}N_2O_6$	259,0925	259,1063	-53,5
cyclo(ΔGlu-L-Glu)	10,5	$C_{10}H_{13}N_2O_6$	257,0768	257,0786	-7,0
	13,6	$C_{10}H_{13}N_2O_6$	257,0768	257,0903	-52,7
	16,3	$C_{10}H_{13}N_2O_6$	257,0768	257,0913	-56,3
cyclo(ΔGlu-ΔGlu)	-	$C_{10}H_{11}N_2O_6$	255,0612	-	-
(R)-Benzodiazepindion	21,7	$C_{18}H_{16}N_3O_2$	306,1237	306,1242	-1,7
	-	$C_{18}H_{14}N_3O_2$	304,1081	-	-
(S)-Benzodiazepindion	21,7	$C_{18}H_{16}N_3O_2$	306,1237	306,1242	-0,8
	-	$C_{18}H_{14}N_3O_2$	304,1081	-	-

7.11 Identifizierung der enzymatischen Produkte der Biotransformation von deuteriertem *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) durch CDO_A-Np und CDO_B-Np (pKB81)

Tabelle 7-16: HR-ESI-MS Daten der enzymatischen Umsetzung von deuteriertem cyclo*(L-Tyr-L-Phe) (5) durch CDO_A-Np und CDO_B-Np.*

	RT [min]	**Summenformel $[M+H]^+$**	**m/z $[M+H]^+$ (berechnet)**	**m/z $[M+H]^+$ (gemessen)**	**Abweichung [ppm]**
5	22,5	$C_{18}H_{15}D_4N_2O_3$	315,1641	315,1640	0,4
5a	23,1	$C_{18}H_{14}D_3N_2O_3$	312,1422	312,1407	4,8
5b	24,4	$C_{18}H_{14}D_3N_2O_3$	312,1422	312,1416	1,9
5c	28,9	$C_{18}H_{13}D_2N_2O_3$	309,1203	309,1195	2,5

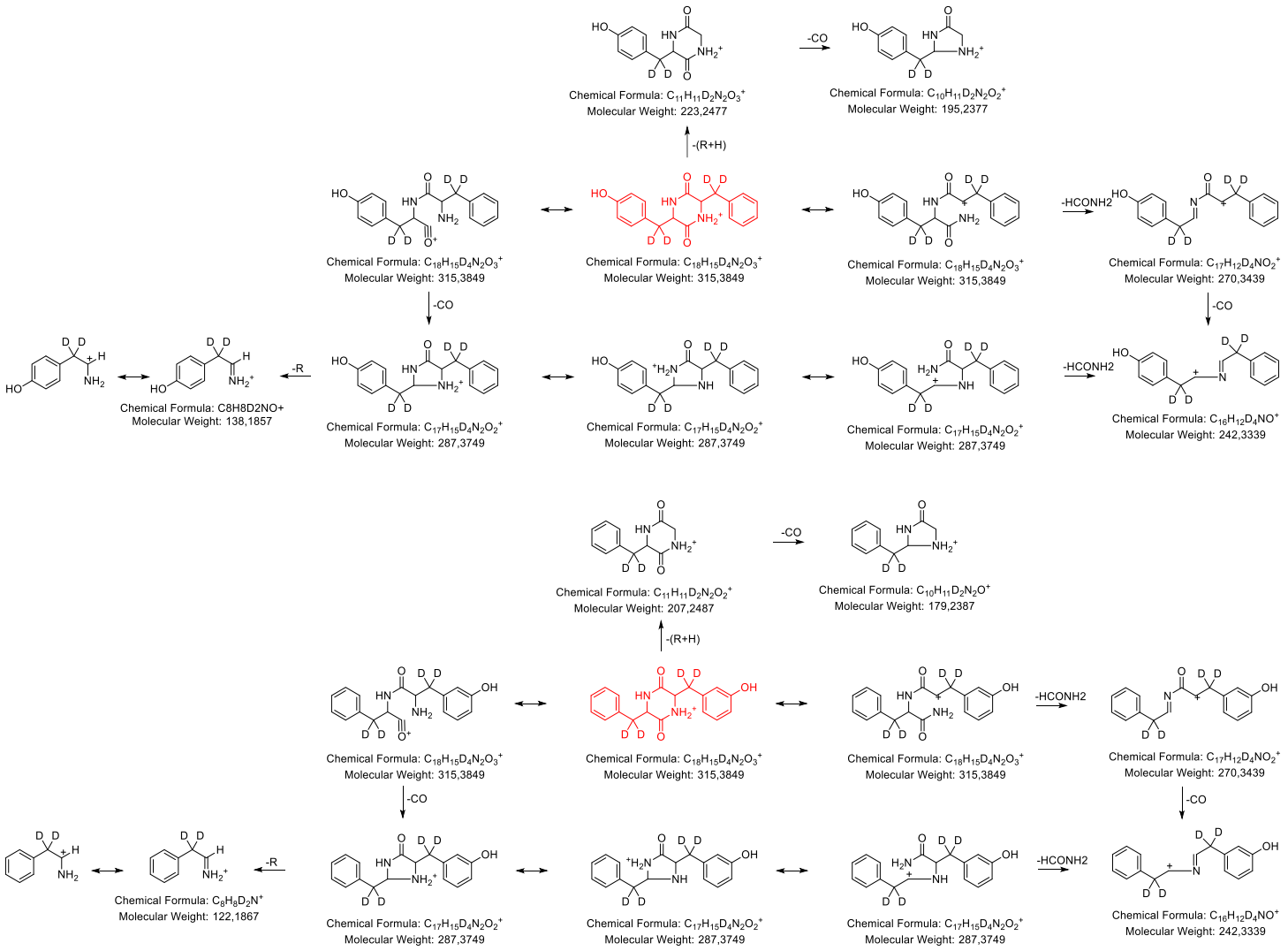


Abbildung 7-14: Putatives Fragmentierungsmuster von protoniertem 3-,3-,3‘-,3‘-D_4-cyclo(L-Tyr-L-Phe).

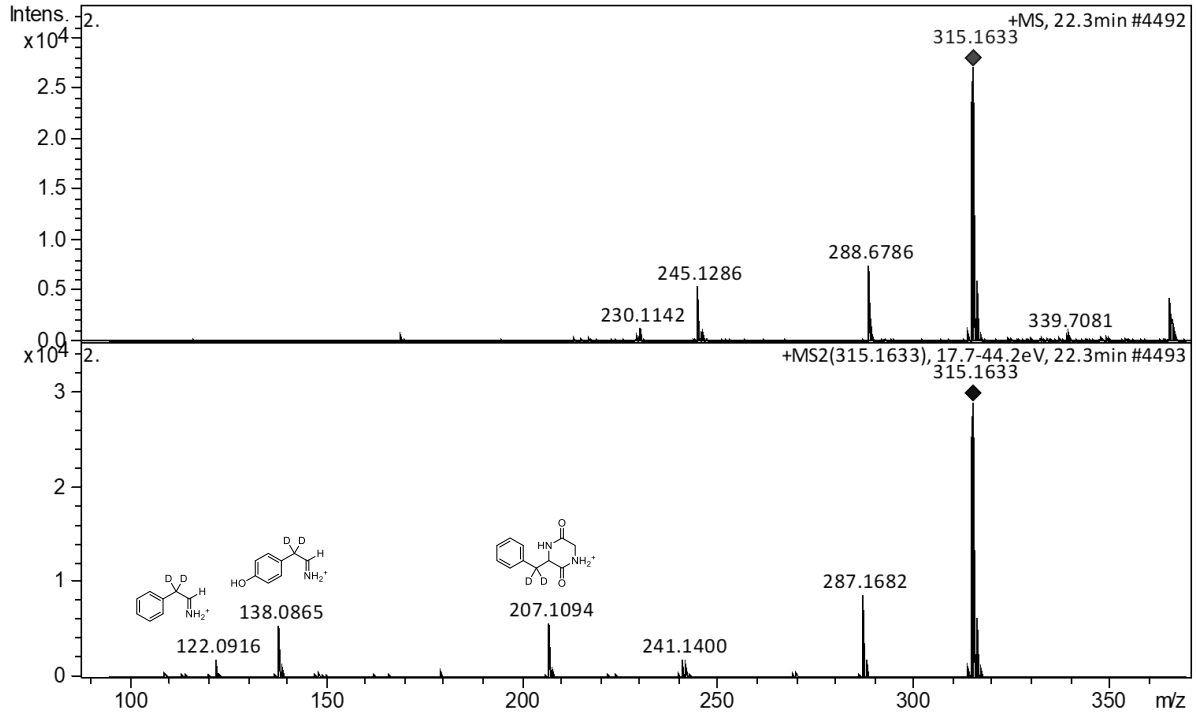


*Abbildung 7-15: MS^2 Analyse von 3-,3-,3'-,3'-D_4-cyclo(L-Tyr-L-Phe) (**5**) aus der Kultur mit CDO_A-Np und CDO_B-Np.*

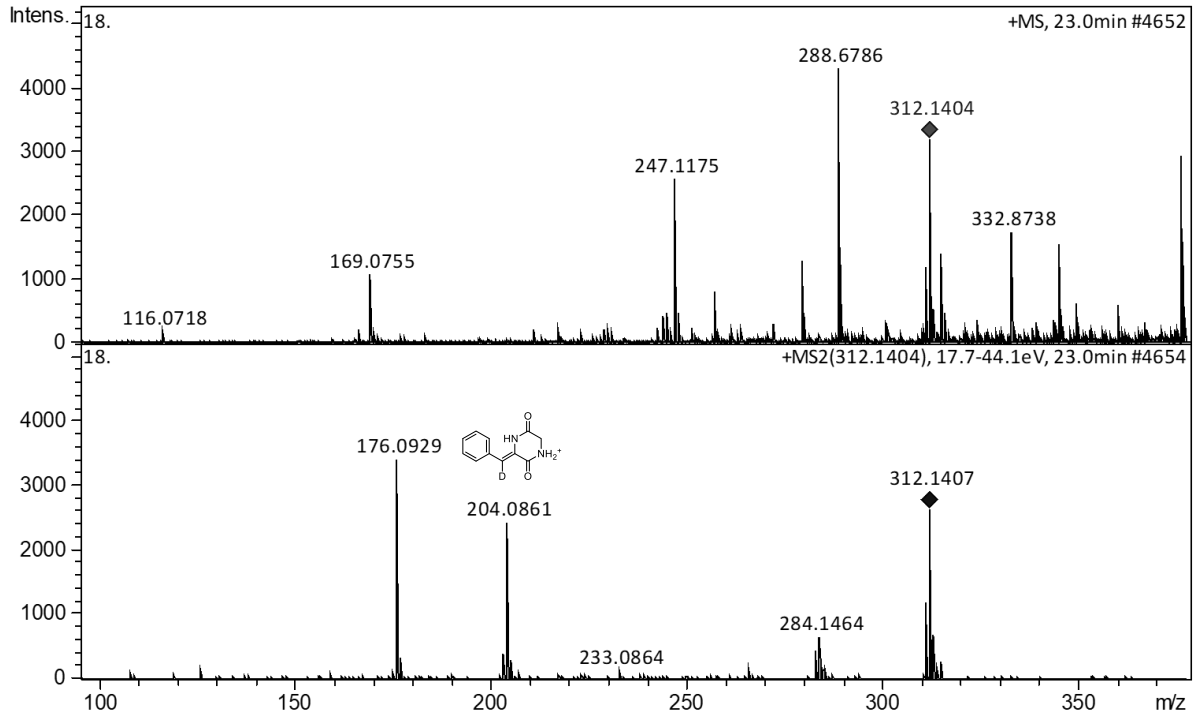


*Abbildung 7-16: MS^2 Analyse von einfach dehydriertem 3-,3-,3'-D_3-cyclo(L-Tyr-ΔPhe) (**5a**) aus der Kultur mit CDO_A-Np und CDO_B-Np.*

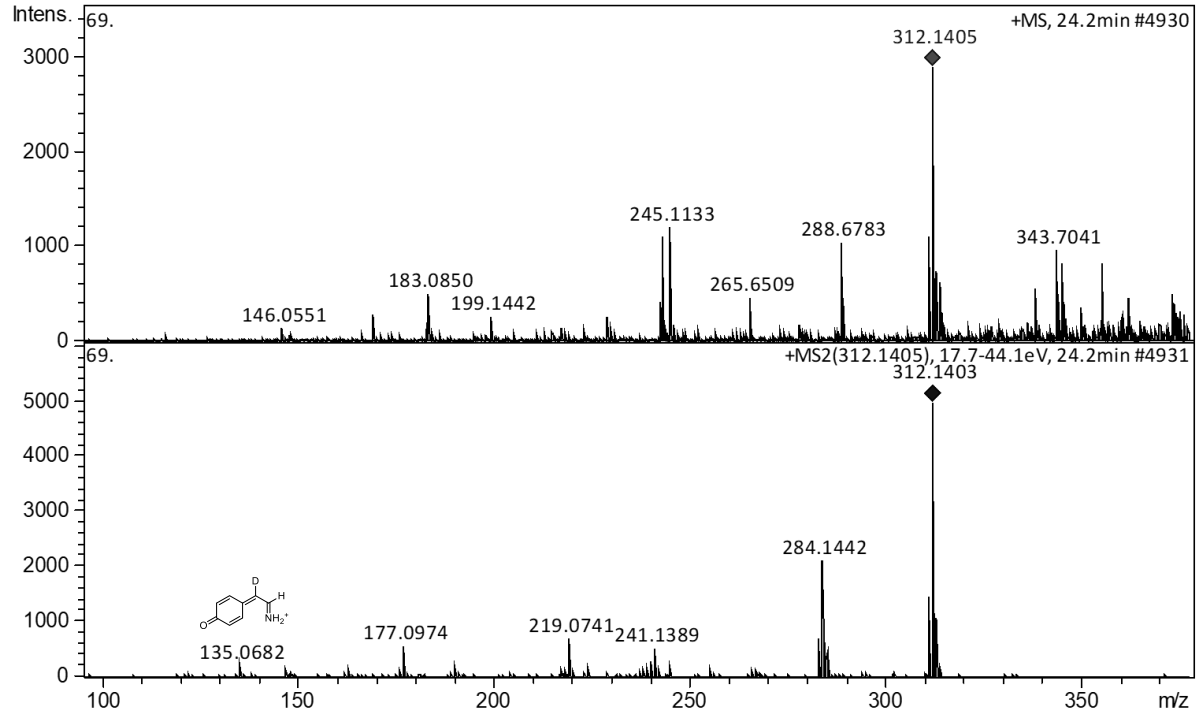


*Abbildung 7-17: MS^2 Analyse von einfach dehydriertem 3-,3'-,3'-D_3-*cyclo*(*ΔTyr-L-Phe*) (**5b**) aus der Kultur mit CDO_A-Np und CDO_B-Np.*

7.12 Identifizierung der enzymatischen Produkte der Biotransformation von deuteriertem *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) durch Ndas_1146 und Ndas_1147

Tabelle 7-17: HR-ESI-MS Daten der enzymatischen Umsetzung von deuteriertem cyclo*(L-Tyr-L-Phe) (5) durch Ndas_1146 und Ndas_1147.*

	RT [min]	Summenformel $[M+H]^+$	m/z $[M+H]^+$ (berechnet)	m/z $[M+H]^+$ (gemessen)	Abweichung [ppm]
5	22,7	$C_{18}H_{15}D_4N_2O_3$	315,1641	315,1641	-0,0
5a	23,3	$C_{18}H_{14}D_3N_2O_3$	312,1422	312,1413	2,8
5b	24,6	$C_{18}H_{14}D_3N_2O_3$	312,1422	312,1408	4,5
5c	29,1	$C_{18}H_{13}D_2N_2O_3$	309,1203	309,1195	2,5

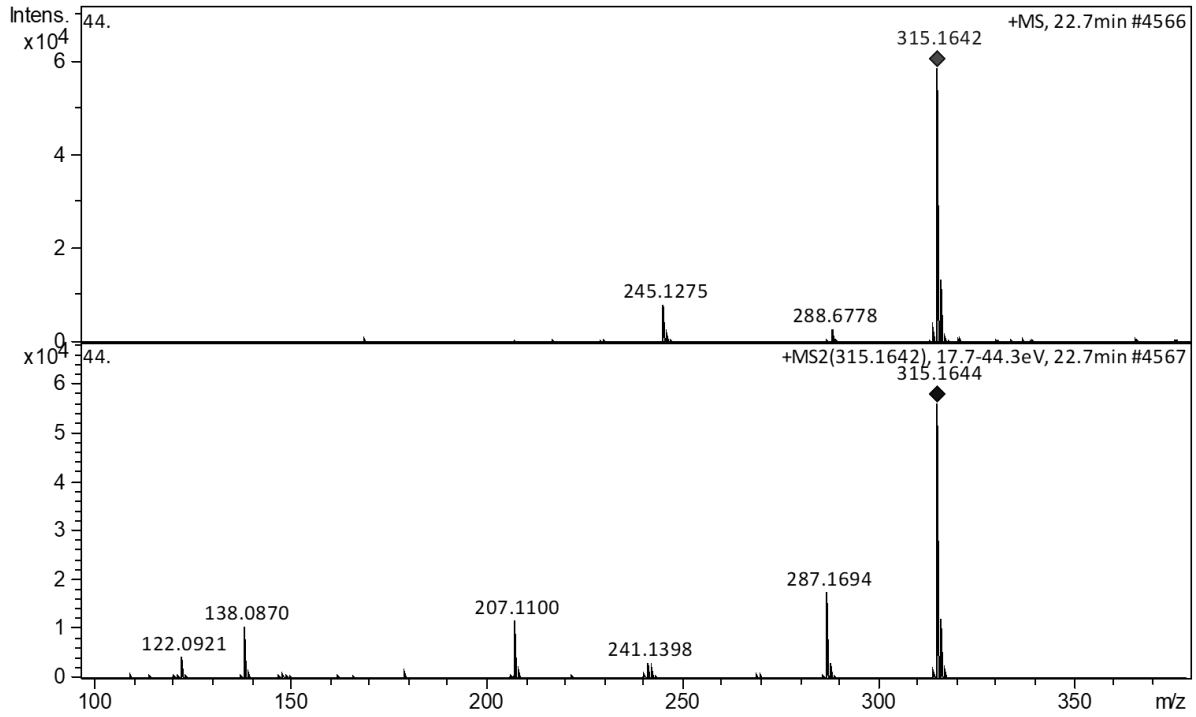


*Abbildung 7-18: MS^2 Analyse von 3-,3-,3'-,3'-D_4-cyclo(L-Tyr-L-Phe) (**5**) aus der Kultur mit Ndas_1146 und Ndas_1147.*

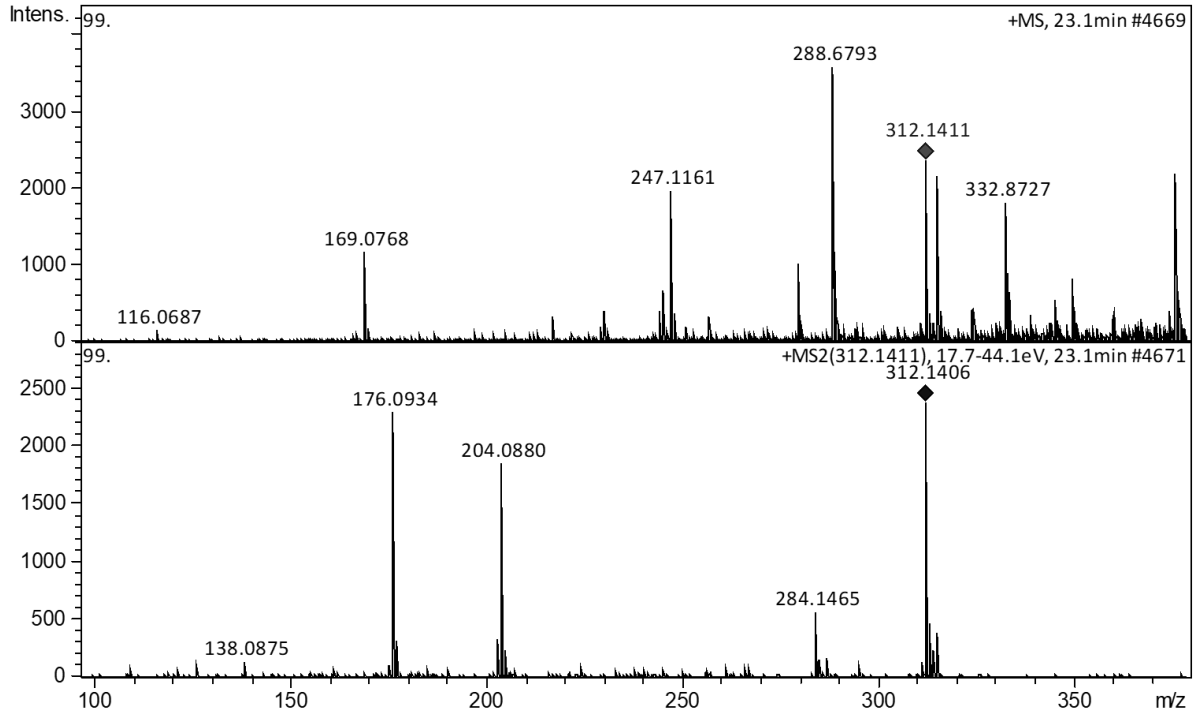


*Abbildung 7-19: MS² Analyse von einfach dehydriertem 3-,3-,3'-D_3-*cyclo(*L*-Tyr-ΔPhe) (**5a**) *aus der Kultur mit Ndas_1146 und Ndas_1147.*

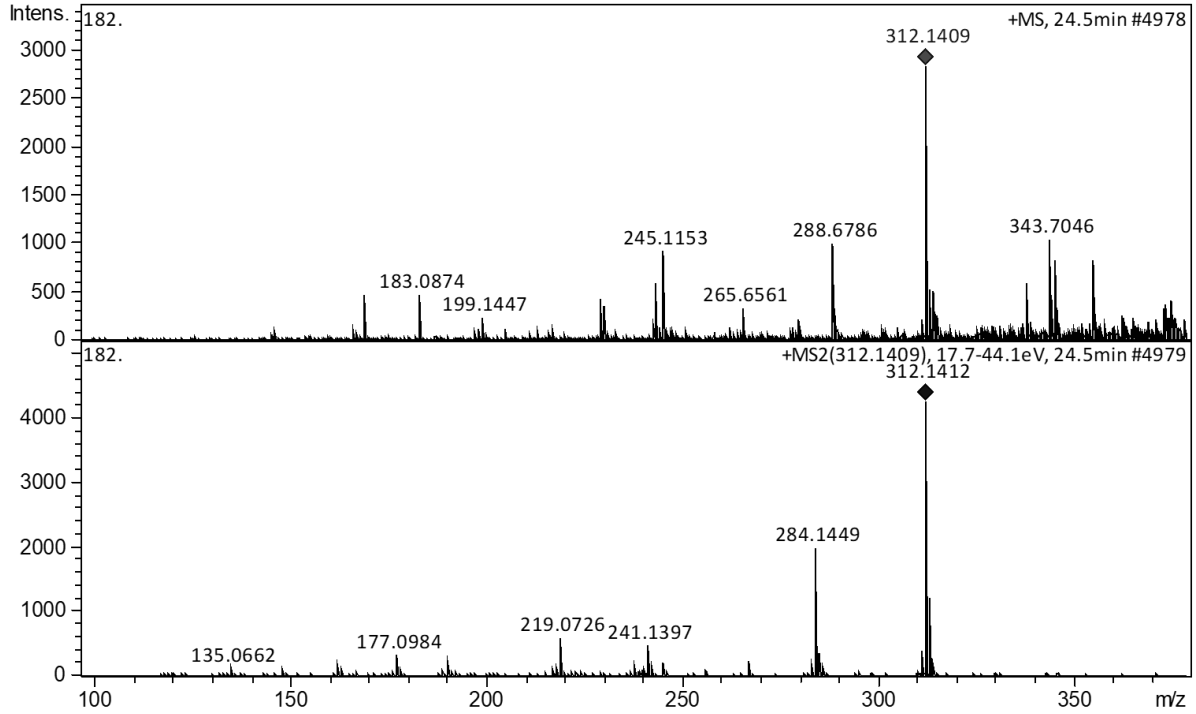


*Abbildung 7-20: MS² Analyse von einfach dehydriertem 3-,3'-,3'-D_3-*cyclo(*ΔTyr-L-Phe*) (**5b**) *aus der Kultur mit Ndas_1146 und Ndas_1147.*

7.13 Identifizierung der enzymatischen Produkte der Biotransformation von deuteriertem *cyclo*(L-Tyr-L-Phe) durch AlbA und AlbB (pKB90)

Tabelle 7-18: HR-ESI-MS Daten der enzymatischen Umsetzung von deuteriertem cyclo*(L-Tyr-L-Phe) (5) durch AlbA und AlbB.*

	RT [min]	Summenformel $[M+H]^+$	m/z $[M+H]^+$ (berechnet)	m/z $[M+H]^+$ (gemessen)	Abweichung [ppm]
5	22,7	$C_{18}H_{15}D_4N_2O_3$	315,1641	315,1648	-2,2
5a	23,3	$C_{18}H_{14}D_3N_2O_3$	312,1422	312,1424	-0,7
5b	24,6	$C_{18}H_{14}D_3N_2O_3$	312,1422	312,1419	1,0
5c	29,1	$C_{18}H_{13}D_2N_2O_3$	309,1203	309,1196	2,2

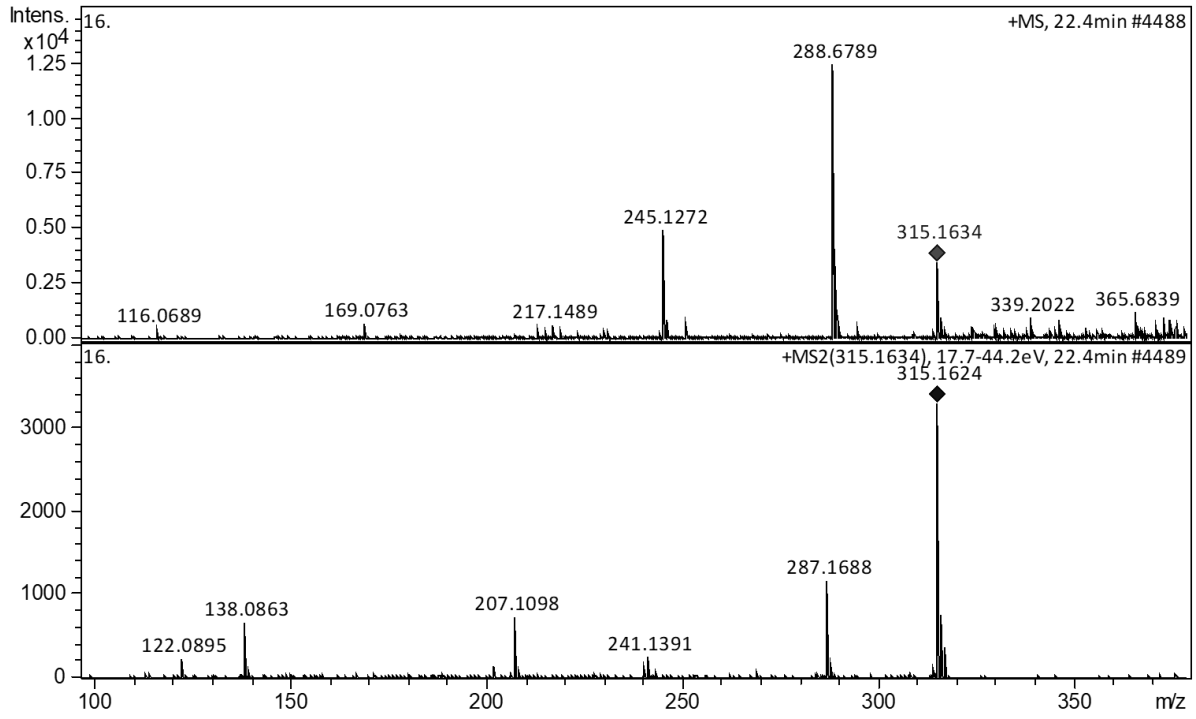


*Abbildung 7-21: MS² Analyse von 3-,3-,3'-,3'-D_4-cyclo(L-Tyr-L-Phe) (**5**) aus der Kultur mit AlbA und AlbB.*

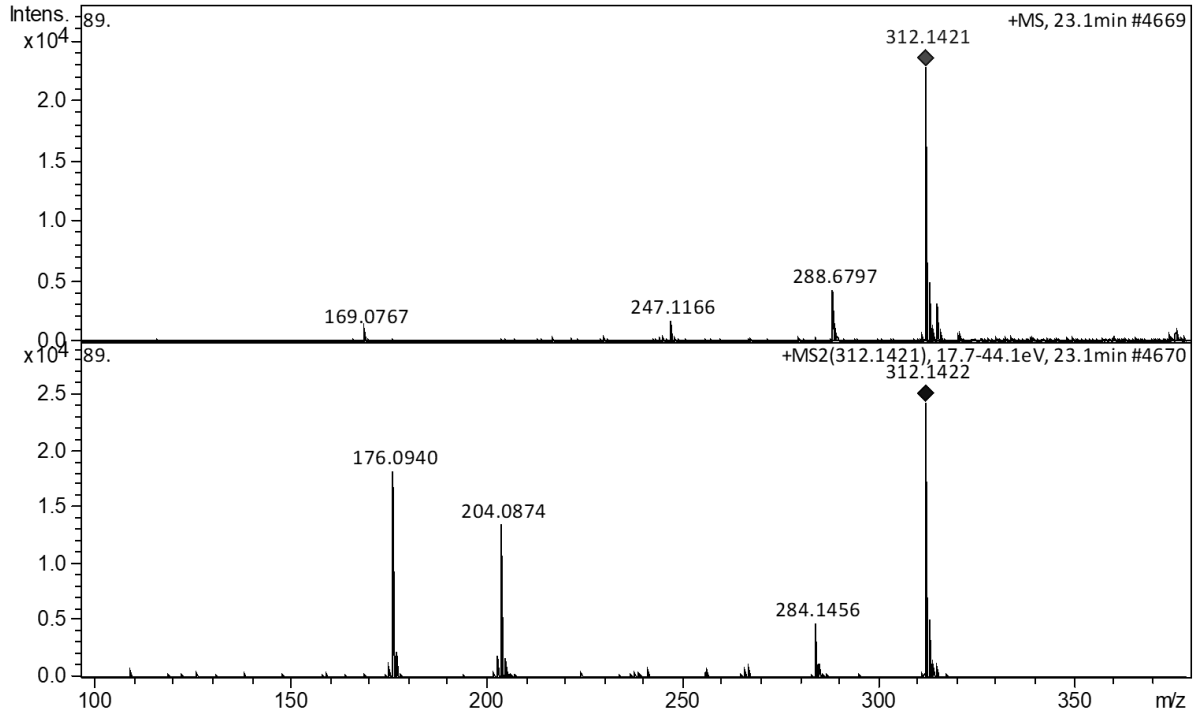


*Abbildung 7-22: MS^2 Analyse von einfach dehydriertem 3-,3-,3'-D_3-cyclo(L-Tyr-ΔPhe) (**5a**) aus der Kultur mit AlbA und AlbB.*

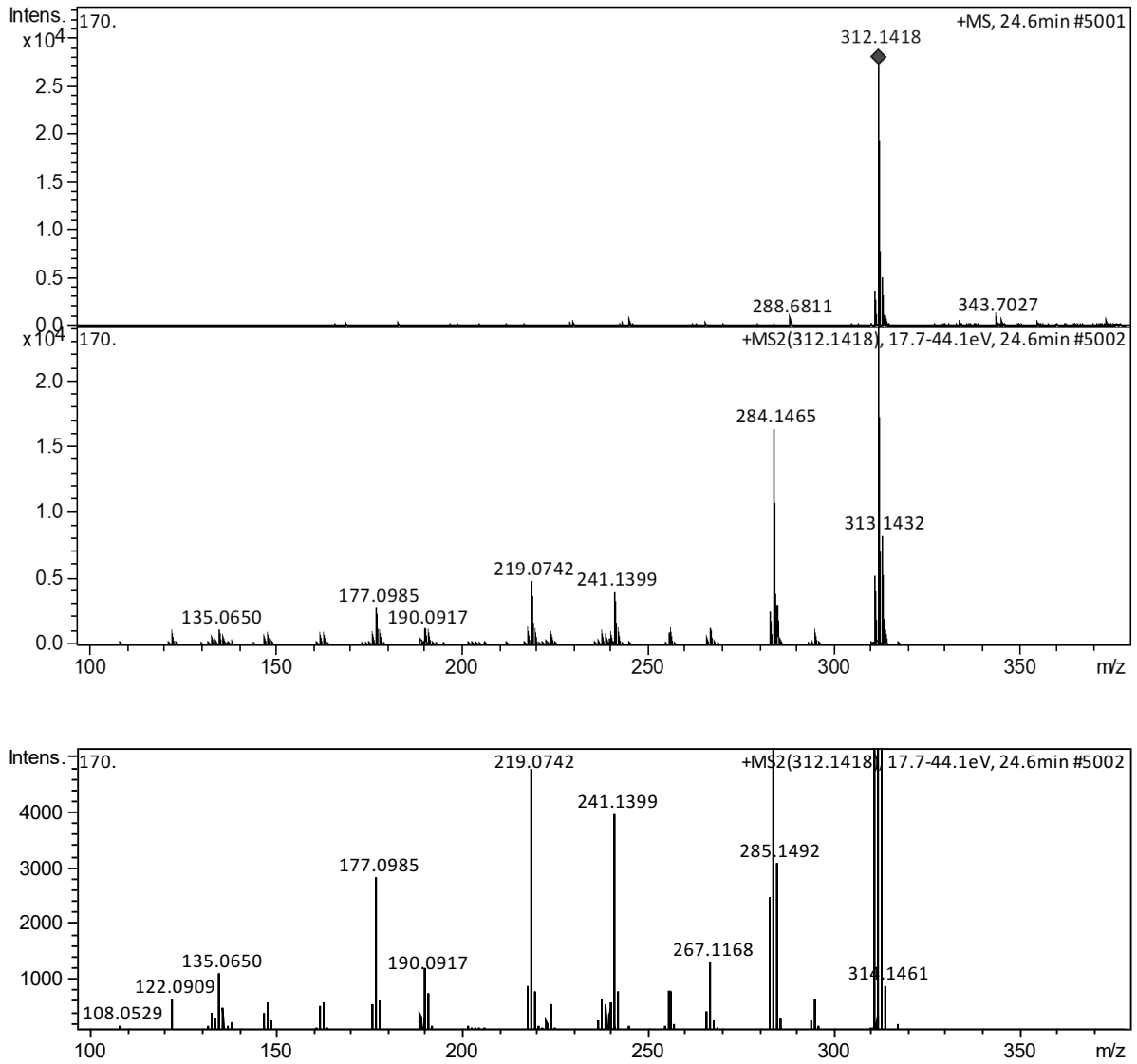


*Abbildung 7-23: MS^2 Analyse von einfach dehydriertem 3-,3‘-,3‘-D_3-cyclo(ΔTyr-L-Phe) (**5b**) aus der Kultur mit AlbA und AlbB.*

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Shu-Ming Li für die hervorragende Betreuung und die Unterstützung meiner Arbeit. Seine Tür stand für mich jederzeit offen, wobei ich mich stets auf seine konstruktive Hilfs- und Diskussionsbereitschaft verlassen konnte. Besonders danke ich ihm sowie Prof. Dr. Kazufumi Yazaki aus Kyoto dafür, dass ich 2014 während meines Forschungsaufenthaltes in Japan neue Arbeitstechniken sowie unvergessliche kulturelle Erfahrungen sammeln durfte.

Prof. Dr. Michael Keusgen danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel danke ich herzlich für das freundliche Überlassen des Expressionskonstruktes für die Überproduktion von Ndas_1146 und Ndas_1147 aus *N. dassonvillei* in *E. coli*.

Ebenfalls herzlich danken möchte ich sämtlichen Freunden und Mitarbeitern im Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie für die freundliche Arbeitsatmosphäre sowie die wertvollen Anregungen und die Zeit, die sie mir und meinen Stolpersteinen geopfert haben. Lena und Rixa danke ich für ihre stetige, engagierte Hilfe bei LC-MS-Messungen sowie für das Bereitstellen ihrer synthetisierten Substrate. Kathrin, Carsten und Marco möchte ich für die besondere Unterstützung in der Anfangszeit meiner Arbeit danken. Katja und Viola danke ich sehr für die gemeinsame Zeit in Kyoto und zusammen mit Lindsay, Alex, Peter und Mike für unermüdliche Aufmunterungen, Motivation und Unterstützung während der gesamten Zeit.

Anschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern und meinem Bruder dafür bedanken, dass sie alle Höhen und Tiefen mit mir geteilt und mich immer unterstützt haben. Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für das gründliche Korrekturlesen der Arbeit. Ein besonderer Dank gilt Markus für seine unendliche Unterstützung und Geduld über all die Jahre!

Curriculum vitae

Die Seite 179 (Curriculum vitae) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.