

Chemisch-Biologische Untersuchungen der Aktivität von Thiopeptidantibiotika an der 70S ribosomalen GTPase-assoziierten Region

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität Dortmund
angenommene

Dissertation

von
Diplom-Biologe

Sascha Baumann

geboren am 30.03.1980 in Recklinghausen

Dekan: Prof. Dr. Heinz Rehage

1. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Waldmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Roger S. Goody

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Dr. Hans-Dieter Arndt am Fachbereich Chemie der Technischen Universität Dortmund und am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund im Zeitraum von März 2006 bis Juli 2010 angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1	Allgemeine Einleitung	1
1.1	Thiopeptidantibiotika	4
1.1.1	Struktur und Klassifizierung	4
1.1.2	Biosynthese	7
1.1.3	Biologische Aktivitäten	8
1.1.3.1	Translationsinhibition	8
1.1.3.2	<i>TipA</i> -Regulation	9
1.1.3.3	Eukaryotische Zielstrukturen	11
1.2	Inhibition der prokaryotischen Translation durch Thiopeptid- antibiotika	12
1.2.1	Das Ribosom	13
1.2.2	Proteinbiosynthese in Prokaryoten	15
1.2.3	Die 70S ribosomale GTPase-assoziierte Region	19
1.2.4	Die „Stielbasis“ - Die ribosomale Bindestelle der Thiopeptid- antibiotika	20
1.2.5	Inhibition ribosomaler GTPasen durch Thiopeptide	25
1.3	Pharmakologie der Thiopeptide	27
1.4	Affinitätsmarkierung (kovalenter Einfang)	29
1.5	Ziele und Signifikanz dieser Arbeit	30
1.6	Referenzen	32
Kapitel 2	Material und Methoden	39
2.1	Geräte	40
2.2	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	42
2.3	Enzyme	44
2.4	Ribosomale Faktoren und 20S Proteasom	44
2.5	Plasmide	45
2.6	Antikörper	46
2.7	Oligonukleotide	46

2.8	Bakterienstämme	48
2.9	Naturstoffe und Derivate	49
2.10	Molekularbiologische Methoden	51
2.11	Proteinbiochemische Methoden	65
2.12	RNA-biochemische Methoden	74
2.13	Biophysikalische Methoden	85
2.14	<i>In vitro</i> Assays	99
2.15	Mikrobiologische Methoden	105
2.16	<i>In silico</i> Methoden	107
2.17	Referenzen	108

Kapitel 3	Studien zur Affinität von Thiopeptidantibiotika an das 70S ribosomale GTPase-Zentrum	111
3.1	Einleitung	112
3.2	EMSA-Studien zur Thiopeptid-L11-23S rRNA-Interaktion	114
3.2.1	Interaktion von Thiopeptiden mit „nackter“ 23S rRNA	114
3.2.2	Interaktion von Thiopeptiden mit 23S rRNA-L11-Protein- komplexen	117
3.3	CD-spektroskopische Studien zur Thiopeptid-L11-23S rRNA- Interaktion	125
3.3.1	Einfluss von Thiopeptiden auf die Struktur „nackter“ 23S rRNA	125
3.3.2	Einfluss von Thiopeptiden auf die Struktur von RNA-freiem L11-Protein und die Struktur von 23S rRNA-L11-Komplexen	127
3.4	Untersuchung der Thiopeptid-L11-23S rRNA-Interaktion mit Hilfe fluoreszenter Thiostreptonsonden	130
3.4.1	Fluoreszenzanisotropiestudien der Interaktion der Thiostrepton- sonde mit 23S rRNA-L11-Komplexen	132
3.4.2	Fluoreszenzanisotropiestudien der Interaktion der Thiostrepton- sonde mit 70S Ribosomen	136

3.4.3	Fluoreszenzanisotropiestudien der Affinität von Thiopeptidnaturstoffen	138
3.4.4	<i>In vitro</i> Inhibition der bakteriellen Proteinbiosynthese durch Thiopeptidnaturstoffe	141
3.5	Diskussion	145
3.6	Referenzen	152
Kapitel 4	Bioanalytische Studien semi- und totalsynthetischer Thiopeptid-derivate	155
4.1	Einleitung	156
4.2	Semisynthetische Thiostrepton-Derivate	158
4.2.1	Verkürzung und Thiol-Michael-Monoaddukte im azyklischen Bereich	158
4.2.2	Thiol-Michael-Bisaddukte und B-Ring Thiol-Michael-Monoaddukte	163
4.2.3	Manipulation des Thiostrepton-Grundgerüsts	166
4.2.4	NMR-Strukturanalysen und in silico „Docking“ semisynthetischer Thiostreptonderivate	172
4.2.5	Thiostrepton-Biotin-Addukt	174
4.3	Totalsynthetische Nosiheptid-Derivate	179
4.4	Diskussion	184
4.5	Referenzen	192
Kapitel 5	Molekulare Determinanten der mikrobiellen Resistenz gegen Thiopeptidantibiotika	195
5.1	Einleitung	196
5.2	Studien zur Interaktion von Thiopeptidantibiotika mit 23S rRNA und L11-Mutanten	197
5.2.1	Mutanten der 23S rRNA	197
5.2.2	Mutanten des L11-Proteins	200

5.2.3	Analyse von Mutanten des L11-Proteins in intakten 70S Ribosomen	203
5.2.4	Rekonstitution von Resistenzmutationen <i>in vivo</i>	209
5.2.5	Verdrängungstitrationen der Sonde von <i>Tth</i> L11-Mutanten- Komplexen	214
5.3	Diskussion	218
5.4	Referenzen	225
Kapitel 6	Strukturelle Studien der Thiopeptid-Zielstruktur- Interaktion	229
6.1	Einleitung	230
6.2	Proximity-Induced Covalent Capture (PICC)	232
6.2.1	Methodenentwicklung: PICC isolierter RNA-Protein-Komplexe	232
6.2.2	PICC mit intakten Ribosomen	254
6.3	Kristallographische Studien	260
6.3.1	Optimierung der PICC-Reaktion für Kristallisationszwecke	260
6.3.2	Thiostreptonsondenkomplexe	261
6.4	Diskussion	266
6.5	Referenzen	277
Kapitel 7	Eukaryotische Thiopeptidzielstrukturen	281
7.1	Einleitung	282
7.2	Ergebnisse	282
7.3	Diskussion	284
7.4	Referenzen	285
Kapitel 8	Zusammenfassung	287
Kapitel 9	Anhang	293

Abkürzungsverzeichnis

Die Angabe von Dimensionen in dieser Arbeit erfolgt nach den Konventionen des SI-Systems und der IUPAC. Ebenso gelten die Abkürzungen der Aminosäuren im Einbuchstaben- oder Dreibuchstabencode. Wenn nicht anders erwähnt, handelt es sich hierbei um L-Aminosäuren

°C	Grad Celsius
Å	Angström, 0,1 nm
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar(e)
<i>Bsu</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bzw.	beziehungsweise
<i>ca.</i>	<i>circa</i>
CD	circular dichroism, Zirkulardichroismus
Da	Dalton, 1 Da = 1 u
DC	Dünnschichtchromatographie
DHA	Dehydroalanin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
<i>Eco</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Elongationsfaktor
EGTA	3,6-Dioxaoctammethylendinitrilotetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung, 9,81 m/s ²
GAP	GTPase-aktivierende Proteine
GAR	GTPase-assoziierte Region
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein der Qualle <i>Aequorea victoria</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IF	Initiationsfaktor
IMAC	immobilisierte Metallchelatsaffinitätschromatographie

Abkürzungsverzeichnis

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
K_D	Dissoziationskonstante
K_{app}	scheinbare Dissoziationskonstante
konz.	konzentriert
l	Liter
LB	Luria-Bertani
MDR	multidrug resistant
M	Molar, mol/l
MALDI	matrix-assisted laser desorption ionization
MIC	mittlere inhibitorische Konzentration
min	Minute
mind.	mindestens
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensitiver <i>Staphylococcus aureus</i>
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance
nt	Nukleotid(e)
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+ -Ionenkonzentration
PICC	proximity-induced covalent capture
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RF	Release-Faktor
rRNA	ribosomale RNA
RRF	Ribosomen-Recycling-Faktor
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg, $1 S = 10^{-13} s$
SAR	Struktur-Affinitäts-Relation
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
t	Zeit
T	Temperatur
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA

TBS	Tris-buffered saline
TCEP	Tris(2-chlorethyl)phosphat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TFE	Trifluorethanol
THZ	Thiazolin
T _M	Schmelztemperatur
TOF	time of flight
tRNA	Transfer-RNA
Tricin	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
<i>Tth</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
U	Unit, enzymatische Aktivitätseinheit
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifugation
V	Volt
vgl.	vergleiche
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Kapitel 1

Allgemeine Einleitung

1. Allgemeine Einleitung

„Die Mikroben haben immer das letzte Wort“ Louis Pasteur (1822-1895)

Bakterielle Infektionskrankheiten sind die dritthäufigste Todesursache weltweit und mit Herz-Kreislaufkrankungen und Krebs eine der häufigsten Todesursachen in ökonomisch fortgeschrittenen Ländern.^[1] Der jahrzehntelange, ausgiebige Gebrauch von Antibiotika in der Humantherapie und der Tierzucht setzte pathogene Bakterien unter einen starken Selektionsdruck. Die Folge ist, dass immer mehr bakterielle Stämme die Entwicklung von Resistenzen (unterschiedlichster Mechanismen)^[2] gegen einzelne Antibiotika oder sogar parallele Resistenzen gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Antibiotika, das Phänomen der so genannten „Multiresistenz“ (multidrug-resistance, MDR), aufzeigen.^[3] Es wird in diesem Zusammenhang z.B. angenommen, dass das in der Landwirtschaft verwendete Glycopeptidantibiotikum Avoparcin mit der Entwicklung Vancomycin-resistenter Enterococccen (VRE) in Verbindung steht, da beide ähnliche Zielstrukturen und Wirkmechanismen haben.^[4] So bleiben selbst Antibiotika der letzten Instanz, wie Vancomycin,^[5] Synercid™ (Dalfopristin, Quinopristin)^[6] bzw. Linezolid^[7] oft ohne Wirkung.^[8] Der starke Aufschwung von Antibiotika-Resistenzen wurde deshalb im Rahmen des „World Health Reports 2007“ der „Welt-Gesundheitsorganisation“ (WHO), als eine der drei größten Bedrohungen der menschlichen Gesundheit eingestuft.^[9] Die drei wichtigsten Klassen antibiotika-resistenter, z.T. fataler Pathogene sind in diesem Zusammenhang der methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA),^[10] multi-resistente bzw. pan-resistente Gram-negative Prokaryoten wie z.B. *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*,^[11] sowie multi- oder extensiv-resistente Stämme von *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB, XDR-TB).^[12] Trotz der deutlichen Zunahme resistenter Pathogene, ist die industrielle Forschung und Entwicklung neuer Antibiotika bzw. Antibiotika-Klassen rückläufig.^[1a, 13] Ein Grund für diesen rückläufigen Trend ist die Tatsache, dass trotz der bemerkenswerten Fortschritte in kombinatorischer Chemie, Genomik, und Hochdurchsatzanalysen nur sehr wenig neue antibakterielle Verbindungen, im Sinne neuer Stoffklassen oder Leitstrukturen, gefunden werden konnten.^[13a, 14] Gerade die in vielen Bereichen der Medizinalchemie erfolgreichen, Zielstruktur-basierten Hochdurchsatz-Analysen, zeigen bei

Infektionskrankheiten bemerkenswert geringen Erfolg.^[15] Die Bereitstellung neuer, effektiver Antibiotika ist Anbetracht der wachsenden mikrobiellen Bedrohung jedoch zwingend notwendig. Eine offizielle Reaktion darauf ist die so genannte „10 × 20“-Initiative der amerikanischen Gesellschaft für Infektionskrankheiten (IDSA), mit dem Ziel der Entwicklung von 10 neuen, sicheren und effektiven Antibiotika bis 2020.^[14, 16]

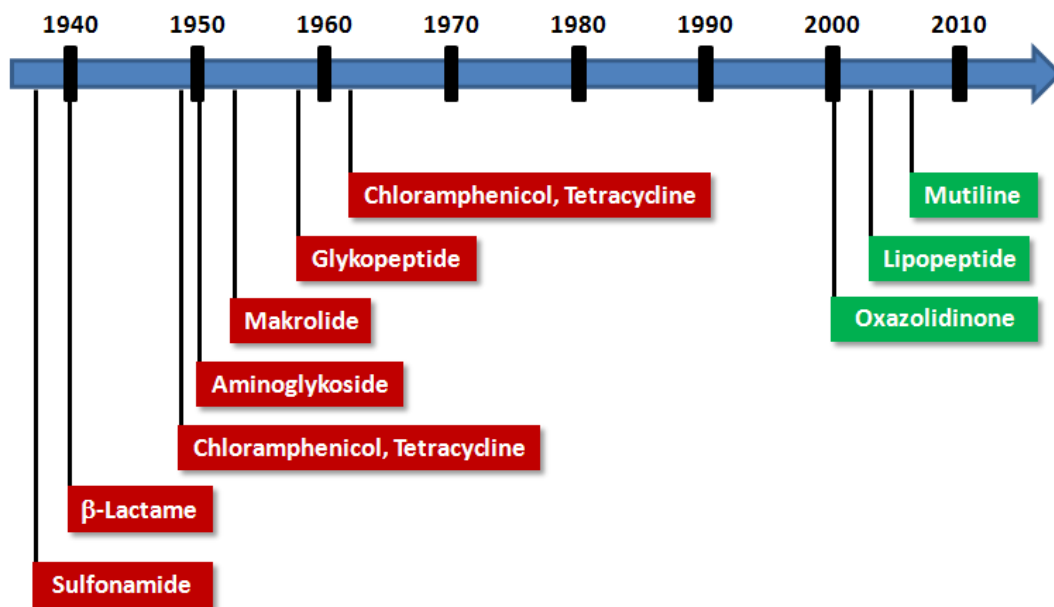


Abbildung 1.1: Einführung neuer Antibiotika-Klassen zwischen 1930 und 2010. Zwischen 1962 und 2000 wurden keine neuen Klassen eingeführt (Innovationslücke). Abbildung verändert nach Fischbach *et al.*^[17]

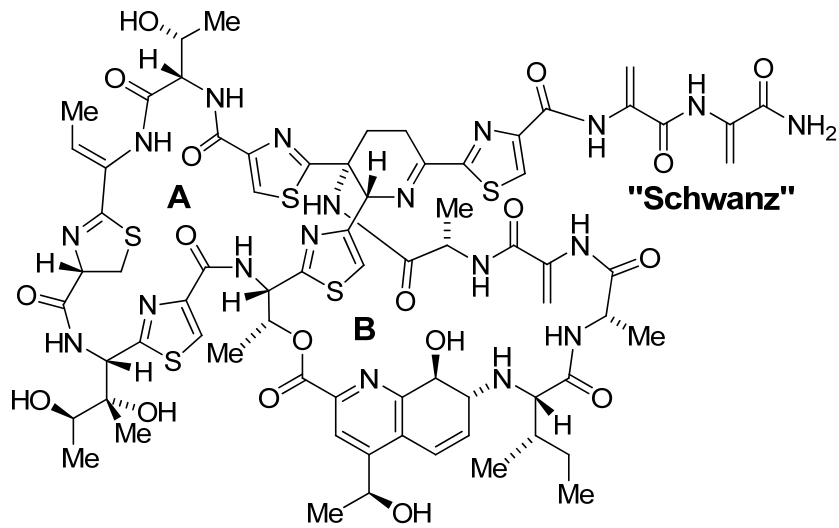
Antibiotika-Resistenzen sind eine hochspezifische Reaktion auf einen Selektionsdruck und unvermeidlich mit dem Gebrauch von Antibiotika verbunden. Ein vergleichbarer Selektionsdruck, nämlich der konkurrierender Organismen, führt auch zur Entwicklung von hochoptimierten antimikrobiellen Wirkstoffen in der Natur. Interessanterweise sind nur ca. 1% der bekannten organischen Verbindungen Naturstoffe.^[13a] Trotzdem basiert eine Vielzahl verkaufter Medikamente auf Naturprodukten bzw. Derivaten davon.^[18] Die chemische Diversität und Komplexität von Naturstoffen, sowie deren hohe Zielstrukturspezifität und -affinität, kann durch chemisches *de novo* Design nicht leicht erreicht werden. Beispiele gibt es dennoch z.B. Sulfonamide, Quinolone, Oxazolidinone. Naturstoffe können in diesem Zusammenhang nicht nur als chemische Leitstruktur, sondern auch als Wegweiser zu pharmakologisch bisher unerschlossenen Zielstrukturen dienen.^[13a] Eine in diesem

Zusammenhang vielversprechende Naturstoffklasse sind die Thiopeptidantibiotika (Kapitel 1.2), welche erstmals mit der Isolierung von Micrococcin (1948)^[19] und ihrem berühmtesten Vertreter Thiostrepton (1954)^[20] beschrieben wurden. Diese schwefelreichen und hochmodifizierten Makrozyklen besitzen eine bemerkenswerte (z.T. nanomolare) antibiotische Aktivität gegen klinische relevante Gram-positive Prokaryoten u.a. gegen MRSA, Vancomycin-resistente Enterococcen sowie *Mycobacterium tuberculosis*.^[21] Thiopeptide entfalten ihre antibiotische Wirksamkeit in der Inhibition eines der fundamentalsten Prozesse der bakteriellen Zelle, der Proteinbiosynthese (Kapitel 1.3). Der charakteristische Wirkungsmechanismus am bakteriellen Ribosom, die bemerkenswerte chemische Struktur, sowie das enorme antibiotische Potenzial der Thiopeptide, macht diese Stoffklasse für die biologische, chemische und pharmazeutische Forschung gleichermaßen relevant. In der vorliegenden Arbeit sollten, nach einem kurzen Exkurs in die die chemische Natur der Thiopeptide, die biologischen und pharmakologischen Aspekte dieser bemerkenswerten Substanzen untersucht werden.

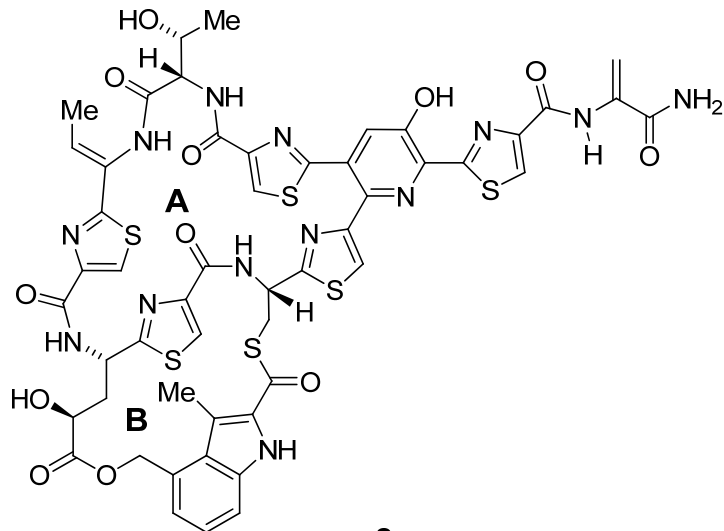
1.1 Thiopeptidantibiotika

1.1.1 Struktur und Klassifizierung

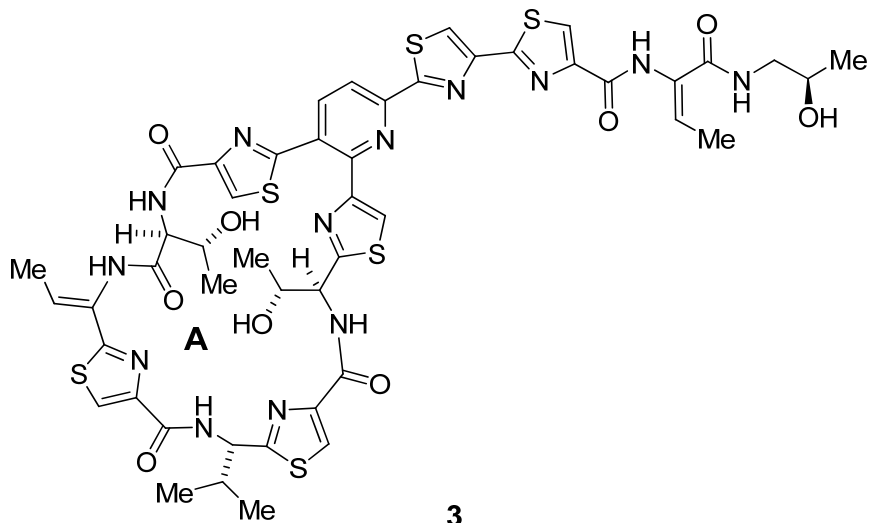
Thiopeptidantibiotika sind eine große Gruppe (>80 Mitglieder) schwefelreicher, hochmodifizierter, makrozyklischer Peptide, welche sich durch einige charakteristische Strukturmerkmale auszeichnen.^[22] Auffällig für alle Thiopeptide ist ihre beträchtliche Größe (1-2 kDa), sowie der Mangel an Löslichkeit-vermittelnden funktionalen Gruppen. Zentrales Element ist ein tri- oder tetrasubstituierter stickstoffhaltiger Heterozyklus, welcher den Ursprung eines mono- oder bis-makrozyklischen Gerüsts bildet, dass sich aus heterozyklischen Elementen (Thiazol(in)e, Oxazole, Indole, Quinaldinsäure) und Dehydroaminosäuren, sowie einem azyklischen Molekülschwanz (Dehydroaminosäuren), aufbaut. Die Thiopeptide wurden anhand ihrer Struktur und der Oxidationsstufe des N-Heterozyklus (Piperidin, Dehydropiperidin, Dihydroimidazopiperidin, trisubstituiertes Pyridin oder Hydroxypyridin) in fünf Familien (A bis E) unterteilt.^[22] Eine umfassende Übersicht über die Geschichte, Strukturen und Chemie der einzelnen Thiopeptidfamilien lieferten Bagley *et al.* (2005).^[22]



1



2



3

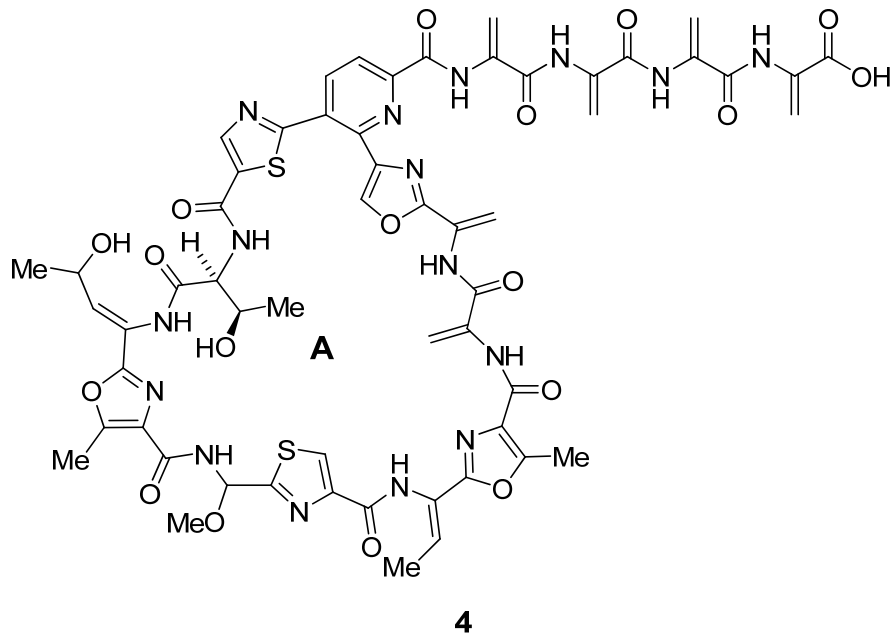


Abbildung 1.2: Chemische Strukturen der Thiopeptidantibiotika Thiostrepton (**1**), Nosiheptid (**2**), Micrococcin (**3**) und Promioicin (**4**). Wichtige Ringsysteme und Strukturen sind markiert.

Im Folgenden soll auf die Struktur einiger wichtiger Vertreter der Thiopeptide genauer eingegangen und die strukturelle Vielfalt skizziert werden. Ein repräsentativer Vertreter der Thiopeptidfamilie B und der meist-studierte Vertreter sämtlicher Thiopeptide ist Thiostrepton (**1**, Abbildung 1.2).^[20] Ausgehend vom Dehydropiperidin-Kern besteht dieses Molekül aus einem thiazol(in)-reichen Makrozyklus A (im Folgenden nur noch als A-Ring bezeichnet), einem über die charakteristische 8-Hydroxy-Quinaldinsäure-Einheit verknüpften Makrolacton (B-Ring) sowie einem azyklischen Molekülschwanz, bestehend aus einer Thiazol- und zwei Dehydroalanin-Einheiten.^[20, 23] Micrococcin (**3**), das erste beschriebene Thiopeptid,^[19, 24] gehört zur strukturell vielfältigsten Thiopeptidfamilie C^[22] und zeichnet sich durch den Besitz eines zentralen trisubstituierten Pyridin-Kern aus, welcher den Ursprung eines, sonst sehr gut mit **1** vergleichbaren, thiazolreichen A-Rings, darstellt. Der azyklische Molekülschwanz von **3** zeigt im Unterschied zu **1**, zwei Thiazoleinheiten und eine Dehydrobutyrin-Einheit. Eine B-Ring-Struktur existiert nicht. Nosiheptid (**2**)^[25] gehört aufgrund seines Hydroxypyridin-Kerns in die Thiopeptidfamilie E.^[22] Neben dem, mit **1** und **3** vergleichbaren A-Ring, besitzt **2** einen weiteren Makrozyklus (B-Ring). Die Besonderheit dieser Struktur ist die, für die Thiopeptidfamilie E ebenfalls typische Indol-Einheit, welche im Fall von **2** über eine Ester- und eine Thioester-Funktion, an den A-Ring geknüpft ist. Im

Unterschied zu **1** ist der B-Ring von **2** zusätzlich deutlich kleiner und nicht an den N-Heterozyklus gebunden. Der azyklische Molekülschwanz ist dem von **1** sehr ähnlich, trägt jedoch nur eine Dehydroalanin-Einheit. Promoinducin (**4**)^[26] gehört wie auch **3**, aufgrund des trisubstituierten Pyridin-Kerns in die Thiopeptidfamilie C.^[22] Im Unterschied zu **3** zeigt **4** jedoch einen deutlich vergrößerten A-Ring (26 bzw. 35 Atome) mit drei Oxazol-Einheiten sowie zwei Dehydroalanin-Einheiten. Der azyklische Molekülschwanz trägt hier keine Thiazol-, jedoch vier Dehydroalanin-Einheiten. **4** besitzt, wie auch **3**, keinen B-Ring.

1.1.2 Biosynthese

Thiopeptidantibiotika werden als Sekundärmetabolite von verschiedenen Gram-positiven Prokaryoten produziert, vor allem von Mycelien-bildende, sporenbildenden Bakterien der Gattung *Streptomyces* wie *S. azureus/laurentii* (**1**) oder *S. actuosus/antibioticus* (**2**). Darüberhinaus werden Thiopeptide von einigen Vertretern der Gattungen *Bacillus* (*B. cereus* (**3**)), *Staphylococcus* und *Micrococcus* biosynthetisiert.^[22] Die Biosynthese der Thiopeptide wurde lange kontrovers diskutiert. Pionierarbeiten leistete in diesem Zusammenhang Floss *et al.*, der die strukturellen Elemente von **1** und **2** auf Standard-Aminosäuren zurückführen konnte.^[27] Die der Biosynthese zugrundeliegende Enzymmaschinerie blieb jedoch unbekannt. Generell können peptidische Sekundärmetabolite in der Natur über zwei fundamentale Prozesse aufgebaut werden.^[28] Zum einen können genetisch kodierte und ribosomal synthetisierte Vorläuferpeptide über eine Reihe posttranslationaler Modifizierungen zum bioaktiven Sekundärmetabolit umgesetzt werden. Ein alternativer Weg ist die nicht-ribosomale Peptidsynthese, vermittelt über spezielle Enzymkomplexe, den so genannten nicht-ribosomalen Peptid-Synthetasen (NRPSs).^[28] In einem Fließband-artigen Prozess produzieren NRPSs hochmodifizierte Peptide, welche sich oft durch einen hohen Gehalt nicht-proteinogener Aminosäuren auszeichnen. In Anbetracht der komplexen Struktur der Thiopeptide war der letztere Prozess als Biosynthesemechanismus naheliegend. Die erst kürzlich (2009) entdeckten Biosynthesewege verschiedener Thiopeptide zeigten jedoch, dass die Moleküle überraschenderweise ribosomal synthetisiert werden.^[29] Die 50-60 Aminosäuren-langen Präpeptide (TrsA) werden hierbei zunächst von einer ca. 40 Aminosäuren langen Leitsequenz befreit und die verbleibenden Aminosäuren in die entgültige Thiopeptidstruktur überführt. Der Grad der hierfür notwendigen posttranslationalen Modifizierung und dementsprechend die Zahl der, in die Biosynthese

involvierten, Enzyme ist sehr groß.^[29-30] Die Kenntnis der Biosynthesewege ist von grundlegender Wichtigkeit für Optimierungs- und Manipulationsschritte im Rahmen der Biotechnologie und kombinatorischen Biosynthese. Erste Manipulationen der Biosynthese des Thiopeptid Thiocillin, erlaubten bereits die Herstellung von Derivaten, mit dem gezielten Austausch einzelner Aminosäurebausteine.^[30c, 31]

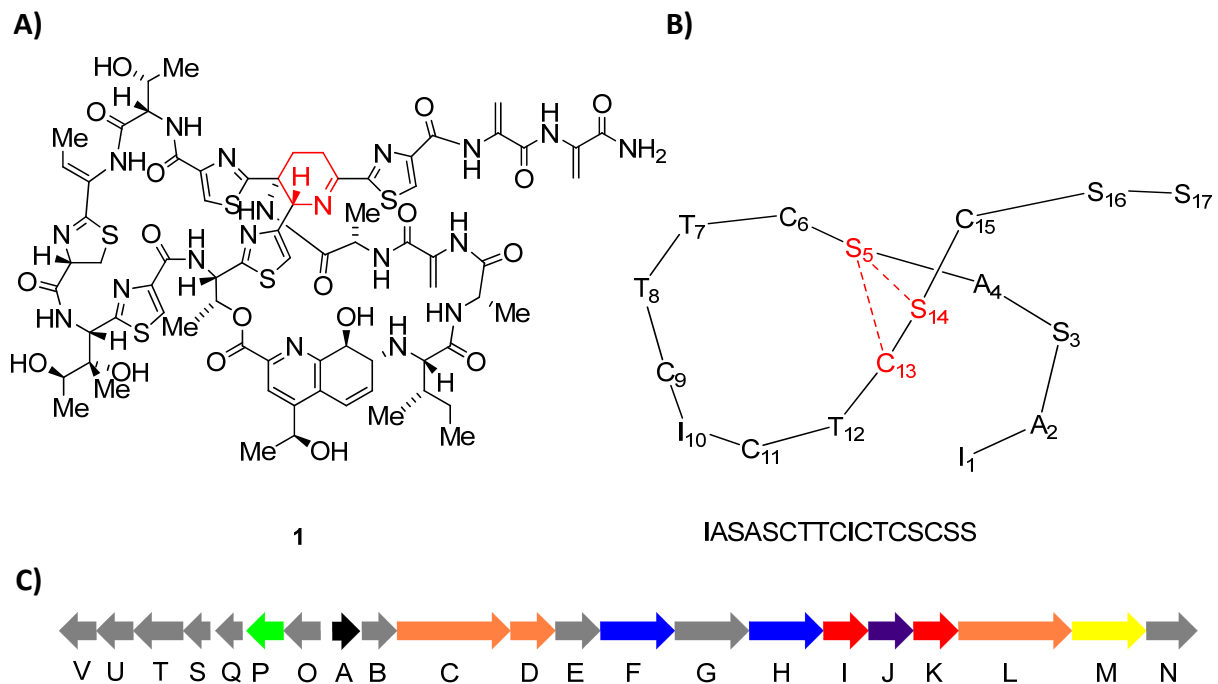


Abbildung 1.3: Biosynthese von Thiostrepton **1**. A) Chemische Struktur von **1**. B) TrsA nach Entfernung der Prä-Sequenz. Die Lage der Aminosäuren entspricht der im Naturstoff. Die für die Bildung des zentralen Dehydropiperidinkerns verwendeten Aminosäuren sind rot markiert. C) Architektur des Thiostrepton Biosynthese-Clusters tsrA-V. (Blau: Heterozyklisierung; Grün: Methyltransferase; Schwarz: Präpeptid; Orange: Dehydratase; Rot: Cytochrome P450; Gelb: Radikal SAM-abhängiges Protein; Violett: Adenyltransferase Grau: Oxygenasen, Amido-, Aminotransferasen und unbekannte Enzyme). Verändert nach Kelly *et al.*^[29c, 30b]

1.1.3 Biologische Aktivitäten

1.1.3.1 Translationsinhibition

Die Entwicklung klinisch-relevanter Wirkstoffe setzt ein exaktes Verständnis des Wirkungsmechanismus voraus. Wichtig sind hier zum einen die Identifizierung der zellulären Zielstruktur, sowie eine eingehende Charakterisierung der Bindestelle und des

Bindungsmodus an der Zielstruktur. Bei Antibiotika ist darüberhinaus ein Verständnis möglicher und akuter Resistenzmechanismen von fundamentaler Bedeutung. Die biologische Aktivität von Thiopeptidantibiotika ist äußerst vielfältig. Die wichtigste Aktivität ist hierbei die **Inhibition der bakteriellen Proteinbiosynthese**, welche in der vorliegenden Arbeit besonders untersucht wird (Kapitel 3 - 6).^[22] Thiopeptide zeigen in diesem Zusammenhang zwei verschiedene Inhibitionsmechanismen. Der Hauptteil der bekannten Thiopeptidantibiotika bindet hierbei direkt an das bakterielle Ribosom, genauer an einen Komplex der 23S rRNA und des ribosomalen Proteins L11, welcher einen Teil der so genannten GTPase-assoziierten Region des Ribosoms darstellt. Die Thiopeptide interferieren dort mit der Aktivität ribosomaler GTPasen (Kapitel 1.2.3-5).^[22, 32] Es handelt sich um die einzige Antibiotikaklasse welche diese ribosomale Zielstruktur ansteuert, was Thiopeptide für die pharmazeutische Wirkstoffentwicklung besonders interessant macht: Kreuzresistenzen mit bekannten Antibiotika können so gar nicht auftreten. Ein weiterer Angriffspunkt einiger Thiopeptide in der prokaryotischen Proteinbiosynthese ist der ribosomale Elongationsfaktor EF-Tu. Moleküle wie z.B. GE2270A binden direkt an die GTP-gebundene Form des Faktors und inhibieren so die Einschleusung der tRNAs in das Ribosom.^[22, 32a, 33] Die grundlegenden Mechanismen der prokaryotischen Proteinbiosynthese werden zusammen mit dem molekularen Wirkungsmechanismus der Thiopeptide am Ribosom, in Kapitel 1.2 genauer vorgestellt.

1.1.3.2 *TipA*-Regulation

Actinomyceten zeigen sehr oft multiple Antibiotika-Resistenzen. Neben Antibiotika-spezifischen Exportproteine bzw. inaktivierender Enzyme besitzen diese Organismen häufig charakteristische Transkriptionsregulatoren, welche die Anwesenheit bestimmter Antibiotika wahrnehmen und so Verteidigungsstrategien oder andere Regulationswege aktivieren.^[34] Die Anwesenheit von Thiopeptiden aktiviert bei einigen nicht-Thiopeptid-produzierenden Streptomyceten wie *S. lividans* interessanterweise die Expression von Resistenz-Genen gegen eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher Antibiotika, gepaart mit der Anreicherung zweier so genannter Thiostrepton-induzierter Proteine, TipAL („long“ 253 Aminosäuren) und TipAS („short“, 144 Aminosäuren).^[35] TipAS entspricht hierbei der C-terminalen Ligandenbindedomäne von TipAL und ist für die mäßige Thiopeptidresistenz dieser Streptomyceten verantwortlich. Beide Proteine werden ausgehend von demselben Gen

(*TipA*) im selben Leserahmen über unterschiedliche Startcodons synthetisiert. TipAS bindet Thiopeptide interessanterweise kovalent durch eine selektive *Sulfa*-1,4-Addition eines zentralen Cysteins an den charakteristischen azyklischen Dehydroaminosäure-Schwanz des Thiopeptid-Liganden und inaktiviert so dessen Wirksamkeit.^[36] TipAL besitzt im Gegensatz zu TipAS zusätzlich eine Dimerisierungs- sowie eine DNA-Bindedomäne.^[37] Die kovalente Bindung eines Thiopeptids führt so zunächst zu einer Dimerisierung zweier TipAL-Proteine und im Anschluss, über die Bindung an den so genannten *TipA*-Promotor, zur Rekrutierung der RNA-Polymerase II und einer Expression von mindestens 10 verschiedenen Proteinen.^[38] Zwei dieser Proteine sind, entsprechend einer positiven Rückkopplungsschleife, TipAS und TipAL. Die restlichen Proteine sind bislang nicht analysiert bzw. nicht in der Literatur beschrieben worden. Sie müssen jedoch, wie bereits erwähnt, eine Rolle für die Breitband-Antibiotika-Resistenz einiger Streptomyceten spielen, da die Anwesenheit von Thiostrepton (**1**), Resistenzen gegen eine Vielzahl verschiedener Antibiotika induziert.^[39] Aufgrund seiner molekularen Spezifität ist die Nutzung des *TipA*-Promotorsystems in der *Streptomyces*-Biotechnologie weit verbreitet.^[40]

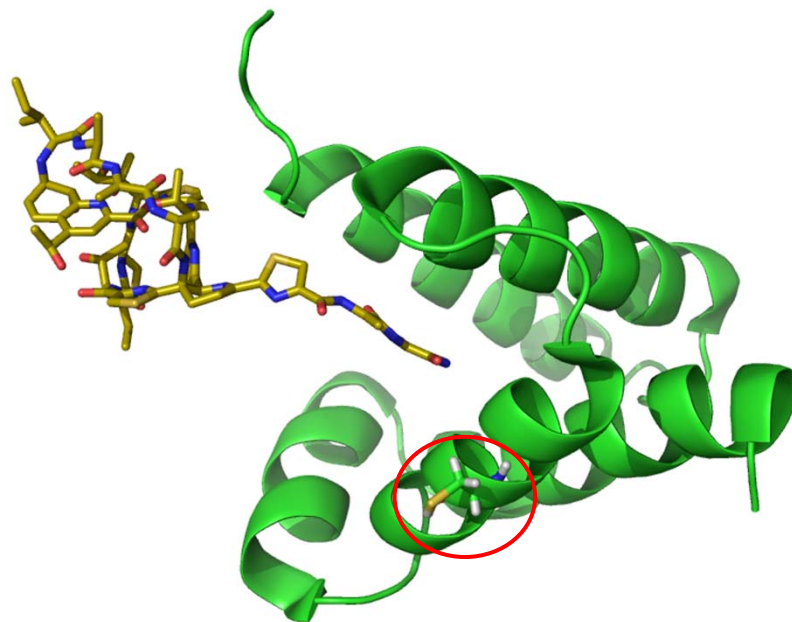


Abbildung 1.4: Modell der Bindung von Thiostrepton an das TipAS-Protein. Das reaktive Cystein 214 ist durch einen Kreis gekennzeichnet. Verändert nach Kahmann *et al.*^[37]

1.1.3.3 Eukaryotische Zielstrukturen

Neben der inhibitorischen Wirkung der Thiopeptid-Antibiotika auf die bakterielle Proteinbiosynthese zeigen einige Vertreter dieser Stoffklasse Wirksamkeit gegen eukaryotische Zelltypen. So wurden für das, strukturell sehr eng mit Thiostrepton verwandte Thiopeptid Siomycin, eine immunsuppressive Wirkung auf die T-Zell-abhängige wie auch unabhängige Antikörperproduktion von humanen und murinen B-Zellen beschrieben.^[41] Darüberhinaus zeigt **1** eine selektive, inhibitorische Wirksamkeit auf die Proliferation von Krebs-Zellen.^[42] Ein Zielpunkt der Inhibition scheint in diesem Zusammenhang die mitochondriale Proteinbiosynthese zu sein.^[42b] Diese Organellen besitzen, wie auch die pflanzlichen Plastiden, eine eigene Translationsmaschinerie, welche sehr eng mit der von Eubakterien verwandt ist.^[43] Neuere Studien von Gartel *et al.* legen jedoch die Existenz von weiteren Zielstrukturen nahe. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um das eukaryotische 80S Ribosom, bzw. entsprechende Faktoren, da Eukaryoten bzw. deren Ribosomen unempfindlich gegenüber Thiopeptiden sind.^[44] Das Thiopeptid Siomycin sowie **1** inhibieren sowohl die Expression (positive Rückkopplungsschleife)^[45] als auch die Transkriptionsaktivität des onkogenen Transkriptionsfaktors FoxM1 („forkhead box M1“)^[42c, 46] und induzieren so den programmierten Zelltod (Apoptose) von unterschiedlichen Krebszelllinien.^[46a, 46d, 47] Interessanterweise ist die Expression von FoxM1 in vielen unterschiedlichen Karzinomen stark hochreguliert.^[48] Die natürliche Aufgabe von FoxM1 besteht in der Regulierung einer Vielzahl von Genen, welche für die Zellproliferation sowie die Erhaltung der genomischen Stabilität wichtig sind. In differenzierten Zellen ist jedoch keine FoxM1 Expression und Aktivität mehr vorhanden.^[49] Eine direkte molekulare Interaktion von Thiopeptiden mit FoxM1 wurde aber noch nicht dokumentiert.

Eine weitere bemerkenswerte Aktivität von Thiopeptidantibiotika ist die Wachstumsinhibition des Malaria-Erregers *Plasmodium falciparum*. Für Thiostrepton (**1**) wurde dabei das Ribosom des plasmodialen Apicoplasten (rudimentärer Plastid) als Zielstruktur identifiziert.^[50] Die Blockierung der apicoplastidären Translation durch Antibiotika wie z.B. Clindamycin, ist ein effektiver Ansatzpunkt in der Antimalariatherapie.^[50a] Charakteristisch für die Wirkungsweise Ribosomen-gerichteter Antibiotika, ist deren relative spät einsetzende antiplasmodiale Wirkung, welche ca. vier Tage nach der Infektion der roten Blutzellen einsetzt („delayed death effect“).^[51] Beim Einsatz von Thiostrepton (**1**) wurde ein solcher „delayed death effect“ nie beobachtet und

die Gründe für diesen abweichenden Wirkmechanismus sind unverstanden.^[51a] Diese Indizien weisen ebenfalls in Richtung weiterer eukaryotischer Zielstrukturen (siehe hierzu Kapitel 7).

1.2 Inhibierung der prokaryotischen Translation durch Thiopeptidantibiotika

Die prokaryotische Proteinbiosynthese ist der Ansatzpunkt einer Vielzahl unterschiedlicher Antibiotika.^[13a, 52] Auch die Thiopeptidantibiotika interferieren mit diesem fundamentalen Prozess und dies interessanterweise in verschiedenen Phasen der Translation. Um die molekulare Wirkungsweise dieser Verbindungen zu verstehen, soll hier der bakterielle Translationsmechanismus näher betrachtet werden.

Ribosomale Funktion	Antibiotikafamilie	Bindestelle
Initiation	Aminoglycoside	30S Untereinheit
	Oxazolidinone	50S Untereinheit
Dekodierung bzw. tRNA-Bindung	Aminoglycoside (Streptomycin, Paromomycin)	30S Untereinheit
	Tetracycline	
Peptidyltransferasezentrum	Chloramphenicol	50S Untereinheit
	Lincosamide	
	Streptogramin _A Pleuromutiline	
Blockade des Peptidtunnels	Makrolide	50S Untereinheit
	Azalide	
	Ketolide Streptogramin _B	
Reduzierung der Ribosomen-Mobilität	Aminoglycoside (Spectinomycin, Hygromycin B)	30S Untereinheit
	Edeine	
	Pactamycin	
Translokation	Makrolide	50S Untereinheit
	Polypeptid-Antibiotika (Viomycin)	

Tabelle 1.1: Auflistung verschiedener Antibiotika und ihrem Wirkmechanismus am prokaryotischen 70S Ribosom. Verändert nach Yonath *et al.*^[52b-d]

1.2.1 Das Ribosom

Entsprechend dem von Francis Crick (1970) formulierten zentralen „Dogma der Molekularbiologie“,^[53] wird die genetische Information in Zellen im Allgemeinen von der DNA über RNA zu Protein umgesetzt.^[57] Ausnahmen sind bekannt.^{[54][55][56]} Der letzte Syntheseschritt dieses sequentiellen Informationsflusses wird vom Ribosom ermöglicht. Es handelt sich hierbei um eine komplexe molekulare Maschine, welche die auf der mRNA kodierte genetische Information nutzt, um die Synthese einer entsprechenden Sequenz von Aminosäuren durchzuführen. Zentral für diesen Prozess sind Nukleinsäure-Aminosäure-Hybride, die so genannten tRNAs. Diese Moleküle sind molekulare Adapter, welche auf der einen Seite ein zum entsprechenden Basentriplett auf der mRNA (Codon) komplementäres Anticodon und auf der anderen Seite (CCA-Ende) eine für das entsprechende Codon spezifische, kovalent angeknüpfte Aminosäure tragen. Die Aminosäure ist hierbei mit der 3'-Hydroxylgruppe der Adenosin-Ribose verestert. Die Rolle des Ribosoms besteht nun darin, ein Ablesen der mRNAs im korrekten Leserahmen, sowie eine sequentielle und korrekte Hybridisierung der tRNA-Anticodone mit den mRNA-Codons zu ermöglichen.^[58]

Ribosomen sind multiple Ribonukleoproteinkomplexe. Entsprechend der Sedimentationsrate können prokaryotische 70S und eukaryotische 80S Ribosomen unterschieden werden. Das Ribosom aller Organismen besteht aus zwei ungleich großen Untereinheiten. Für Prokaryoten handelt es sich hierbei um die große ribosomale 50S Untereinheit (60S in Eukaryoten) und die kleine 30S Untereinheit (40S in Eukaryoten). Die 50S Untereinheit des prokaryotischen Ribosoms (*Escherichia coli*) besteht aus zwei RNAs (rRNAs), der 23S rRNA (2900 nt) und der 5S rRNA (120 nt), sowie 33 unterschiedlichen Proteinen (L-Proteine, „large“). Die 30S Untereinheit enthält nur eine RNA (16S rRNA) und 21 Proteine (S-Proteine, „small“). 2/3 der ribosomalen Masse von 2,5 MDa besteht hierbei aus rRNA.^[58a, 59] Die Kenntnis über die Struktur des 70S Ribosoms sowie seiner Bestandteile ist durch elektronenmikroskopische wie auch röntgenkristallographische Analysen in den letzten Jahren immer besser geworden.^[59-60] Viele Strukturuntersuchungen freier 70S Ribosomen oder ribosomaler Untereinheiten in unterschiedlichen Zuständen der Translation oder ihre Komplexe mit Antibiotika^[52] und seit kurzem auch ribosomaler Faktoren,^[61] lieferten ein immer besser werdendes molekulares Bild grundlegender ribosomaler Strukturen und Prozesse.^[59, 60b] Für die fundamentale Bedeutung dieser Arbeiten wurde der letztjährige Nobelpreis in Chemie (2009) an Ramakrishnan (Cambridge U, UK), Steitz (Yale U, USA) und

Yonath (Weizman Institut, Israel) für die Erforschung der ribosomalen Struktur und Funktion verliehen. Die ribosomale 30S Untereinheit des Ribosoms gliedert sich klassisch in die drei Bereiche „Körper“, „Kopf“ und „Plattform“, welche gleichzeitig auch die drei strukturellen Domänen der 16S rRNA darstellen (Abbildung 1.5).^[59]

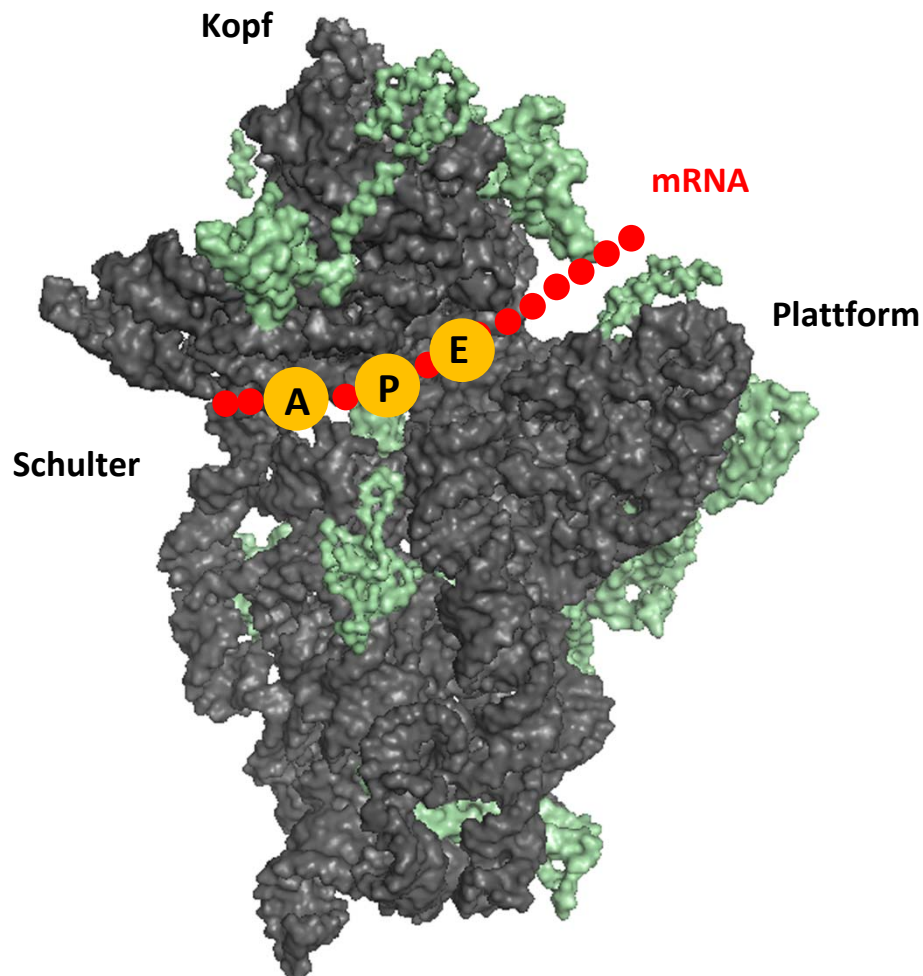


Abbildung 1.5: Darstellung der ribosomalen 30S Untereinheit aus *Thermus thermophilus* auf Basis der Kristallstrukturdaten aus Schluenzen *et al.* (PDB: 1fka).^[62] Relevante Strukturen sind markiert. Verändert nach Yonath *et al.*^[52d]

Die 30S Untereinheit enthält das so genannte Dekodierungszentrum des Ribosoms d.h. die Region, in der mRNA Codons erkannt und über die tRNA Anticodons entziffert werden, sowie die für die initiale Fixierung der mRNA notwendige Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz (3'-Ende der 16S rRNA).^[58a, 59] Bei der 50S Untereinheit lassen sich strukturell die abgerundete Basis, sowie drei davon ausgehende Protuberanzen unterscheiden: die zentrale Protuberanz,

der L1-Stiel sowie der so genannte L7/L12-Stiel, einem pentameren L10·(L7/L12)-Komplex (Abbildung 1.7).

Die zentrale Protuberanz enthält das Peptidyltransferasezentrum des Ribosoms, einer 90 nt langen, universalen „symmetrischen Region“ der 23S rRNA, in der die Aminosäureverknüpfung (Kapitel 1.2.2) stattfindet, sowie den Peptid-Ausgangstunnel, durch welchen das wachsende Peptid nach außen entlassen wird.^[60b]

Bei dem L7/12-Stiel sowie dem L1-Stiel handelt es sich um sehr flexible Regionen der 50S Untereinheit, welche auf entgegengesetzten Seiten der 50S Untereinheit liegen. Der L7/L12-Stiel spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion des Ribosoms mit ribosomalen GTPasen und ist somit auch für die tRNA-Rekrutierung zur A-Position von Wichtigkeit.^[58a] Er wird zusammen mit dem Komplex der 23S rRNA und dem ribosomalen L11-Protein (der so genannten Stielbasis), sowie der Sarcin-Ricin-Schleife, als GTPase-assoziierte Region des Ribosoms bezeichnet (Kapitel 1.2.2 u. 1.2.3).^[58a]

Der L1-Stiel spielt eine wichtige Rolle bei Freisetzung deacetylierter tRNAs aus der E-Position des Ribosoms.^[63] Im translationsaktiven 70S Ribosom werden darüberhinaus drei wichtige Positionen bzw. Bindestellen für die tRNA unterschieden. Die in der Nähe des L7/L12-Stiels befindliche Akzeptor-Position (A-Position, „A-site“), ist für die Rekrutierung einer neuen und zum entsprechenden Codon der mRNA an dieser Position passenden Aminoacyl-tRNA verantwortlich. Die Peptidyl-Position (P-Position, „P-site“) beherbergt die Peptidyl-tRNA vor der Bildung der neuen Peptidbindung. Diese tRNA trägt die wachsende Polypeptidkette. Die Entlassungs-Position (E-Position, „E-site“) ist der Ausgang der deacetylierten tRNA aus dem Ribosom. Die tRNAs passieren diese drei Positionen sequentiell, jeweils von der A-Position über die P-Position zur E-Position (Abbildung 1.6).^[58a]

1.2.2 Proteinbiosynthese in Prokaryoten

Der Mechanismus der Proteinbiosynthese bzw. Translation ist der Inhalt vieler biochemischer Lehrbücher und Thema einer Vielzahl von Übersichtsartikeln.^[58a, 60b] Der Prozess gliedert sich bei Pro- und Eukaryoten in drei Grundschritte, welche im Folgenden kurz für das bakterielle System (*E. coli*) beschrieben werden:

A) Initiierung^[64]

Das inaktive prokaryotische Ribosom liegt in seine beiden Untereinheiten zerlegt vor. Bei der Translationsinitiierung bindet nun zuerst die mRNA an die 30S Untereinheit. Hierbei interagiert eine, sich in der 5'-untranslatierten Region befindliche, Sequenz, die so genannte Shine-Dalgarno-Sequenz, mit einer komplementären Sequenz in der 30S Untereinheit (Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz, *vide supra*) und positioniert so das AUG-Startcodon der mRNA in der P-Position der 30S Untereinheit. Der so genannte Initiationsfaktor 3 (IF-3), ein nicht-ribosomales Helferprotein, verhindert während dieser Zeit eine Assoziation der beiden ribosomalen Untereinheiten und kontrolliert die Codon-Anticodon-Paarung an der P-Position. Die erste Aminoacyl-Initiator-tRNA (Formylmethionin-tRNA) wird als Komplex mit dem Initiationsfaktor 2 (einer GTPase)^[65] und GTP zur 30S Untereinheit transportiert. Nach der korrekten Hybridisierung des tRNA-Anticocon mit dem mRNA Codon der P-Position, hydrolysiert IF-2 die gebundene GTP-Einheit, durchläuft eine Konformationsänderung und dissoziiert ab. Die Funktion des dritten Initiationsfaktors IF-1 ist noch weitgehend unverstanden. Es wurde jedoch eine Rolle in der Blockierung der A-Position (an der er direkt bindet) der freien 30S-Untereinheit sowie eine Rolle in der Assoziation der beiden ribosomalen Untereinheiten postuliert.^[66] Der Komplex aus 30S Untereinheit, mRNA, tRNA in P-Position sowie Initiationsfaktoren, wird als Prä-Initiationskomplex bezeichnet.^[58a]

B) Elongation^[58a, 67]

Nach der Ab-Dissoziation von IF-1 + 3 assoziieren die beiden ribosomalen Untereinheiten und der zweite Translationsschritt, die so genannte Elongation, beginnt. Die nächste Aminoacyl-tRNA wird als Komplex mit dem Elongationsfaktor Tu (EF-Tu, ebenfalls eine GTPase)^[65] zum Ribosom transportiert. Nach der erfolgreichen Dekodierung des Anticodons der Aminoacyl-tRNA im Dekodierungszentrum entlässt EF-Tu nach GTP-Hydrolyse die tRNA in ribosomale A-Position (Akkommodation). Die Aminosäuren der beiden Aminoacyl-tRNAs in A- und P-Position reichen rotationssymmetrisch in das so genannte Peptidyltransferase-Zentrum der 50S Untereinheit.^[68] Dieser Zustand des Ribosoms wird als so genannter Prä-Translokationszustand (PRÄ) bezeichnet. Bemerkenswert ist, dass das Peptidyltransferase-Zentrum, das aktive Zentrum des Ribosoms, ausschließlich aus rRNA besteht. Das Ribosom ist somit im Grunde ein RNA-Enzym, oder Ribozym.^[58a]

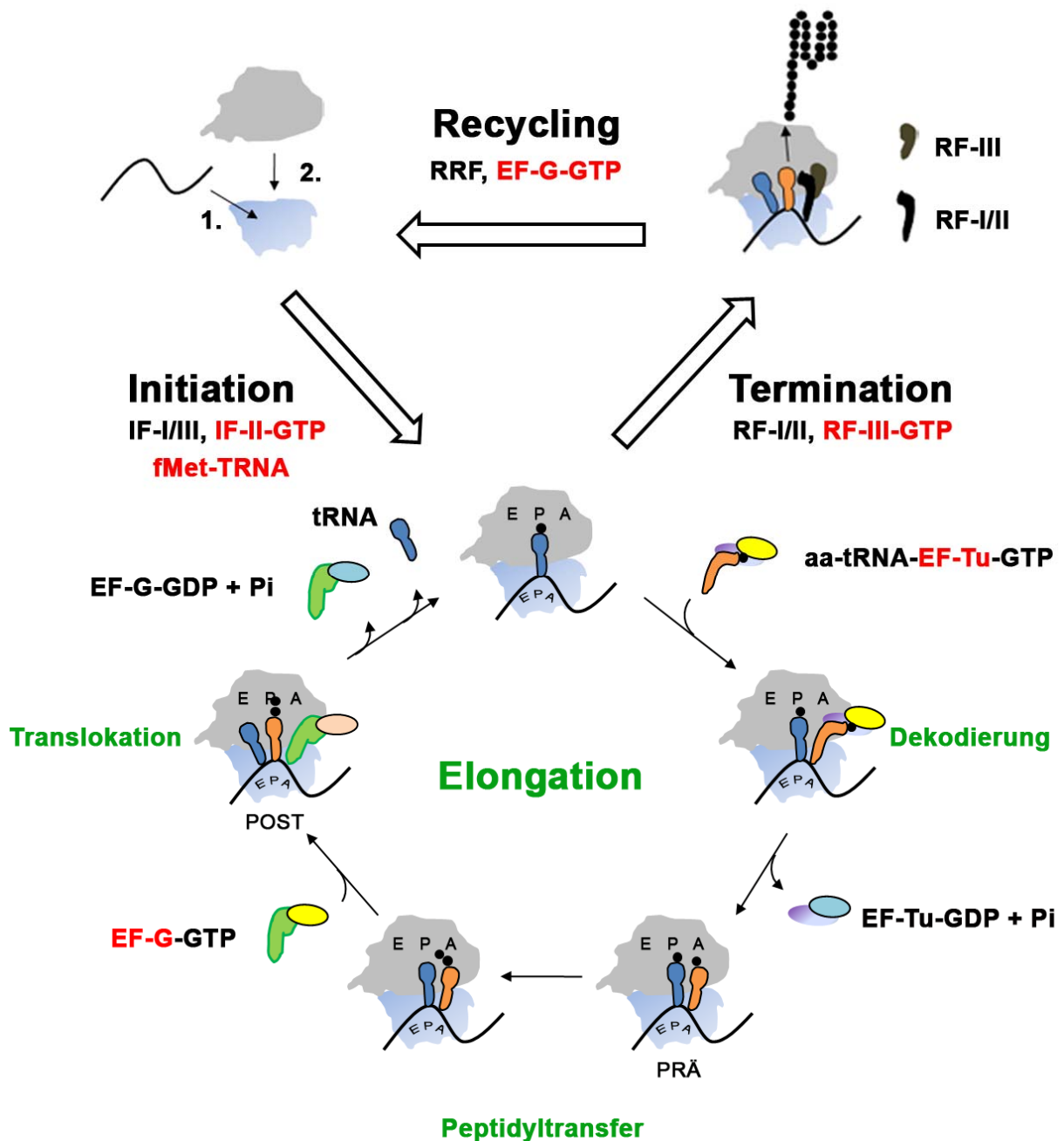


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Grundschrte der prokaryotischen Proteinbiosynthese: Initiation, Elongation, Termination und Recycling. Die jeweils involvierten ribosomalen Faktoren mit GTPase-Aktivität sind rot hervorgehoben. Die Elongation ist zusätzlich in die Phasen Dekodierung, Peptidyltransfer und Translokation unterteilt (grün). Zu den Abkürzungen siehe Fließtext.

Im Peptidyltransferase-Zentrum greift nun die die α -Aminogruppe der Aminoacyl-tRNA in Position A die Carbonylgruppe der Formylmethionin- bzw. Peptidyl-tRNA in der P-Position an und führt so zur Ausbildung der Peptidbindung. Es wird in diesem Zusammenhang immer noch kontrovers diskutiert, worin hier der genaue katalytische Beitrag des Ribosoms liegt.

Gängige Modelle nehmen hier ein rein physikalisches Wirkprinzip an, bei dem das Ribosom für eine optimale räumliche Ausrichtung der Aminosäuren, geeignete Desolvatisierung sowie eine elektrostatische Abschirmung, sorgt.^[69] Die treibende Kraft der ribosomalen Katalyse wäre in diesem Zusammenhang eine Erniedrigung der Entropie der Aktivierung bei konstanter Enthalpie (Ribosom als entropische Falle).^[69a] Ein weiteres Modell bezieht die Existenz eines zusätzlichen chemischen Prinzips mit ein z.B. einer generellen Säure-Base-Katalyse. Signifikante Indizien für das letztere Prinzip fehlen jedoch.^[58a, 60b] In diesem Fall wird durch die Peptidyltransferase-Reaktion die entstehende Peptidkette auf die tRNA in der A-Position übertragen. Die Verschiebung der deacetylierten tRNA aus der P-Position zur E-Position sowie der Peptidyl-tRNA aus der A-Position zur P-Position, wird als Translokation bezeichnet. Der Prozess wird durch die Bindung und GTP-Hydrolyse eines zweiten Elongationsfaktors (EF-G, ebenfalls eine GTPase) ausgelöst, welcher strukturell (Domänen 3 bis 5) interessanterweise an die tRNA des EF-Tu-GTP-tRNA Komplexes erinnert.^[58a, 67] EF-G interagiert hierbei sowohl mit der A-Position als auch mit dem L7/L12-Stiel des Ribosoms. Die EF-G-Bindung und GTP-Hydrolyse führen zu einer Ratschen-artigen Bewegung^[70] der 30S Untereinheit relativ zur 50S Untereinheit und weiteren Konformationsänderungen, welche die Verschiebung der tRNAs mit der mRNA bedingen.^[70a, 71] Das Ribosom befindet sich nun im Post-Translokationszustand (POST) und bereit für die Aufnahme der nächsten Aminoacyl-tRNA. Befindet sich vor der Bindung des EF-Tu-tRNA-Komplexes bereits eine weitere tRNA in Position E wird diese durch die Akkommodation der tRNA in der A-Position (*vide supra*) freigesetzt.^[58a]

C) Terminierung & Recycling^[72]

Das Ende einer Proteinsequenz wird durch ein so genanntes Stop-Codon (UGA, UAA, UAG) der mRNA in der A-Position des Ribosoms festgelegt. Diese Triplets werden von so genannten Klasse I Freisetzungsfaktoren (englisch „release factors“, RF) erkannt. RF-1 erkennt hierbei die Sequenzen UAA und UAG, RF-2 erkennt UAA und UGA. Die Klasse I RFs fungieren als Mimetika der tRNA, wobei die PA(V)T/SPF- und GGQ-Motive der RFs den dem Anticodon bzw. CCA-Ende der tRNA entsprechen.^[72c] Im Kontakt mit dem Peptidyltransferase-Zentrum positionieren sie wahrscheinlich ein H₂O-Molekül, welches durch einen nukleophilen Angriff an der Peptid-Carbonylgruppe („in-line attack“), die Freisetzung des Polypeptids auslöst (Post-Terminationszustand). Ein drittes Protein, RF-3

(Klasse II RF und GTPase)^[65] vermittelt im Anschluss an die Peptidhydrolyse, die Freisetzung der Klasse I RFs.^[72c, 73] Die Dissoziation der beiden ribosomalen Untereinheiten (Recycling) ist Aufgabe des Ribosomen-Recycling-Faktors (RRF). Auch der RRF zeigt eine sehr hohe strukturelle Ähnlichkeit zur tRNA und führt bei seinem Weg durch das Ribosom zu Konformationsänderungen, welche die Trennung der beiden ribosomalen Untereinheiten auslöst.^[74] Die Energie für die Beschleunigung dieses Separationsprozesses und die Freisetzung von RRF wird über eine GTP-Hydrolyse von EF-G bereitgestellt.^[75] Mit der abschließenden Bindung von IF-3 (siehe Initiation) an die 30S Untereinheit liegen die beiden Untereinheiten präpariert für die nächste mRNA vor.^[74]

1.2.3 Die 70S ribosomale GTPase-assoziierte Region

Die ribosomalen GTPasen (IF-2, EF-Tu, EF-G, RF-3) sind also an fast jedem Teilschritt der Proteinbiosynthese entscheidend beteiligt. Thiopeptidantibiotika wie Thiostrepton (**1**) und Micrococccin (**2**) interferieren mit der Aktivität jeder dieser GTPasen (IF2,^[76] EF-Tu,^[76d, 76g, 77] EF-G,^[78] RF-3^[79]). Kürzlich konnte auch für den Elongationsfaktor 4 (EF-4 oder LepA, eine GTPase)^[80] eine Inhibition durch Thiopeptide nachgewiesen werden.^[81] Die Moleküle erreichen diese Wirksamkeit durch die direkte Bindung an den einen Komplex der 23S rRNA mit dem ribosomalen Protein L11 (Kapitel 1.2.4), einem fundamentalen Bestandteil der ribosomalen GTPase-assoziierten Region (GAR). Die ribosomale GAR besteht insgesamt aus dem L7/L12-Stiel (L10·(L7/L12)₄; L7 ist die N-terminal acetylierte Form von L12), der Stielbasis (L11-23S rRNA-Komplex) und der Sarcin-Ricin-Schleife der 23S rRNA.^[58a, 82] Alle drei Bestandteile haben eine Bedeutung für die Stimulierung der GTP-Hydrolyse der ribosomalen GTPasen, eine Rolle vergleichbar zu den GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP) klassischer G-Proteine.^[58a, 83] Eine detaillierte Betrachtung der Interaktion von ribosomalen GTPasen mit der GAR lieferten Wilson und Nierhaus (2005).^[84] Die flexiblen L7/L12-Dimere des L7/L12-Stiels stellen eine Art Einfangmechanismus für die ribosomalen GTPasen dar und reichen diese zur Bindestelle (Sarcin-Ricin-Schleife,^[85] Stielbasis^[86]) am Ribosom weiter (Abbildung 1.4).^[83] Die genaue Funktion der Sarcin-Ricin-Schleife sowie der Stielbasis ist jedoch noch weitgehend unverstanden.^[58a, 84]

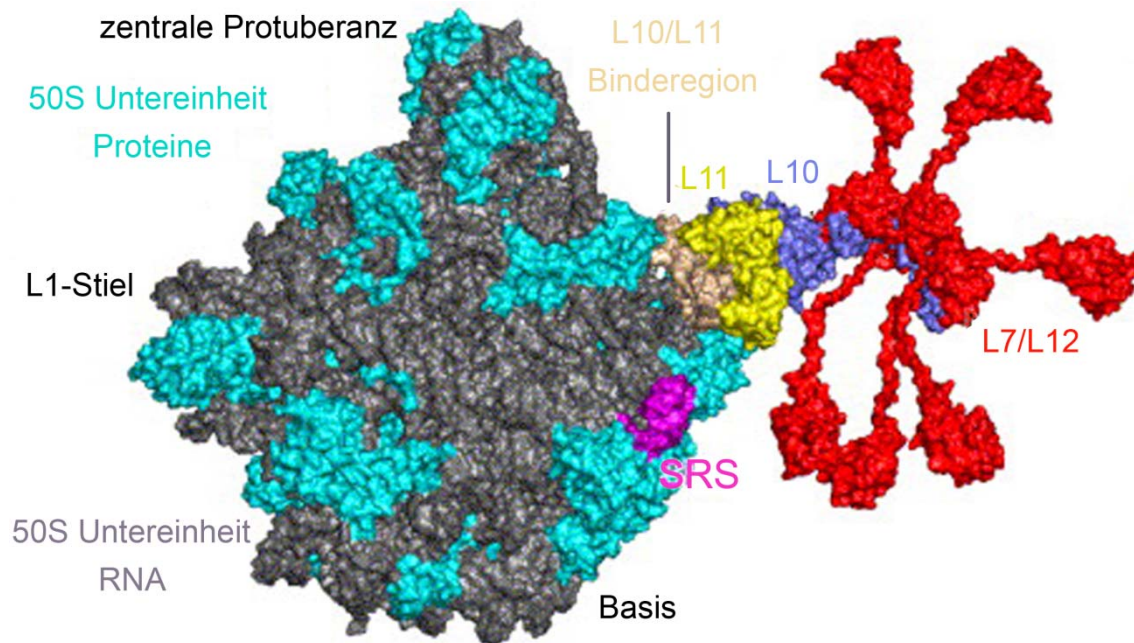


Abbildung 1.7: Modell für die Organisation des prokaryotischen L7/L12-Stiels. Abgebildet ist die Fusion der Kristallstrukturen der ribosomalen 50S Untereinheit aus *Haloarcula marismortui* und des L10-(L12)₆-Komplexes aus *Thermotoga maritima*. Wichtige RNA-Areale und Proteine sind farbig kodiert. SRS: Sarcin-Ricin-Schleife. Verändert nach Diaconu *et al.* (2005).^[83]

1.2.4 Die „Stielbasis“ - Die ribosomale Bindestelle der Thiopeptidantibiotika

Die ribosomale Bindestelle von Thiopeptidantibiotika wie Thiostrepton (**1**), Nosiheptid (**2**) und Micrococcin (**3**), ist die so genannte Stielbasis des L7/L12-Stiels.^[78b, 87] Sie wird aus den Helices 43 und 44 der Domäne II der 23S rRNA und dem ribosomalen Protein L11 aufgebaut. Die Stielbasis sowie der L7/L12-Stiel sind aufgrund ihrer konformativen Flexibilität in Kristallstrukturen meist nicht eindeutig geordnet und dementsprechend schlecht aufgelöst. Isolierte Komplexe von L11 und eines Fragments der L11-Bindedomäne der 23S rRNA (1051-1109, *E. coli* Nummerierung), konnten jedoch kristallisiert und ihre Auflösung auf 2,6-2,8 Å optimiert werden.^[88] Die Sekundärstruktur der L11-Bindedomäne der 23S rRNA entspricht einer Vier-Wege-Verzweigung der Helices 42, 43 und 44 (Abbildung 1.8). Genauer werden hier der so genannte terminale Stamm, die 1067 Stamm-Schleife, die 1095 Stamm-Schleife und die 1082 Haarnadel unterschieden. In der Tertiärstruktur stapelt sich der terminale Stamm auf die 1095 Stamm-Schleife und die 1067 Stamm-Schleife auf die 1082 Haarnadel und bilden so zwei doppelt-helikale Subdomänen, welche ihrerseits wieder einige tertiäre Kontakte miteinander zeigen und so zu einer relativ kompakten Faltung der L11-

Bindedomäne führen. Für die Stabilität der Tertiärstruktur sorgen zusätzlich noch eine Vielzahl von Mg^{2+} -Ionen. Diese stabilisieren hauptsächlich die Interaktion der 1067 und 1095 Stamm-Schleifen. Ein zentrales Mg^{2+} -Ion scheint für die generelle Struktur der Vier-Wege-Verbindung von Wichtigkeit zu sein.^[88] Darüberhinaus wird auch die Anwesenheit von monovalenten Ionen (K^+ , NH_4^+) für die Strukturstabilität diskutiert.^[89]

L11 ist ein globuläres Zwei-Domänen-Protein, wobei die beiden Domänen flexibel miteinander verbunden sind (Abbildung 1.8).^[88] RNA-Kontakte gehen fast ausschließlich von der C-terminale Domäne von L11 aus. Hierbei zeigen beide Makromoleküle ein hohes Maß an Form-Komplementarität.^[88] Die Bindung des L11 C-Terminus an die rRNA stabilisiert die RNA-Struktur deutlich.^[78h, 90] Der L11 N-Terminus befindet sich zwar in der Nähe der RNA, zeigt aber nur wenige spezifische Kontakte.^[88b] Vielmehr scheint seine konformationelle Flexibilität an der Stimulierung der ribosomalen GTPasen beteiligt zu sein.^[78h, 91] 23S rRNA und N-Terminus sind so durch eine charakteristische Spalte voneinander getrennt. Auffällig ist hier eine hoch-konservierte, zum Lösungsmittel exponierte und flexible Prolin-reiche Helix an der Spitze des N-Terminus (19-PAPPVGPALQQH-30, *Thermus thermophilus* Sequenz und Nummerierung), welche sich in der Nähe der ebenfalls hochkonservierten RNA-Basen A1067 und A1095 befindet.^[88] Mutationstudien und biochemische Experimente zeigten mehrfach die Wichtigkeit der prolinreichen Helix sowie dieser beiden Nukleobasen sowohl für die Interaktion mit den ribosomalen Faktoren^[61, 76e, 76g, 78c, 78i, 86, 92] als auch mit den Thiopeptidantibiotika.^[78h, 87c, 88a, 93]

Die biochemisch/biophysikalischen Aspekte der Thiopeptid-Zielstruktur-Interaktion wurden ausschließlich für das repräsentative Thiostrepton (**1**) sowie Micrococcin (**3**) untersucht.^[78h, 87c, 88a, 93] Bereits frühe Studien von Pestka *et al.*,^[94] Cundliffe *et al.*^[95] sowie vor allem Draper *et al.*^[89e, 96] zeigten mindestens nanomolare Affinitäten von **1** an die ribosomale Zielstruktur. Es ist in diesem Zusammenhang jedoch zu erwähnen, dass diese Affinitäten jeweils den Detektionsgrenzen der verwendeten Methoden entsprechen. Quantitative Bindedaten unterschiedlicher Thiopeptide an den Zielstrukturkomplex wurden nicht ermittelt. Es wurde berichtet, dass **1** in radioaktiven Filterbindungsexperimenten und UV-spektroskopischen RNA-Schmelzexperimenten in der Lage ist an die Protein-freie L11-Bindedomäne der 23S rRNA zu binden, dabei jedoch nur mikromolare Affinitäten zeigt.^[96a] Die Anwesenheit des L11-Proteins steigert die Affinität von **1** stark und wurde auf den N-Terminus zurückgeführt.^[90, 96b] L11 allein zeigt bemerkenswerterweise keine Affinität zu **1**.^[96b] Die

Thiopeptid-Restaffinität der rRNA zeigt, dass der Hauptteil der Kontakte zwischen **1** und dem Ribosom über RNA-Thiopeptid-Kontakte vermittelt sein müssen. Hierbei spielen vor allem die beiden Nucleobasen A1067 und A1095 eine wichtige Rolle.^[93a, 96a]

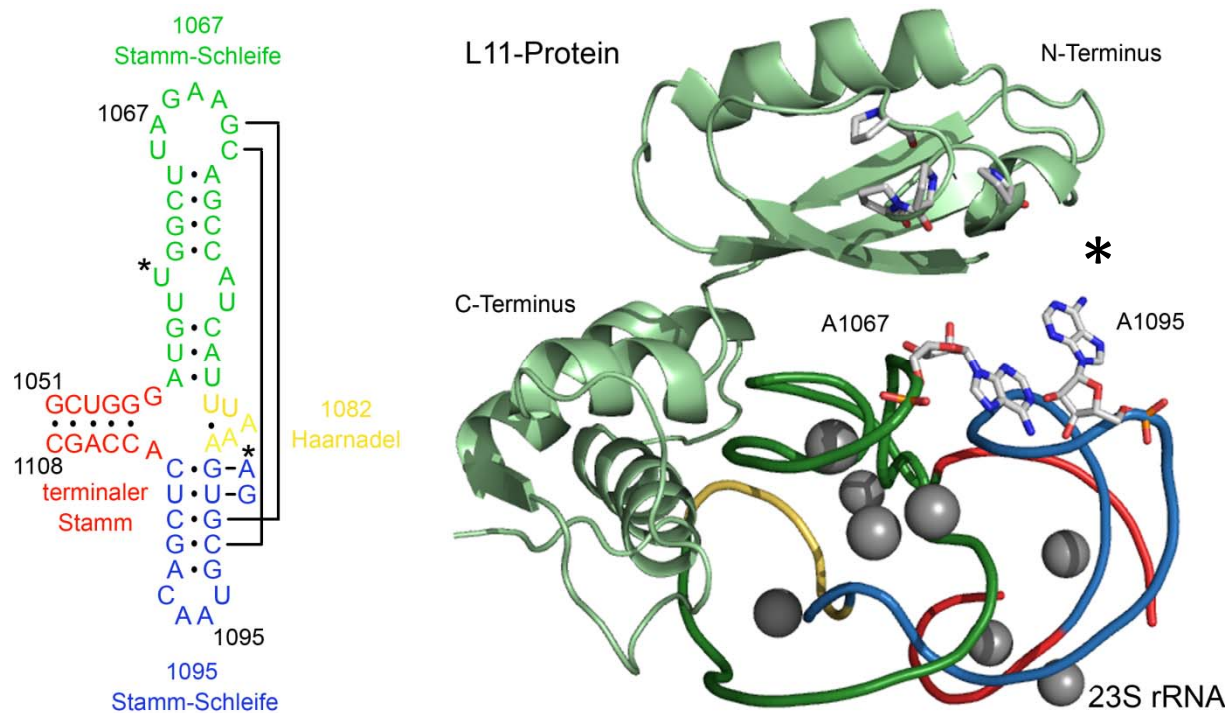


Abbildung 1.8: A) Sekundärstruktur der L11-Bindedomäne der 23S rRNA (1051-1108, *E. coli* Nummerierung). Wichtige Bereiche sind farblich markiert. Tertiärkontakte sind durch Verbindungslinien bzw. Sterne markiert. Verändert nach Wimberly *et al.*^[88b] B) Visualisierung der Struktur des L11-23S rRNA-(1051-1108) Komplexes auf Basis der Kristallstrukturdaten aus Wimberly *et al.* (PDB: 1mms).^[88b] Der Farbcode der 23S rRNA entspricht dem aus A). Wichtige Nucleobasen sind markiert. Mg²⁺-Ionen sind als graue Kugeln dargestellt. Prolin-Einheiten der Prolin-reichen Helix von L11 sind hervorgehoben. Die mögliche Bindestelle der Thiopeptide ist durch einen Stern markiert.

Der Produzenten von **1** wie z.B. *Streptomyces azureus* schützen sich z.B. durch eine charakteristische 2'-O-Methylierung (vermittelt über eine spezielle Methyltransferase) von A1067 gegen das Antibiotikum.^[97] Spontane Thiopeptid-Resistenzen anderer Gram-positive Prokaryoten *in vitro*, erstrecken sich ausschließlich auf A1067 und A1095 auf der RNA-Seite.^[98] Die molekulare Interaktion der Thiopeptide mit diesen Nucleotiden, sowie auch die chemische Natur des möglicherweise kooperativen Beitrags des L11 N-Terminus sind jedoch unverstanden. Die Tatsache das Punktmutationen (vor allem der Proline) in oder Verluste

der gesamten Prolin-reichen Helix des L11 N-Terminus ebenfalls zu hohen Thiopeptidtoleranzen führt, unterstreicht die Wichtigkeit der Helix für die Thiopeptidbindung (siehe hierzu auch Kapitel 5).^[21a, 93d, 94b, 99]

Auch die genaue Lage der Bindestelle sowie der Bindungsgeometrie der Thiopeptide war zu Beginn dieser Arbeit weitgehend unverstanden. Auf Basis der Vielzahl der biochemischen Daten für **1**, sowie auch einiger struktureller Untersuchungen wurden in Laufe der Zeit einige plausible Modelle für die Bindung an den L11-RNA-Komplex postuliert, welche **1** (Kristallstruktur des freien Liganden)^[23b, 23e] über *in silico* „Docking“-Experimente in der Spalte zwischen dem L11 N-Terminus und der 23S rRNA positionierten (Abbildung 1.8).^[93e, 100] Biochemische bzw. strukturelle Beweise für die hier postulierten Bindemodi existierten zu Beginn der vorliegenden Arbeit jedoch nicht. Weiterführend war in diesem Zusammenhang die Publikation der Strukturen von **1**, **2** und **3** im Komplex mit der ribosomalen 50S Untereinheit aus *Deinococcus radiodurans* (2008), die durch „soaking“ in präparierte Kristalle erhalten wurde (Abbildung 1.9).^[101] Diese Kristallstrukturen (Auflösung 3-4 Å) bestätigten die Spalte zwischen dem L11 N-Terminus und der 23S rRNA als ribosomale Bindetasche der Thiopeptide. Darüberhinaus gaben sie wertvolle Informationen über die Bindegeometrie der Thiopeptide und weisen unterschiedliche Bindungsmodi von Thiostrepton (**1**) und Micrococцин (**3**) auf (siehe auch Kapitel 1.2.5 und Kapitel 6), im Einklang mit biochemischen Studien^[93a, 93e, 101]

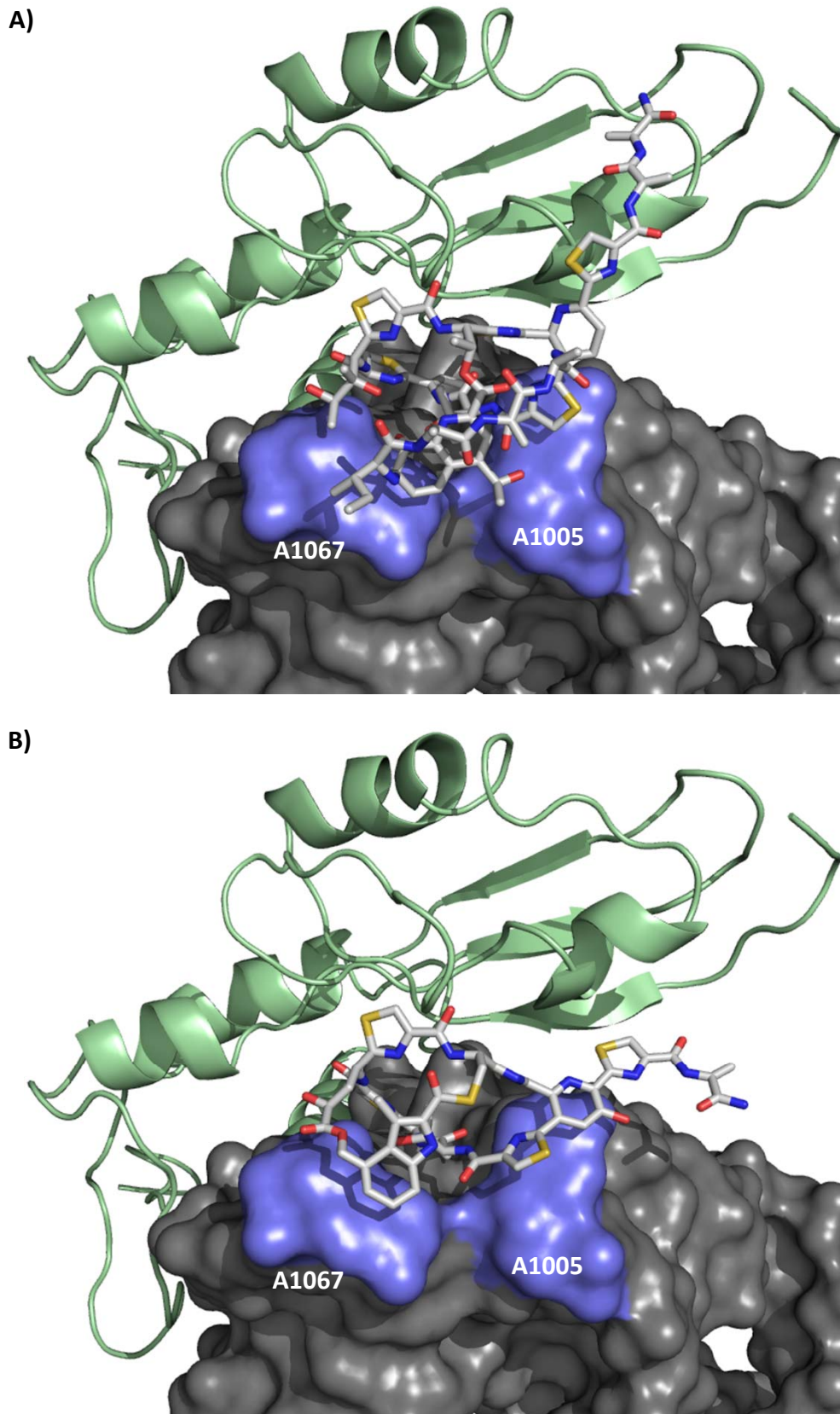


Abbildung 1.9: Darstellung der Kristallstrukturen der Komplexe von Thiostrepton **1** (A) und Nosiheptid **2** (B) im Komplex mit der ribosomalen 50S Untereinheit aus *Deinococcus radiodurans* (PDB: 3cf5 und 2zjp).^[101] Die Nukleobasen A1067 und A1095 sind markiert.

1.2.5 Inhibierung ribosomaler GTPasen durch Thiopeptide

Konformationsänderungen des L11 N-Terminus sind entscheidend an der Stimulierung der ungekoppelten GTPase-Aktivität ribosomaler Faktoren beteiligt.^[78h, 91] Diese Stimulierung scheint durch die Bindung von Thiopeptiden beeinflusst zu werden (siehe auch Kapitel 3 und 6),^[78h, 100] wobei sie unterschiedliche Wirksamkeiten auf die ungekoppelte GTPase-Aktivität verschiedener ribosomaler Faktoren haben können. Dies verdeutlicht sich vor allem beim Vergleich von Thiostrepton (**1**) und Micrococcin (**3**). **1** und **3** beispielsweise stimulieren die IF2 vermittelte GTP-Hydrolyse, inhibieren aber ebenso die IF-2-abhängige Bildung des Initiationsdipeptids.^[76e, 76f] Ihre Wirkung auf EF-G ist jedoch unterschiedlich. Diese GTPase wird durch **3** stimuliert, **1** jedoch führt zu einer Inhibition der GTPase-Aktivität von EF-G.^[76e] Auf die GTPase-Aktivität des EF-G homologen LepA (EF-4, *vide supra*) zeigen sowohl **1** als auch **3** eine inhibitorische Wirkung.^[81] Warum die beiden Liganden unterschiedliche Wirkungsmechanismen und die einzelnen Vertreter unterschiedliche Einflüsse auf verschiedene ribosomale GTPasen zeigen, ist bislang weitgehend unverstanden. Auf Basis der Kristallstrukturen der Komplexe von **1** und **3** mit der ribosomalen 50S Untereinheit,^[101] sowie Kryo-Elektronenmikroskopie-Strukturen eines 70S-EF-G-GDPNP-Komplexes,^[102] wurde ein Modell für die unterschiedlichen Aktivitäten von **1** und **3** auf die Aktivität von EF-G vorgeschlagen (Abbildung 1.10). Demnach inseriert hierbei Domäne V von EF-G im Ligandenfreien Ribosom in die Spalte zwischen dem L11 N-Terminus und der 23S rRNA und führt so zu einer Konformationsänderung von L11 (Schalter 1) welche eine stabile Bindung des Faktors erlaubt. Parallel tritt eine Konformationsänderung im L11 N-Terminus (Schalter 2) auf, welche die Interaktion des L11 N-Terminus mit L7/L12 ermöglicht. Diese Wechselwirkung induziert im Folgenden die Stimulierung der ungekoppelten EF-G-GTPase-Aktivität über eine direkte Interaktion von L7 mit der G'-Domäne von EF-G.^[101] Thiostrepton (**1**) führt in diesem Zusammenhang zu einer Inhibition beider „Schalterfunktionen“ von L11 d.h. der stabilen EF-G Bindung und der L11 N-Terminus vermittelten Interaktion von L7 und der G'-Domäne von EF-G und der daraus resultierenden Aktivierung der ungekoppelten GTPase-Aktivität. Micrococcin (**3**) hingegen inhibiert die Schalterfunktion 1, erlaubt jedoch die Schalterfunktion 2. Dies bedeutet, dass EF-G nicht effektiv binden kann, dessen GTPase-Aktivität gleichzeitig jedoch stark stimuliert wird.

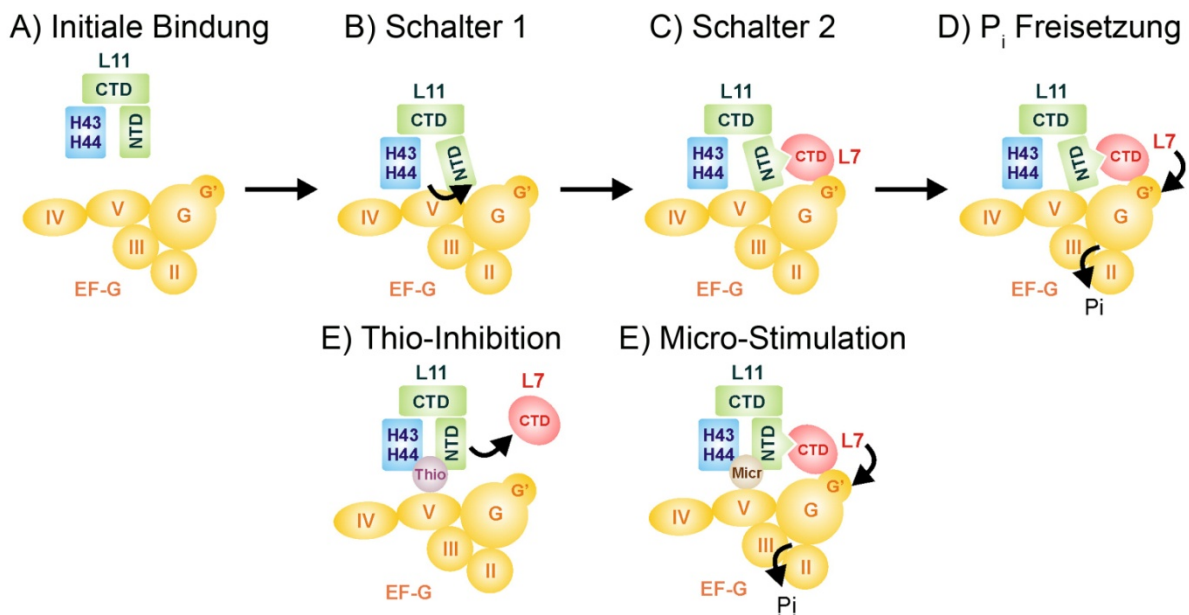


Abbildung 1.10: A-D) Modell für die molekularen Ereignisse an der ribosomalen L7/L12-Stielbasis (23S rRNA-L11-Komplex) welche zur EF-G Unterbringung und GTPase-Aktivierung führen. E-F) Modelle der Effekte von Thiostrepton (Thio, **1**) und Micrococcin (Micro, **3**). Grün: L11-Protein, unterteilt in N- und C-Terminus; Blau: L11-Binderegion (Helices 43+44 der 23S rRNA); Gelb: EF-G, Domänen II-V, G und G'. Verändert nach Harms *et al.*^[101]

Die für die Aktivität von **1** bestuntersuchte ribosomale GTPase ist EF-G, die von **1** inhibiert wird. In der Tat wird dieser Sachverhalt jedoch kontrovers diskutiert. In einem vielfach akzeptierten Modell interferiert **1** mit der Bindung von EF-G-GTP an das Ribosom und unterbindet so generell die GTP-Hydrolyse (keine P_i -Freisetzung) sowie die Translokationsreaktion am Ribosom.^[76e, 94a, 103] Dieses Modell steht im Einklang mit den Komplex-Kristallstrukturen von **1** und **2**, in welchen die Positionierung des Liganden die Interaktion des L11-RNA-Komplexes mit Domäne V^[61a] von EF-G verhindern würde.^[101] Studien von Rodnina *et al.* zeigten wiederum, dass EF-G-GTP in Anwesenheit von **1** sehr gut an die GAR binden kann und einmalige der GTP-Hydrolyse erlaubt. Der inhibitorische Charakter von **1** zeigt sich hier vielmehr in einer Blockade folgender Schritte d.h. der Freisetzung von P_i , der Dissoziation von EF-G-GDP vom Ribosom und der tRNA-Translokation.^[78e] Dieser Mechanismus verlangsamt die Translation dramatisch, blockiert sie *in vitro* jedoch nicht vollständig.^[78e] Die Unabhängigkeit der Bindung von EF-G-GTP und **1** zeigt darüber hinaus, dass die inhibitorische Aktivität von **1** indirekt sein muss, da es nicht an

EF-G selbst bindet. Die durch Bindung verringerte der Flexibilität von L11 (*vide supra*) könnte auch in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle spielen (siehe auch Kapitel 3 und 5).

1.3 Pharmakologie der Thiopeptide

Trotz ihrer starken Wirksamkeit gegen Gram-positive Prokaryoten *in vitro* und ihrem einzigartigen Wirkmechanismus am Ribosom werden Thiopeptidantibiotika zurzeit ausschließlich in der Veterinärmedizin zur Behandlung von Hautinfektionen bei Haustieren oder Mastitis bei Milchvieh eingesetzt (Panalog, Animax, Derma-4, Solvaderm, etc.). Die klinische Anwendung von Thiopeptidantibiotika am Menschen wird von ihrer schlechten Löslichkeit in wässrigen Medien (und eine somit vermutete leichte Entwicklung von Resistenzen, siehe auch Kapitel 5), ihre beträchtliche molekulare Größe sowie ihre schlechte Bioverfügbarkeit behindert. Thiopeptide penetrieren das Darmepithel nicht.^[22] Die schlechte Wasserlöslichkeit wurde für die mit Nosiheptid (**2**) strukturell eng verwandten Verbindungen Nocathiacin^[104] und Thiazomycin^[105] bereits semisynthetisch adressiert. Einige Derivate zeigten vielversprechende Resultate in Tiermodellen und stehen immer noch im Focus einiger pharmazeutischer Firmen (Bristol-Myers Squibb, Merck, Novartis).^[29e, 99, 106] Deren Studien lieferten wichtige Informationen über das antibiotische Potential wasserlöslicher, semisynthetischer Derivate, gaben jedoch keine Hinweise auf den Einfluss der chemischen Modifizierungen auf die Zielstruktur-Affinität der Verbindungen im Sinne einer Struktur-Affinitäts-Relation (SAR) bzw. über das grundlegende Pharmakophor von Thiopeptiden. Erste Hinweise für ein mögliches Pharmakophor von **1** lieferte die 2005 von Nicolaou *et al.* publizierte Totalsynthese von **1**.^[107] Im Rahmen dieser Studien wurde ein bioaktives Fragment (Dehydropiperidin-Kern-Baustein, Abbildung 1.11) identifiziert, welches mit einer minimalen inhibitorischen Konzentration von 5 μM gegen MRSA nur ca. 25-fach weniger aktiv war als **1**.^[42a] Interessanterweise zeigte dasselbe Fragment für unterschiedliche Krebszelllinien 2-10-fach höhere Aktivitäten als **1** (siehe hierzu auch Kapitel 1.1.3.3). Die Andere Fragmente von **1** waren hingegen biologisch inaktiv.^[42a]

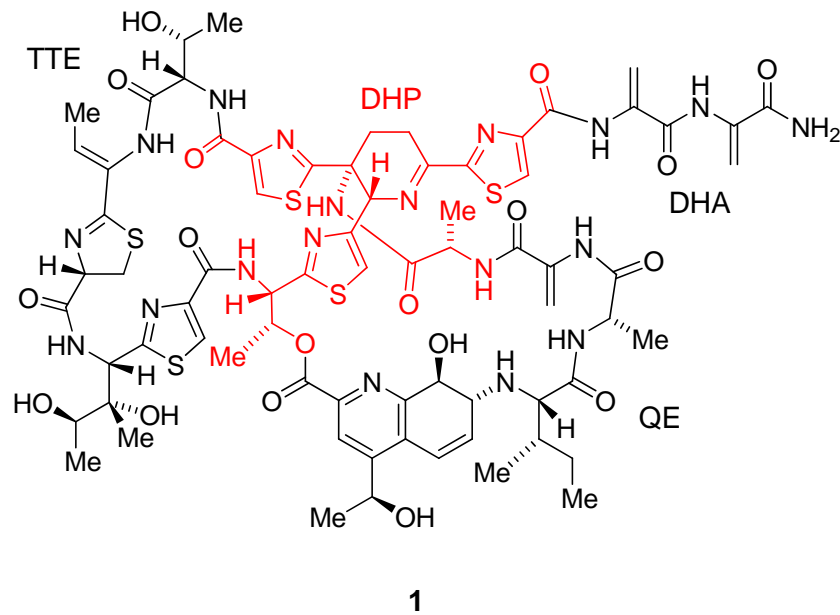


Abbildung 1.11: Chemische Struktur von Thiostrepton (**1**). Das biologisch aktive Fragment (Dehydropiperidin-Kern, DHP) aus Nicolaou *et al.*^[42a] ist rot hervorgehoben. Weitere Fragmente sind markiert: Thiazol-Thiazol-Einheit (TTE), Dehydroalanin-Schwanz (DHA) und Quinaldinsäure-Einheit (QE).

Eine in jüngster Zeit erschienene Folgestudie mit unterschiedlichen Thiopeptid-Fragmenten von **1-3** und GE2270A (siehe Kapitel 1.2.3.1) sowie den entsprechenden Naturstoffen bestätigte die inhibitorische Aktivität des Dehydropiperidin-Kerns von **1** für die IF2 vermittelte Translationsinitiation.^[108] Minimale Änderungen der Stereochemie führten bereits zu vollständigen Aktivitätsverlusten. Dieses Fragment zeigte keine Aktivität in einem Testsystem zur Bestimmung der GTPase-Aktivität von EF-G. Interessanterweise waren auch Fragmente auf Basis eines trisubstituierten Pyridins (Kerneinheit von **2** (Hydroxypyridin), **3** und GE2270A) in beiden Testsystemen inaktiv. Sie hatten jedoch die Eigenschaft, die Wirksamkeit von Thiopeptidnaturstoffen in Parallelinkubationen zu verringern was auf gleiche Bindestellen schließen lässt.^[108] Daraus folgt, dass die reine Bindefähigkeit von Thiopeptid-Fragmenten an die ribosomale Zielstruktur nicht zur Inhibition führen muss. Offen bleibt somit weiter die Frage nach den molekularen Ursachen der generellen Zielstrukturaffinität und den molekularen Ursachen der Bioaktivität. Kenntnis über diese Parameter ist für eine anschließende gezielte Synthese und Weiterentwicklung von Liganden zwingend notwendig.

1.4 Affinitätsmarkierung (kovalenter Einfang)^[109]

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit existierten trotz weitreichender kristallographischer^[88] und NMR-spektroskopischer^[93e, 100, 110] Bemühungen nur Indizien über die genaue Bindestelle der Thiopeptidantibiotika. Die Bindegeometrie der Moleküle am 23S rRNA-L11-Komplex war unklar. Zwei Faktoren erschweren generell die strukturelle Analyse von Thiopeptid-Zielstrukturkomplexen. Zum einen sind die Thiopeptidliganden sehr schlecht wasserlöslich (ca. 1 μM), ein Sachverhalt, der die Arbeit bei den für NMR und Kristallographie nötigen Molekülkonzentrationen (0,1-10 mM) erschwert. Zum anderen ist der L11-23S rRNA Komplex bzw. die GTPase-assoziierte Region des Ribosoms recht flexibel. Ein erfolgversprechender Ansatz zur Analyse der Thiopeptid-Zielstruktur-Interaktion könnte in diesem Zusammenhang die Nutzung chemischer Reaktivität in Abhängigkeit von der räumlichen Nähe der Interaktionspartner sein. Diese so genannte Affinitätsmarkierung wurde bereits erfolgreich zur Analyse einer Vielzahl von Liganden-Rezeptor-Wechselwirkungen genutzt. Ein Affinitätsmarker ist in diesem Zusammenhang ein Ligand (L) gekoppelt an eine chemisch reaktive Gruppe, welche eine nähe-induzierte, irreversible, d.h. kovalente Bindung an den Rezeptor (R) ermöglicht.^[111] Als reaktive Funktionen auf der Rezeptorseite können native oder über Mutagenese eingeführte Aminosäuren, wie z.B. Cystein oder Serin genutzt werden. Die Variierung der Position der reaktiven Funktion in L und R erlaubt darüberhinaus die Analyse der Ligandenposition und Bindungsgeometrie. Generell werden zwei Klassen bzw. Strategien von Affinitätsmarkierungen unterschieden. Bei den so genannten *Endo*-Affinitätsmarkierungen findet die Ausbildung der kovalenten Bindung im Inneren des Rezeptors statt. Beispiele für diese Strategie sind die Vielzahl Mechanismus-basierter Sonden für die Analyse aktiver Zentren von Enzymen oder irreversible Enzyminhibitoren.^[112] Darüberhinaus existiert eine Vielzahl von Beispielen für die Anwendung von Affinitätsmarkern zur Analyse des Inneren von Protein-Rezeptoren.^[113] Bei so genannten *Exo*-Affinitätsmarkierungen findet die Ausbildung der nähe-induzierten, kovalenten Bindung zwischen L und R dagegen auf der Außenseite statt. Diese Strategie wurde beispielsweise im Rahmen der „Disulfid-Klammern (tethering[©])“ von Wells *et al.*^[114] als auch bei Proteinoberflächen-bindenden Liganden genutzt.^[115] Affinitätsmarkierungsstrategien wurden darüberhinaus für die Analyse des Dekodierungszentrums und des Peptidyltransferase-Zentrums des prokaryotischen Ribosoms verwendet.^[116] Auch für die Kartierung ribosomaler Bindestellen von Antibiotika wurde Affinitätsmarkierung bereits

eingesetzt Diese beschränkte sich jedoch meist auf die Identifizierung von Bindestellen-assoziierten, ribosomalen Proteinen.^[117] So konnte beispielsweise für Tiamulin, ein Derivat des Antibiotikums Pleuromutilin und Inhibitor des Peptidyl-Transferasezentrums, die Lage der Bindestelle an der ribosomalen 50S Untereinheit gezeigt werden.^[118] Spätere kristallographische Studien bestätigten diese Indizien auf struktureller Ebene.^[119]

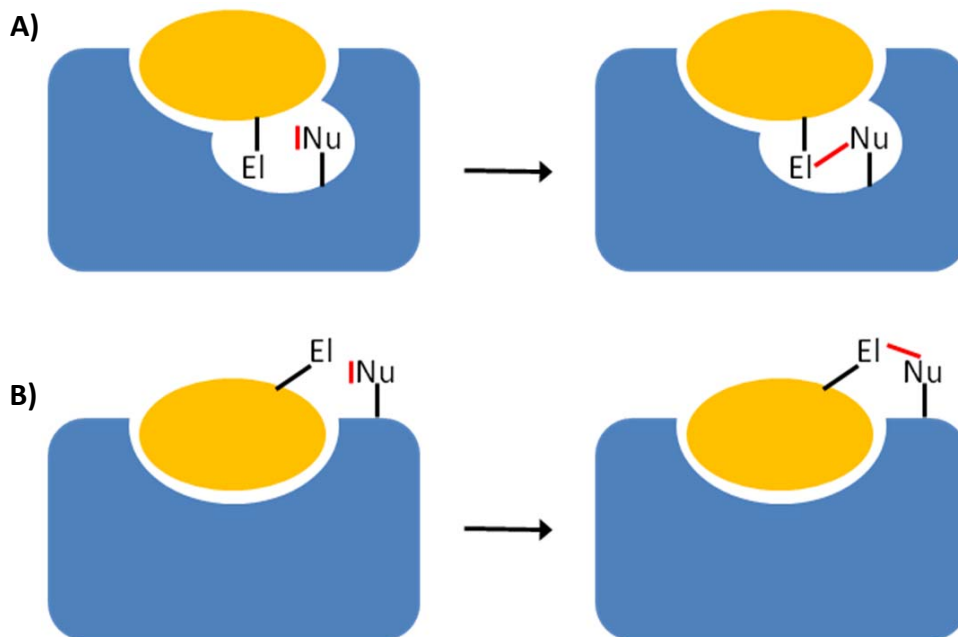


Abbildung 1.12: Schematische Darstellung von *Endo*- (A) und *Exo*-Affinitätsmarkierungen (B). Bei der *Endo*-Strategie befindet sich die reaktive Gruppe auf der Innenseite des Rezeptors. Bei der *Exo*-Strategie befindet sich die reaktive Gruppe auf der Außenseite. Ligand (orange), Rezeptor (blau), Nukleophil (Nu), Elektrophil (El). Verändert nach Levitsky *et al.*^[115c]

1.5 Ziele und Signifikanz dieser Arbeit

Die Resistenzentwicklung prokaryotischer Pathogene gegen Antibiotika ist eine ständig wachsende Bedrohung für das Gesundheitswesen. Die erfolgreiche Bekämpfung solcher Pathogene erfordert daher die Entwicklung neuer antibiotisch wirksamer Verbindungen mit neuen oder bisher klinisch ungenutzten Wirkprinzipien. Thiopeptidantibiotika, Inhibitoren der GTPase-assoziierten Region (GAR) des 70S Ribosoms und hochwirksam gegen Gram-positive Prokaryoten, stellen in diesem Zusammenhang eine vielversprechende Stoffklasse dar. Das exakte molekulare Verständnis der Interaktion dieser Naturstoffe, oder auch chemisch veränderter Derivate, mit der zellulären Zielstruktur, ist nicht nur für die chemisch-biologische Grundlagenforschung höchstwichtig, sondern auch für eine potentielle,

zukünftige klinische Anwendung essentiell. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit existierten keine quantitativen Bindungsdaten der Interaktion von Thiopeptidantibiotika mit ihrer ribosomalen Zielstruktur. Ein erstes Ziel dieser Arbeit war deshalb die Entwicklung, Etablierung und Anwendung biochemischer, biophysikalischer oder auch chemisch-biologischer Methoden zur exakten und quantitativen Analyse der Liganden-Zielstrukturaffinität. Diese Methoden sollten neben ihrer akkuraten Anwendbarkeit im mikromolaren bis sub-nanomolaren Konzentrationsbereich, zusätzlich die Möglichkeit zu Mittel- bis Hochdurchsatz-Analysen bieten. Insbesondere sollten folgende Fragestellungen eingehend behandelt werden:

- Affinitäten unterschiedlicher Thiopeptidnaturstoffe (Kapitel 3)
- Affinitäten semi- und totalsynthetischer Thiopeptid-Derivate, Struktur-Affinitäts-Relation, Thiopeptid-Pharmakophor (Kapitel 4)
- Einfluss von Resistenzmutationen in RNA und Protein auf die Liganden-Affinität; Molekulare Determinanten der Thiopeptidresistenz (Kapitel 5)

Die so gesammelten Affinitätsdaten sollten darüberhinaus mit der *in vitro* Wirksamkeit der Verbindungen korreliert werden (*in vitro* Translationsinhibition, Wachstumsinhibition von Prokaryoten).

Darüberhinaus war es wesentlich den exakten Ort und die molekulare Struktur der ribosomalen Thiopeptid-Bindestelle zu erhellen. Vor allem die Bindegeometrie des Liganden war unbekannt. Aufschluss darüber sollte eine im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Affinitätsmarkierungsstrategie liefern, welche im Unterschied zu den herkömmlichen Affinitätsmarkierungen nicht synthetisch eingeführte sondern bereits im Liganden vorhandene chemische Reaktivität nutzen sollte (Kapitel 6).

Einige Thiopeptidantibiotika zeigen eine bemerkenswerte Wirksamkeit gegen Eukaryoten wie Krebszellen oder den Malariaerreger *Plasmodium falciparum*. Ein Nebenaspekt dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung eukaryotischer Zielstrukturen unter Nutzung semisynthetischer Thiopeptid-Werkzeugverbindungen (Kapitel 7).

Insgesamt sollen so Einblicke in die molekularen Aspekte der Thiopeptid-Zielstruktur-Interaktion gewonnen werden.

1.6 Referenzen

- [1] a) C. Nathan, *Nature* **2004**, *431*, 899-902; b) WHO, in <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html> (Ed.: W. H. Organization), **2008**.
- [2] a) C. Walsh, *Nature* **2000**, *406*, 775-781; b) G. D. Wright, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 563-569.
- [3] H. Nikaido, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 119-146.
- [4] O. E. Heuer, K. Pedersen, L. B. Jensen, M. Madsen, J. E. Olsen, *Microb. Drug. Resist.* **2002**, *8*, 355-361.
- [5] D. P. Levine, *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *42 Suppl 1*, 5-12.
- [6] J. P. Manzella, *Am. Fam. Physician* **2001**, *64*, 1863-1866.
- [7] D. M. Gleave, S. J. Brickner, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6470-6474.
- [8] a) K. Hiramatsu, H. Hanaki, T. Ino, K. Yabuta, T. Oguri, F. C. Tenover, *J. Antimicrob. Chemother.* **1997**, *40*, 135-136; b) K. Hiramatsu, K. Okuma, X. X. Ma, M. Yamamoto, S. Hori, M. Kapi, *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2002**, *15*, 407-413; c) A. M. Bal, I. M. Gould, *Expert. Opin. Pharmacother.* **2005**, *6*, 2257-2269; d) M. Baysallar, A. Kilic, H. Aydogan, F. Cilli, L. Doganci, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2004**, *23*, 510-512.
- [9] WHO, *World Health Report: A Safer Future*, Geneve, **2007**.
- [10] R. M. Klevens, M. A. Morrison, J. Nadle, S. Petit, K. Gershman, S. Ray, L. H. Harrison, R. Lynfield, G. Dumyati, J. M. Townes, A. S. Craig, E. R. Zell, G. E. Fosheim, L. K. McDougal, R. B. Carey, S. K. Fridkin, *JAMA* **2007**, *298*, 1763-1771.
- [11] M. E. Falagas, I. A. Bliziotis, S. K. Kasiakou, G. Samonis, P. Athanassopoulou, A. Michalopoulos, *BMC Infect Dis.* **2005**, *5*, 24.
- [12] a) S. E. Dorman, R. E. Chaisson, *Nat. Med.* **2007**, *13*, 295-298; b) D. H. Kim, H. J. Kim, S. K. Park, S. J. Kong, Y. S. Kim, T. H. Kim, E. K. Kim, K. M. Lee, S. S. Lee, J. S. Park, W. J. Koh, C. H. Lee, J. Y. Kim, T. S. Shim, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2008**, *178*, 1075-1082; c) D. H. Kim, H. J. Kim, S. K. Park, S. J. Kong, Y. S. Kim, T. H. Kim, E. K. Kim, K. M. Lee, S. S. Lee, J. S. Park, W. J. Koh, C. H. Lee, T. S. Shim, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2010**.
- [13] a) F. von Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, D. Häbich, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5194-5254; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 5072-5129; b) M. Leeb, *Nature* **2004**, *431*, 892-893.
- [14] H. W. Boucher, G. H. Talbot, J. S. Bradley, J. E. Edwards, D. Gilbert, L. B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg, J. Bartlett, *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48*, 1-12.
- [15] R. O'Shea, H. E. Moser, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2871-2878.
- [16] IDSA, *Clin. Infect. Dis.* **2010**, *50*, 1081-1083.
- [17] M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Science* **2009**, *325*, 1089-1093.
- [18] a) D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022-1037; b) G. M. Cragg, D. J. Newman, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 52-60.
- [19] T. L. Su, *Br. J. Exp. Pathol.* **1948**, *29*, 473-481.
- [20] a) R. Donovan, J. F. Pagano, H. A. Stout, M. J. Weinstein, *Antibiot. Annu.* **1955**, *3*, 554-559; b) J. D. Dutcher, J. Vandeputte, *Antibiot. Annu.* **1955**, *3*, 560-561.
- [21] a) M. J. Pucci, J. J. Bronson, J. F. Barrett, K. L. DenBleyker, L. F. Discotto, J. C. Fung-Tomc, Y. Ueda, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 3697-3701; b) K. E. Loughheed, D. L. Taylor, S. A. Osborne, J. S. Bryans, R. S. Buxton, *Tuberculosis* **2009**, *89*, 364-370; c) C. Zhang, J. Occi, P. Masurekar, J. F. Barrett, D. L. Zink, S. Smith, R. Onishi, S. Ha, O. Salazar, O. Genilloud, A. Basilio, F. Vicente, C. Gill, E. J. Hickey, K. Dorso, M. Motyl, S. B. Singh, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12102-12110.
- [22] M. C. Bagley, J. W. Dale, E. A. Merritt, X. Xiong, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 685-714.
- [23] a) W. P. Jambor, B. A. Steinberg, L. O. Suydam, *Antibiot. Annu.* **1955**, *3*, 562-565; b) B. Anderson, D. C. Hodgkin, M. A. Viswamitra, *Nature* **1970**, *225*, 233-235; c) O. D. Hensens, G. Albers-Schonberg, *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 832-845; d) U. Mocek, J. M. Beale, H. G. Floss, *J.*

- Antibiot.* **1989**, *42*, 1649-1652; e) C. S. Bond, M. P. Shaw, M. S. Alphey, W. N. Hunter, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2001**, *57*, 755-758.
- [24] M. A. Ciufolini, D. Lefranc, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 330-342.
- [25] a) F. Benazet, M. Cartier, J. Florent, C. Godard, G. Jung, J. Lunel, D. Mancy, C. Pascal, J. Renaut, P. Tarridec, J. Theilleux, R. Tissier, M. Dubost, L. Ninet, *Experientia* **1980**, *36*, 414-416; b) C. Pascard, A. Ducruix, J. Lunel, T. Prange, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 6418-6423; c) T. Prange, A. Ducruix, C. Pascard, J. Lunel, *Nature* **1977**, *265*, 189-190.
- [26] B. S. Yun, H. Seto, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1995**, *59*, 876-880.
- [27] a) T. Frenzel, P. Zhou, H. G. Floss, *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *278*, 35-40; b) P. Zhou, D. O'Hagan, U. Mocek, Z. Zeng, L. D. Yuen, T. Frenzel, J. M. Unkefer, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 7274-7276; c) U. Mocek, A. R. Knaggs, R. Tsuchiya, T. Nguyen, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7557-7568; d) U. Mocek, Z. Zeng, D. O'Hagan, P. Zhou, L.-D. G. Fan, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7992-8001; e) N. D. Priestley, T. M. Smith, P. R. Shipley, H. G. Floss, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 1135-1147.
- [28] a) E. M. Nolan, C. T. Walsh, *ChemBioChem.* **2009**, *10*, 34-53; b) S. A. Sieber, M. A. Marahiel, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 715-738.
- [29] a) L. C. Wieland Brown, M. G. Acker, J. Clardy, C. T. Walsh, M. A. Fischbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2009**, *106*, 2549-2553; b) R. Liao, L. Duan, C. Lei, H. Pan, Y. Ding, Q. Zhang, D. Chen, B. Shen, Y. Yu, W. Liu, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 141-147; c) W. L. Kelly, L. Pan, C. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4327-4334; d) Y. Yu, L. Duan, Q. Zhang, R. Liao, Y. Ding, H. Pan, E. Wendt-Pienkowski, G. Tang, B. Shen, W. Liu, *ACS Chem. Biol.* **2009**; e) R. P. Morris, J. A. Leeds, H. U. Naegeli, L. Oberer, K. Memmert, E. Weber, M. J. LaMarche, C. N. Parker, N. Burrer, S. Esterow, A. E. Hein, E. K. Schmitt, P. Krastel, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5946-5955.
- [30] a) H. D. Arndt, S. Schoof, J. Y. Lu, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6900-6904; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 6770-6773; b) C. Li, W. L. Kelly, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 153-164; c) C. T. Walsh, M. G. Acker, A. A. Bowers, *J. Biol. Chem.* **2010**.
- [31] a) M. G. Acker, A. A. Bowers, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17563-17565; b) A. A. Bowers, M. G. Acker, A. Koglin, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7519-7527.
- [32] a) R. A. Hughes, C. J. Moody, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8076-8101; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 7930-7954.
- [33] a) A. Parmeggiani, P. Nissen, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 4576-4581; b) A. Parmeggiani, I. M. Krab, S. Okamura, R. C. Nielsen, J. Nyborg, P. Nissen, *Biochemistry* **2006**, *45*, 6846-6857; c) P. H. Anborgh, A. Parmeggiani, *EMBO J.* **1991**, *10*, 779-784.
- [34] a) S. Grkovic, M. H. Brown, R. A. Skurray, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, *66*, 671-701; b) S. Grkovic, M. H. Brown, R. A. Skurray, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2001**, *12*, 225-237.
- [35] T. Murakami, T. G. Holt, C. J. Thompson, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 1459-1466.
- [36] D. J. Holmes, J. L. Caso, C. J. Thompson, *EMBO J.* **1993**, *12*, 3183-3191.
- [37] J. D. Kahmann, H. J. Sass, M. G. Allan, H. Seto, C. J. Thompson, S. Grzesiek, *EMBO J.* **2003**, *22*, 1824-1834.
- [38] a) M. L. Chiu, M. Folcher, P. Griffin, T. Holt, T. Klatt, C. J. Thompson, *Biochemistry* **1996**, *35*, 2332-2341; b) M. L. Chiu, P. H. Viollier, T. Katoh, J. J. Ramsden, C. J. Thompson, *Biochemistry* **2001**, *40*, 12950-12958.
- [39] a) P. G. Guilfoile, C. R. Hutchinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1991**, *88*, 8553-8557; b) R. Plater, J. A. Robinson, *Gene* **1992**, *112*, 117-122.
- [40] S. Kuhstoss, R. N. Rao, *Gene* **1991**, *103*, 97-99.
- [41] M. Ueno, S. Furukawa, F. Abe, M. Ushioda, K. Fujine, S. Johki, H. Hatori, H. Ueda, *J. Antibiot.* **2004**, *57*, 590-596.
- [42] a) K. C. Nicolaou, M. Zak, S. Rahimipour, A. A. Estrada, S. H. Lee, A. O'Brate, P. Giannakakou, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15042-15044; b) B. D. Bowling, N. Doudican, P. Manga, S. J. Orlow, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2008**, *63*, 37-43; c) U. G. Bhat, P. A. Zipfel, D. S. Tyler, A. L. Gartel, *Cell Cycle* **2008**, *7*, 1851-1855.

- [43] L. Margulis, M. F. Dolan, *Sciences* **1997**, *37*, 20-25.
- [44] T. Uchiyumi, A. Wada, R. Kominami, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 29889-29893.
- [45] M. Halasi, A. L. Gartel, *Cell Cycle* **2009**, *8*, 1966-1967.
- [46] a) U. G. Bhat, M. Halasi, A. L. Gartel, *PLoS One* **2009**, *4*, e5592; b) A. L. Gartel, *Expert Opin. Ther. Targets* **2008**, *12*, 663-665; c) M. Halasi, H. Zhao, H. Dahari, U. G. Bhat, E. B. Gonzalez, A. V. Lyubimov, D. A. Tonetti, A. L. Gartel, *Cell Cycle* **2010**, *9*; d) M. Halasi, D. P. Schraufnagel, A. L. Gartel, *Cell Cycle* **2009**, *8*, 2850-2851; e) B. Pandit, A. L. Gartel, *Prostate* **2010**, *70*, 825-833.
- [47] a) J. M. Kwok, S. S. Myatt, C. M. Marson, R. C. Coombes, D. Constantinidou, E. W. Lam, *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 2022-2032; b) J. M. Kwok, B. Peck, L. J. Monteiro, H. D. Schwenen, J. Millour, R. C. Coombes, S. S. Myatt, E. W. Lam, *Mol. Cancer Res.* **2010**, *8*, 24-34.
- [48] a) C. Pilarsky, M. Wenzig, T. Specht, H. D. Saeger, R. Grutzmann, *Neoplasia* **2004**, *6*, 744-750; b) D. W. Chan, S. Y. Yu, P. M. Chiu, K. M. Yao, V. W. Liu, A. N. Cheung, H. Y. Ngan, *J. Pathol.* **2008**, *215*, 245-252; c) N. Bektas, A. Haaf, J. Veeck, P. J. Wild, J. Luscher-Firzlaff, A. Hartmann, R. Knuchel, E. Dahl, *BMC Cancer* **2008**, *8*, 42; d) S. K. Radhakrishnan, A. L. Gartel, *Nat Rev Cancer* **2008**, *8*, c1; author reply c2.
- [49] J. Laoukili, M. Stahl, R. H. Medema, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1775*, 92-102.
- [50] a) M. Schlitzer, *ChemMedChem.* **2007**, *2*, 944-986; b) G. A. McConkey, M. J. Rogers, T. F. McCutchan, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 2046-2049; c) M. Sullivan, J. Li, S. Kumar, M. J. Rogers, T. F. McCutchan, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, *109*, 17-23; d) S. Chaubey, A. Kumar, D. Singh, S. Habib, *Mol. Microbiol.* **2005**, *56*, 81-89.
- [51] a) C. D. Goodman, V. Su, G. I. McFadden, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2007**, *152*, 181-191; b) A. A. Divo, T. G. Geary, J. B. Jensen, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *27*, 21-27; c) M. E. Fichera, M. K. Bhopale, D. S. Roos, *Antimicrob. Agents. Chemother.* **1995**, *39*, 1530-1537.
- [52] a) T. Tenson, A. Mankin, *Mol. Microbiol.* **2006**, *59*, 1664-1677; b) T. Auerbach, A. Bashan, A. Yonath, *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 570-576; c) J. M. Harms, H. Bartels, F. Schlunzen, A. Yonath, *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 1391-1393; d) A. Yonath, *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 649-679.
- [53] F. Crick, *Nature* **1979**, *227*, 561-563.
- [54] H. M. Temin, D. Baltimore, *Adv. Virus. Res.* **1972**, *17*, 129-186.
- [55] P. Ahlquist, *Science* **2002**, *296*, 1270-1273.
- [56] B. J. McCarthy, J. J. Holland, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1965**, *54*, 880-886.
- [57] F. Crick, *Nature* **1970**, *227*, 561-563.
- [58] a) D. N. Wilson, K. H. Nierhaus, *Angew Chem* **2003**, *115*, 3586-3610; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 3464-3486.
- [59] V. Ramakrishnan, *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, *36*, 567-574.
- [60] a) A. Bashan, A. Yonath, *J. Mol. Struct.* **2008**, *890*, 289-294; b) A. Bashan, A. Yonath, *Trends Microbiol.* **2008**, *16*, 326-335; c) T. A. Steitz, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2008**, *9*, 242-253.
- [61] a) Y. G. Gao, M. Selmer, C. M. Dunham, A. Weixlbaumer, A. C. Kelley, V. Ramakrishnan, *Science* **2009**, *326*, 694-699; b) T. M. Schmeing, R. M. Voorhees, A. C. Kelley, Y. G. Gao, F. V. t. Murphy, J. R. Weir, V. Ramakrishnan, *Science* **2009**, *326*, 688-694; c) A. Weixlbaumer, S. Petry, C. M. Dunham, M. Selmer, A. C. Kelley, V. Ramakrishnan, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 733-737.
- [62] F. Schlunzen, A. Tocilj, R. Zarivach, J. Harms, M. Gluehmann, D. Janell, A. Bashan, H. Bartels, I. Agmon, F. Franceschi, A. Yonath, *Cell* **2000**, *102*, 615-623.
- [63] a) P. V. Cornish, D. N. Ermolenko, D. W. Staple, L. Hoang, R. P. Hickerson, H. F. Noller, T. Ha, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2009**, *106*, 2571-2576; b) J. Fei, J. E. Bronson, J. M. Hofman, R. L. Srinivas, C. H. Wiggins, R. L. Gonzalez, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2009**, *106*, 15702-15707.
- [64] a) C. Gualerzi, L. Brandi, E. Caserta, A. Lateana, R. Spurio, J. Tomsic, C. L. Pon, *The ribosome. structure,function,antibiotics, and cellular interactions.*, American Society for Microbiology, Washington, **2000**; b) P. Babitzke, C. S. Baker, T. Romeo, *Annu. Rev. Microbiol.* **2009**, *63*, 27-44.

- [65] a) M. V. Rodnina, H. Stark, A. Savelsbergh, H. J. Wieden, D. Mohr, N. B. Matassova, F. Peske, T. Daviter, C. O. Gualerzi, W. Wintermeyer, *Biol. Chem.* **2000**, *381*, 377-387; b) M. Sprinzl, S. Brock, Y. Huang, P. Milovnik, M. Nanninga, M. Nesper-Brock, H. Rutthard, K. Szkaradkiewicz, *Biol. Chem.* **2000**, *381*, 367-375.
- [66] A. P. Carter, W. M. Clemons, Jr., D. E. Brodersen, R. J. Morgan-Warren, T. Hartsch, B. T. Wimberly, V. Ramakrishnan, *Science* **2001**, *291*, 498-501.
- [67] W. Wintermeyer, F. Peske, M. Beringer, K. B. Gromadski, A. Savelsbergh, M. V. Rodnina, *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, *32*, 733-737.
- [68] A. Bashan, I. Agmon, R. Zarivach, F. Schlutzenzen, J. Harms, R. Berisio, H. Bartels, F. Franceschi, T. Auerbach, H. A. Hansen, E. Kossoy, M. Kessler, A. Yonath, *Mol. Cell.* **2003**, *11*, 91-102.
- [69] a) A. Sievers, M. Beringer, M. V. Rodnina, R. Wolfenden, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2004**, *101*, 7897-7901; b) M. V. Rodnina, M. Beringer, W. Wintermeyer, *Trends Biochem. Sci.* **2007**, *32*, 20-26; c) M. V. Rodnina, M. Beringer, W. Wintermeyer, *Q. Rev. Biophys.* **2006**, *39*, 203-225.
- [70] a) M. Valle, A. Zavialov, J. Sengupta, U. Rawat, M. Ehrenberg, J. Frank, *Cell* **2003**, *114*, 123-134; b) A. Savelsbergh, V. I. Katunin, D. Mohr, F. Peske, M. V. Rodnina, W. Wintermeyer, *Mol. Cell* **2003**, *11*, 1517-1523; c) J. Frank, R. K. Agrawal, *Nature* **2000**, *406*, 318-322; d) L. H. Horan, H. F. Noller, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2007**, *104*, 4881-4885.
- [71] D. Pan, S. V. Kirillov, B. S. Cooperman, *Mol. Cell.* **2007**, *25*, 519-529.
- [72] a) J. A. Dunkle, J. H. Cate, *Annu. Rev. Biophys.* **2010**, *39*, 227-244; b) P. G. Loh, H. Song, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 98-103; c) E. M. Youngman, M. E. McDonald, R. Green, *Annu. Rev. Microbiol.* **2008**, *62*, 353-373.
- [73] H. Gao, Z. Zhou, U. Rawat, C. Huang, L. Bouakaz, C. Wang, Z. Cheng, Y. Liu, A. Zavialov, R. Gursky, S. Sanyal, M. Ehrenberg, J. Frank, H. Song, *Cell* **2007**, *129*, 929-941.
- [74] C. Barat, P. P. Datta, V. S. Raj, M. R. Sharma, H. Kaji, A. Kaji, R. K. Agrawal, *Mol. Cell.* **2007**, *27*, 250-261.
- [75] M. C. Kiel, V. S. Raj, H. Kaji, A. Kaji, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 48041-48050.
- [76] a) M. Grunberg-Manago, J. Dondon, M. Graffe, *FEBS Lett.* **1972**, *22*, 217-221; b) N. Naaktgeboren, A. Vermaas, H. O. Voorma, *Eur. J. Biochem.* **1975**, *57*, 493-451; c) N. Naaktgeboren, P. Schrier, W. Moller, H. O. Voorma, *Eur. J. Biochem.* **1976**, *62*, 117-123; d) N. Naaktgeboren, K. Roobol, J. Gubbens, H. O. Voorma, *Eur. J. Biochem.* **1976**, *70*, 39-47; e) D. M. Cameron, J. Thompson, P. E. March, A. E. Dahlberg, *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 27-35; f) L. Brandi, S. Marzi, A. Fabbretti, C. Fleischer, W. E. Hill, C. O. Gualerzi, J. Stephen Lodmell, *J. Mol. Biol.* **2004**, *335*, 881-894; g) D. Moazed, J. M. Robertson, H. F. Noller, *Nature* **1988**, *334*, 362-364.
- [77] a) E. Cundliffe, J. Thompson, *J. Gen. Microbiol.* **1981**, *126*, 185-192; b) P. Bhuta, S. Chladek, *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *698*, 167-172; c) R. L. Gonzalez, Jr., S. Chu, J. D. Puglisi, *RNA* **2007**, *13*, 2091-2097.
- [78] a) L. Lin, J. W. Bodley, *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 1795-1798; b) E. Cundliffe, J. Thompson, *Eur. J. Biochem.* **1981**, *118*, 47-52; c) S. E. Skold, *Nucleic Acids Res.* **1983**, *11*, 4923-4932; d) S. P. Miller, J. W. Bodley, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 1657-1660; e) M. V. Rodnina, A. Savelsbergh, N. B. Matassova, V. I. Katunin, Y. P. Semenkov, W. Wintermeyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1999**, *96*, 9586-9590; f) T. Ishino, K. Atarashi, S. Uchiyama, T. Yamami, Y. Saihara, T. Yoshida, H. Hara, K. Yokose, Y. Kobayashi, Y. Nakamura, *Genes Cells* **2000**, *5*, 953-963; g) H. S. Seo, M. Kiel, D. Pan, V. S. Raj, A. Kaji, B. S. Cooperman, *Biochemistry* **2004**, *43*, 12728-12740; h) W. S. Bowen, N. Van Dyke, E. J. Murgola, J. S. Lodmell, W. E. Hill, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 2934-2943; i) H. S. Seo, S. Abedin, D. Kamp, D. N. Wilson, K. H. Nierhaus, B. S. Cooperman, *Biochemistry* **2006**, *45*, 2504-2514.
- [79] N. Brot, W. P. Tate, C. T. Caskey, H. Weissbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1974**, *71*, 89-92.
- [80] a) Y. Qin, N. Polacek, O. Vesper, E. Staub, E. Einfeldt, D. N. Wilson, K. H. Nierhaus, *Cell* **2006**, *127*, 721-733; b) S. R. Connell, M. Topf, Y. Qin, D. N. Wilson, T. Mielke, P. Fucini, K. H. Nierhaus, C. M. Spahn, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 910-915.

- [81] Z. Karim, Dissertation, FU Berlin (Berlin), **2009**.
- [82] D. Mohr, W. Wintermeyer, M. V. Rodnina, *Biochemistry* **2002**, *41*, 12520-12528.
- [83] M. Diaconu, U. Kothe, F. Schlunzen, N. Fischer, J. M. Harms, A. G. Tonevitsky, H. Stark, M. V. Rodnina, M. C. Wahl, *Cell* **2005**, *121*, 991-1004.
- [84] D. N. Wilson, K. H. Nierhaus, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *40*, 243-267.
- [85] a) R. K. Agrawal, P. Penczek, R. A. Grassucci, J. Frank, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1998**, *95*, 6134-6138; b) H. Stark, M. V. Rodnina, H. J. Wieden, F. Zemlin, W. Wintermeyer, M. van Heel, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 849-854; c) M. Valle, A. Zavialov, W. Li, S. M. Stagg, J. Sengupta, R. C. Nielsen, P. Nissen, S. C. Harvey, M. Ehrenberg, J. Frank, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 899-906.
- [86] R. K. Agrawal, J. Linde, J. Sengupta, K. H. Nierhaus, J. Frank, *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 777-787.
- [87] a) J. H. Highland, G. A. Howard, E. Ochsner, R. Hasenbank, J. Gordon, G. Stoffler, *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 1141-1145; b) J. Thompson, E. Cundliffe, M. Stark, *Eur. J. Biochem.* **1979**, *98*, 261-265; c) J. Egebjerg, S. Douthwaite, R. A. Garrett, *EMBO J.* **1989**, *8*, 607-611; d) J. Egebjerg, S. R. Douthwaite, A. Liljas, R. A. Garrett, *J. Mol. Biol.* **1990**, *213*, 275-288; e) G. Rosendahl, S. Douthwaite, *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 1013-1020.
- [88] a) G. L. Conn, D. E. Draper, E. E. Lattman, A. G. Gittis, *Science* **1999**, *284*, 1171-1174; b) B. T. Wimberly, R. Guymon, J. P. McCutcheon, S. W. White, V. Ramakrishnan, *Cell* **1999**, *97*, 491-502.
- [89] a) G. L. Conn, A. G. Gittis, E. E. Lattman, V. K. Misra, D. E. Draper, *J. Mol. Biol.* **2002**, *318*, 963-973; b) P. C. Ryan, D. E. Draper, *Biochemistry* **1989**, *28*, 9949-9956; c) Y. X. Wang, M. Lu, D. E. Draper, *Biochemistry* **1993**, *32*, 12279-12282; d) Y. Xing, D. E. Draper, *J. Mol. Biol.* **1995**, *249*, 319-331; e) D. E. Draper, Y. Xing, L. G. Laing, *J. Mol. Biol.* **1995**, *249*, 231-238; f) D. E. Draper, Y. Xing, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1995**, 5-7; g) L. B. Blyn, L. M. Risen, R. H. Griffey, D. E. Draper, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 1778-1784.
- [90] Y. Xing, D. E. Draper, *Biochemistry* **1996**, *35*, 1581-1588.
- [91] Y. Wang, H. Qin, R. D. Kudaravalli, S. V. Kirillov, G. T. Dempsey, D. Pan, B. S. Cooperman, Y. E. Goldman, *Biochemistry* **2007**, *46*, 10767-10775.
- [92] K. S. Wilson, H. F. Noller, *Cell* **1998**, *92*, 131-139.
- [93] a) G. Rosendahl, S. Douthwaite, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 357-363; b) B. T. Porse, E. Cundliffe, R. A. Garrett, *J. Mol. Biol.* **1999**, *287*, 33-45; c) B. T. Porse, I. Leviev, A. S. Mankin, R. A. Garrett, *J. Mol. Biol.* **1998**, *276*, 391-404; d) D. M. Cameron, J. Thompson, S. T. Gregory, P. E. March, A. E. Dahlberg, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 3220-3227; e) G. Lentzen, R. Klinck, N. Matassova, F. Aboul-ela, A. I. Murchie, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 769-778.
- [94] a) S. Pestka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1970**, *40*, 667-674; b) S. Pestka, D. Weiss, R. Vince, B. Wienen, G. Stoffler, I. Smith, *Mol. Gen. Genet.* **1976**, *144*, 235-241.
- [95] E. Cundliffe, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, *44*, 912-917.
- [96] a) P. C. Ryan, M. Lu, D. E. Draper, *J. Mol. Biol.* **1991**, *221*, 1257-1268; b) S. L. Bausch, E. Poliakova, D. E. Draper, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 29956-29963.
- [97] a) E. Cundliffe, *Nature* **1978**, *272*, 792-795; b) J. Thompson, F. Schmidt, E. Cundliffe, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 7915-7917; c) A. Bechthold, H. G. Floss, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *224*, 431-437; d) M. S. Dunstan, P. C. Hang, N. V. Zelinskaya, J. F. Honek, G. L. Conn, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 17013-17020.
- [98] a) H. Hummel, A. Bock, *Biochimie* **1987**, *69*, 857-861; b) J. Thompson, E. Cundliffe, A. E. Dahlberg, *J. Mol. Biol.* **1988**, *203*, 457-465.
- [99] S. B. Singh, J. Occi, H. Jayasuriya, K. Herath, M. Motyl, K. Dorso, C. Gill, E. Hickey, K. M. Overbye, J. F. Barrett, P. Masurekar, *J. Antibiot* **2007**, *60*, 565-571.
- [100] H. R. Jonker, S. Ilin, S. K. Grimm, J. Wöhnert, H. Schwalbe, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 441-454.
- [101] J. M. Harms, D. N. Wilson, F. Schlunzen, S. R. Connell, T. Stachelhaus, Z. Zaborowska, C. M. Spahn, P. Fucini, *Mol. Cell.* **2008**, *30*, 26-38.

- [102] S. R. Connell, C. Takemoto, D. N. Wilson, H. Wang, K. Murayama, T. Terada, M. Shirouzu, M. Rost, M. Schuler, J. Giesebrecht, M. Dabrowski, T. Mielke, P. Fucini, S. Yokoyama, C. M. Spahn, *Mol. Cell.* **2007**, *25*, 751-764.
- [103] a) J. H. Highland, L. Lin, J. W. Bodley, *Biochemistry* **1971**, *10*, 4404-4409; b) J. W. Bodley, L. Lin, J. H. Highland, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1970**, *41*, 1406-1411; c) E. Cundliffe, in *Structure, Function and Genetics of Ribosomes* (Eds.: B. Hardesty, G. Kramer), Springer, New York, **1986**, s. 586-604.
- [104] a) J. E. Leet, W. Li, H. A. Ax, J. A. Matson, S. Huang, R. Huang, J. L. Cantone, D. Drexler, R. A. Dalterio, K. S. Lam, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 232-242; b) W. Li, J. E. Leet, H. A. Ax, D. R. Gustavson, D. M. Brown, L. Turner, K. Brown, J. Clark, H. Yang, J. Fung-Tomck, K. S. Lam, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 226-231; c) K. L. Constantine, L. Mueller, S. Huang, S. Abid, K. S. Lam, W. Li, J. E. Leet, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7284-7285.
- [105] C. Zhang, K. Herath, H. Jayasuriya, J. G. Ondeyka, D. L. Zink, J. Occi, G. Birdsall, J. Venugopal, M. Ushio, B. Burgess, P. Masurekar, J. F. Barrett, S. B. Singh, *J. Nat. Prod.* **2009**.
- [106] a) A. Regueiro-Ren, B. N. Naidu, X. Zheng, T. W. Hudyma, T. P. Connolly, J. D. Matiskella, Y. Zhang, O. K. Kim, M. E. Sorenson, M. Pucci, J. Clark, J. J. Bronson, Y. Ueda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 171-175; b) B. N. Naidu, M. E. Sorenson, J. D. Matiskella, W. Li, J. B. Sausker, Y. Zhang, T. P. Connolly, K. S. Lam, J. J. Bronson, M. J. Pucci, H. Yang, Y. Ueda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3545-3549; c) B. N. Naidu, M. E. Sorenson, J. J. Bronson, M. J. Pucci, J. M. Clark, Y. Ueda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2069-2072; d) B. N. Naidu, M. E. Sorenson, Y. Zhang, O. K. Kim, J. D. Matiskella, J. A. Wichtowski, T. P. Connolly, W. Li, K. S. Lam, J. J. Bronson, M. J. Pucci, J. M. Clark, Y. Ueda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5573-5577; e) B. N. Naidu, M. E. Sorenson, T. Hudyma, X. Zheng, Y. Zhang, J. J. Bronson, M. J. Pucci, J. M. Clark, Y. Ueda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3743-3746; f) B. N. Naidu, M. E. Sorenson, T. P. Connolly, Y. Ueda, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 10098-10102; g) L. Xu, A. K. Farthing, J. F. Dropinski, P. T. Meinke, C. McCallum, P. S. Leavitt, E. J. Hickey, L. Colwell, J. Barrett, K. Liu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3531-3535; h) M. Wei, S. Wang, Y. Fang, Y. Chen, *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 3617-3622.
- [107] a) K. C. Nicolaou, B. S. Safina, M. Zak, A. A. Estrada, S. H. Lee, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 5087-5092; b) K. C. Nicolaou, B. S. Safina, M. Zak, S. H. Lee, M. Nevalainen, M. Bella, A. A. Estrada, C. Funke, F. J. Zecri, S. Bulat, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11159-11175; c) K. C. Nicolaou, M. Zak, B. S. Safina, A. A. Estrada, S. H. Lee, M. Nevalainen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11176-11183; d) K. C. Nicolaou, M. Zak, B. S. Safina, S. H. Lee, A. A. Estrada, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 5092-5097.
- [108] A. L. Starosta, H. Qin, A. Mikolajka, G. Y. Leung, K. Schwinghammer, K. C. Nicolaou, D. Y. Chen, B. S. Cooperman, D. N. Wilson, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1087-1096.
- [109] L. J. Prins, P. Scrimin, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2324-2343; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 2288-2306.
- [110] D. Lee, J. D. Walsh, P. Yu, M. A. Markus, T. Choli-Papadopoulou, C. D. Schwieters, S. Krueger, D. E. Draper, Y. X. Wang, *J. Mol. Biol.* **2007**, *367*, 1007-1022.
- [111] E. V. Groman, R. M. Schultz, L. L. Engel, *Methods Enzymol.* **1977**, *46*, 54-58.
- [112] a) B. Foucaud, P. Perret, T. Grutter, M. Goeldner, *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 170-173; b) A. E. Speers, B. F. Cravatt, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 41-47; c) M. Bogyo, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 229-230; d) C. Drahl, B. F. Cravatt, E. J. Sorensen, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5936-5958; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 5788-5809; e) M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3279-3301; f) S. A. Sieber, S. Niessen, H. S. Hoover, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 274-281; g) N. Jessani, B. F. Cravatt, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 54-59; h) J. Taunton, C. A. Hassig, S. L. Schreiber, *Science* **1996**, *272*, 408-411; i) M. S. Cohen, C. Zhang, K. M. Shokat, J. Taunton, *Science* **2005**, *308*, 1318-1321; j) R. A. van der Hoorn, M. A. Leeuwenburgh, M. Bogyo, M. H. Joosten, S. C. Peck, *Plant Physiol.* **2004**, *135*, 1170-1178; k) D. A. Campbell, A. K. Szardenings, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 296-303.

- [113] a) F. Wold, *Methods Enzymol.* **1977**, *46*, 3-14; b) C. Li, W. Xu, S. K. Vadivel, P. Fan, A. Makriyannis, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6423-6429; c) R. P. Picone, A. D. Khanolkar, W. Xu, L. A. Ayotte, G. A. Thakur, D. P. Hurst, M. E. Abood, P. H. Reggio, D. J. Fournier, A. Makriyannis, *Mol. Pharmacol.* **2005**, *68*, 1623-1635; d) A. Makriyannis, X. Tian, J. Guo, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2005**, *77*, 210-218; e) B. Foucaud, B. Laube, R. Schemm, A. Kreimeyer, M. Goeldner, H. Betz, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 24011-24017; f) R. O. Blaustein, P. A. Cole, C. Williams, C. Miller, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 309-311; g) A. Mourot, T. Grutter, M. Goeldner, F. Kotzyba-Hibert, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 570-583; h) J. J. Chambers, H. Gouda, D. M. Young, I. D. Kuntz, P. M. England, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13886-13887.
- [114] D. A. Erlanson, A. C. Braisted, D. R. Raphael, M. Randal, R. M. Stroud, E. M. Gordon, J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2000**, *97*, 9367-9372.
- [115] a) D. H. Bing, M. Cory, J. W. Fenton, 2nd, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 8027-8034; b) M. Cory, J. M. Andrews, D. H. Bing, *Methods Enzymol.* **1977**, *46*, 115-130; c) K. Levitsky, M. D. Boersma, C. J. Ciolli, P. J. Belshaw, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 890-899; d) Y. Takaoka, H. Tsutsumi, N. Kasagi, E. Nakata, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3273-3280.
- [116] a) O. Pongs, E. Lanka, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1975**, *72*, 1505-1509; b) H. F. Noller, *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 5297-5300.
- [117] a) O. Pongs, V. A. Erdmann, *FEBS Lett.* **1973**, *37*, 47-50; b) O. Pongs, R. Bald, T. Wagner, V. A. Erdmann, *FEBS Lett.* **1973**, *35*, 137-140; c) O. Pongs, R. Bald, V. A. Erdmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1973**, *70*, 2229-2233; d) G. Stöffler, in *Ribosomes* (Eds.: M. Nomura, A. Tissière, P. Lengyel), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, **1974**, s. 615-667.
- [118] G. Hogenauer, H. Egger, C. Ruf, B. Stumper, *Biochemistry* **1981**, *20*, 546-552.
- [119] F. Schluenzen, E. Pyetan, P. Fucini, A. Yonath, J. M. Harms, *Mol. Microbiol.* **2004**, *54*, 1287-1294.

Kapitel 2

Material und Methoden

2. Material und Methoden

2.1 Geräte

2.1.1 Standard-Laborgeräte

Produkt:

Autoklav Varioklav
BioPhotometer
Brutschrank Modell 100
Feinwaage MC 210 P
Mastercycler ep gradient S
Microfluidizer
Peristaltische Pumpe P1
pH-Meter 766
Thermocycler T3
Thermomixer comfort
Ultraschallbad Sonorex RK100
Ultraschallspitze HD2070 Sonoplus
UV-Tisch Bioview Transilluminator
Vortex Genie
Waage CP3202 S

Hersteller:

H+P Labortechnik
Eppendorf
Mettler
Sartorius
Eppendorf
Microfluidics Corporation
Pharmacia
Calimatic
Biometra
Eppendorf
Bandelin
Bandelin
Biostep
Scientific Industries
Sartorius

Schüttler und Zubehör:

Schütteladapter 8x96-Loch Platten + Sandwich Deckel
Schüttelinkubator Minitron
Schüttelinkubator Multitron
Schüttelinkubator Innova 4000
Schüttelinkubator Series 25
Schüttelinkubator 3006

System Duetz
HT Infors
HT Infors
New Brunswick Scientific
New Brunswick Scientific
GFL

Elektrophorese:

Agarosegelkammer SubCell GT
Gelelutionskammer ElectroEluter
Geltrockner Model 583
PowerPac Basic
PowerPac HV
PowerPac HC
SDS-PAGE Gelkammer Mini Protean III
SDS-PAGE Gelkammer Protean II Xi
Sequenziergelkammer SequiGen GT
Trans-Blot SD Semidry Transfer Cell

BioRad
BioRad
BioRad
BioRad
BioRad
BioRad
BioRad
BioRad
BioRad
BioRad

Zentrifugen:

Kühlzentrifuge 5417R
Ultrazentrifuge OptimaL-80 XP
Vakuumzentrifuge Concentrator 5301
Zentrifuge Minispin

Eppendorf
Beckman Coulter
Eppendorf
Eppendorf

Zentrifuge 5810R
Zentrifuge Sorvall Evolution

Zentrifuge Sorvall RC-5B
Zentrifuge Avanti J-26 XP

Eppendorf
Kendro Laboratory
Products
DuPont Instruments
Beckman Coulter

2.1.2 Spezielle Laborgeräte

Produkt:

Spektrometer und Zubehör:

Circulardichroismus-(CD)-Spektrometer J-815
+ Peltierelement PTC-423 S
Fluoreszenz-Spektrometer LS50 B
MALDI-Massenspektrometer Voyager-DE Pro
NMR-Spektrometer Varian INOVA-600
UV/VIS-Spektrometer Cary 100 Bio

Hersteller:

Jasco

Perkin Elmer
Applied Biosystems
Varian
Varian

Bio-(Phosphor)-Imager, Plattenlesegeräte und Zubehör:

Geldokumentationsanlage Gel Logic 200
Phosphor-Imager FLA-5000
Phosphor-Imaging Platten
Phosphor-Imaging Platten-Löschsystem Eraser
Plattenleser TECAN Infinite M200
Plattenleser TECAN Safire II
Szintillationszähler WALLAC 1409

Kodak
Fujifilm
Fujifilm
Raytest
TECAN
TECAN
Wallac Oy

Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC):

ÄKTA FPLC
ÄKTA Explorer
ÄKTA-Säulen:
Gelfiltrationssäule Highload 26/60 Sephadex 75 prep grade
Gelfiltrationssäule Highload 16/60 Sephadex 200 prep grade
Gelfiltrationssäule Superdex 75 10/300 GL (analytisch)
His-Trap FF crude Ni²⁺-NTA-Säule (1ml oder 5ml Matrix)

GE Healthcare
GE Healthcare

GE Healthcare
GE Healthcare
GE Healthcare
GE Healthcare

2.1.3 Software

Produkt:

Creative Suite 2
ChemBio Office 11.0
FLA-5000 V1.0
FPLC-Software Unicorn
Kodak Molecular Imaging Software
MNOVA V5.3
Origin 7.5
PyMol
Voyager Control Panel
Voyager Data Explorer

Hersteller:

Adobe
CambridgeSoft
Raytest
GE Healthcare
Kodak
MestReC
Origin Lab Corporation
DeLano Scientific
Applied Biosystems
Applied Biosystems

2.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

2.2.1 Verbrauchsmaterialien

Produkt:

Multi-Loch-Platten:
Falcon Microtest 96
Optiplate 384 black

Hersteller:

Becton Dickinson Labware
Perkin Elmer

Küvetten:

Elektroporationsküvetten GenePulser (0,1 cm)
Plastikküvetten (d = 1 cm)
UV-Küvetten Uvette (d = 1 cm)

BioRad
Sarstedt
Eppendorf

Filtration:

Amicon (Ultrafiltration) 15 ml, 10 kDa cut-off
0,5 ml, 3 kDa cut-off
Bottle Top Vakuum-Sterilfilter
illustra Minispin G25/G50 Gelfiltrationssäulen
NAP-5 Gelfiltrationssäulen
PD-10-Gelfiltrationssäulen
Röntgenfilm CL-XPosure

Millipore

Nalgene
GE Healthcare
GE Healthcare
GE Healthcare
Pierce

2.2.2 Kits

Produkt:

MEGAscript T7 in vitro Transkriptionskit

Hersteller:

Ambion/Applied
Biosystems
Ambion/Applied
Biosystems

MEGashortscript T7 in vitro Transkriptionskit

Omniscript Reverse Transkriptase Kit
Plasmid Midi Kit
QIAquick Gelextraktionskit
QIAquick PCR Purification Kit
QIAprep Spin Miniprep Kit

Qiagen
Qiagen
Qiagen
Qiagen
Qiagen

RNA Grade Ribonuclease Kit

Ambion/Applied
Biosystems
Roche Diagnostics

RTS 100 *E.coli* HY Kit

Kristallisationsscreen Kits:

JCSG Suite I-III, Protein Complex Suite
und Nucleix Suite

Qiagen

2.2.3 Allgemeine Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Feinchemikalien wurden, falls nicht gesondert aufgeführt, in höchster Reinheit von den Firmen Carl-Roth, Merck, Life

Technologies, Gerbu, J.T. Buker, MP Biomedicals, Sigma-Aldrich, BD Biosciences, Bacton, Dickinson & Co, Fisher Scientific und Acros Organics bezogen. Sämtliche wässrige Lösungen (Pufferlösungen, etc.) wurden mit Millipore-H₂O (18,2 MΩ) hergestellt.

2.2.4 Spezielle Feinchemikalien

Produkt:

¹⁵ N-Ammoniumchlorid	ISOTEC/Sigma-Aldrich
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β-D-Galactosid (X-Gal)	Amersham-Biosciences
γ- ³² P-ATP (150 mCi/ml; 6000 Ci/mmol)	Perkin Elmer
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Gerbu
Glykogen	Fermentas
Iodacetamid (IAA)	Sigma-Aldrich
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich
Sigmacote [®]	Sigma-Aldrich
Tris-(2-Carboxyethyl)-phosphine (TCEP)	Sigma-Aldrich

2.2.5 Harze & Beads

Produkt:

Dynabeads Streptavidin Trial Kit	Hersteller: Invitrogen
Faktor Xa Removal Resin	Qiagen
Ni ²⁺ -NTA-Agarose-Beads	Qiagen
Streptavidin Magnetic Beads	New England Biolabs
Sulfolink Coupling Resin	Pierce

2.2.6 Elektrophorese-Größenstandards

a) Protein

Produkt:

Precision Plus Protein Standard, Dual Color	Hersteller: BioRad
SeeBlue-2	Invitrogen
Unstained Protein Molecular Weight Marker	Fermentas

b) DNA

Produkt:

GeneRuler (100 – 1000 bp)	Hersteller: Fermentas
GeneRuler (250 – 10000 bp)	Fermentas

2.3 Enzyme

Produkt:

Alkalische Phosphatase (Calf Intestine Phosphatase, CIP)

Faktor Xa

Lysozym (Muramidase)

Omniscrypt Reverse Transkriptase

Pepsin

Pfu-DNA-Polymerase

Restriktionsendonukleasen (+10× Puffer)

Taq-DNA-Polymerase

T7-RNA-Polymerase

T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK)

T4-DNA-Ligase

Trypsin (Proteomics Grade)

Hersteller:

Fermentas

Qiagen

Fluka

Qiagen

Carl-Roth

Fermentas

Fermentas,

New England Biolabs,

Fermentas

Fermentas

Fermentas

Fermentas

Roche Diagnostics

2.4 Ribosomale Faktoren und 20S Proteasom

Bei allen verwendeten ribosomalen Faktoren aus *Escherichia coli* handelt es sich um heterolog in *E. coli* überexprimierte und affinitätsgereinigte Konstrukte. Die Konstrukte wurden in gereinigter Form freundlicherweise von Dr. Florian Seebeck (MPI für molekulare Physiologie, Dortmund) zur Verfügung gestellt. Ribosomale Faktoren: Methionyl-tRNA-Formyltransferase (MTF, ϵ_{280} : 45000 cm⁻¹ M⁻¹), Initiationsfaktor 1 (IF-1, ϵ_{280} : 2560 cm⁻¹ M⁻¹), Initiationsfaktor 2 (IF-2, ϵ_{280} : 25550 cm⁻¹ M⁻¹), Initiationsfaktor 3 (IF-3, ϵ_{280} : 3870 cm⁻¹ M⁻¹), Elongationsfaktor Tu (EF-Tu, ϵ_{280} : 18500 cm⁻¹ M⁻¹), Elongationsfaktor TS (EF-Ts, ϵ_{280} : 3900 cm⁻¹ M⁻¹), Elongationsfaktor G (EF-G, ϵ_{280} : 5855 cm⁻¹ M⁻¹), Releasefaktor 1 (RF-1, ϵ_{280} : 20431 cm⁻¹ M⁻¹), Releasefaktor 3 (RF-3, ϵ_{280} : 39580 cm⁻¹ M⁻¹), Ribosomaler Recyclingfaktor (RRf, ϵ_{280} : 2590 cm⁻¹ M⁻¹). Das 20S Proteasom (700 kDa, 20 mg/ml) aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde in gereinigter Form von Prof. M. Groll (TU München) erhalten.

2.5 Plasmide

a) Plasmid	Eigenschaft	Herkunft
pUC19	Klonierungsvektor	Carl-Roth
pNDNA	pUC19-Derivat, enthält die Information für ein 58 nt Fragment der <i>Escherichia coli</i> 23 S rRNA (1051-1109) unter Kontrolle eines T7-Promotors, <i>EcoRI/XbaI</i> kloniert	diese Arbeit
pSDNA	pNDNA-U1061A-Mutante	diese Arbeit
pA1067C	pNDNA-A1067C-Mutante	diese Arbeit
pA1067U	pNDNA-A1067T-Mutante	diese Arbeit
pA1067G	pNDNA-A1067G-Mutante	diese Arbeit
pA1095C	pNDNA-A1095C-Mutante	diese Arbeit
pA1095U	pNDNA-A1095T-Mutante	diese Arbeit
pA1095G	pNDNA-A1095G-Mutante	diese Arbeit
pU1066C	pNDNA-U1066C-Mutante	diese Arbeit
pG1068U	pNDNA-G1068U-Mutante	diese Arbeit
pA1098G	pNDNA-A1098G-Mutante	diese Arbeit
b) Plasmid		
pQE30 <i>Xa</i>	Expressionsvektor; durch T5-Promotor gesteuertes <i>E.coli</i> Expressions-system für N-terminal His ₆ -markierte Fusionsproteine; Faktor <i>Xa</i> Schnittstelle zum Entfernen der Markierung	Qiagen
pEcoL11	pQE30 <i>Xa</i> -Derivat, enthält den offenen Leserahmen (ORF) des ribosomalen Proteins L11 aus <i>E. coli</i> (rplK-Gen), <i>StuI/BamHI</i> kloniert	diese Arbeit
pEcoL11 A63C	pEcoL11-Derivat mit dem Aminosäureaustausch A63C	diese Arbeit
pTthL11	pQE30 <i>Xa</i> -Derivat, enthält den ORF des ribosomalen Proteins L11 aus <i>Thermus thermophilus</i> (rplK-Gen), <i>StuI/BamHI</i> kloniert	diese Arbeit
pTthL11 M1C	pTthL11-M1C-Mutante	diese Arbeit
pTthL11 V7C	pTthL11-V7C-Mutante	diese Arbeit
pTthL11 L10C	pTthL11-L10C-Mutante	diese Arbeit
pTthL11 Q11C	pTthL11-Q11C-Mutante	diese Arbeit
pTthL11 A20C	pTthL11-A20C-Mutante	diese Arbeit
pTthL11 P21S	pTthL11-P21S-Mutante	diese Arbeit
pTthL11 P22S	pTthL11-P22S-Mutante	diese Arbeit
pTthL11 G24C	pTthL11-G24C-Mutante	diese Arbeit
pTthL11 P25C	pTthL11-P25C-Mutante	diese Arbeit
pTthL11 A26C	pTthL11-A26C-Mutante	diese Arbeit
pTthL11 Q29C	pTthL11-Q29C-Mutante	diese Arbeit
pTthL11 H30C	pTthL11-H30C-Mutante	diese Arbeit
pTthL11 G31C	pTthL11-G31C-Mutante	diese Arbeit
pTthL11 A32C	pTthL11-A32C-Mutante	diese Arbeit
pTthL11 I34C	pTthL11-I34C-Mutante	diese Arbeit
pTthL11 M35C	pTthL11-M35C-Mutante	diese Arbeit
pTthL11 V38C	pTthL11-V38C-Mutante	diese Arbeit
pTthL11 P55H	pTthL11-P55H-Mutante	diese Arbeit
c) Plasmid		
pHT08	<i>E. coli-Bacillus subtilis</i> Shuttlevektor-System, ermöglicht die heterologe Expression von N-terminal His ₈ -markierten Fusionsproteinen in <i>B. subtilis</i>	MoBiTec

pHTT <i>thwt</i>	pHT08-Derivat, enthält den ORF des ribosomalen Proteins L11 aus <i>Thermus thermophilus</i> (rplK-Gen), <i>Bam</i> HI/ <i>Xba</i> I kloniert	diese Arbeit
pHTT <i>thP21S</i>	pHTT <i>thL11</i> -P21S-Mutante	diese Arbeit
pHTT <i>thP22S</i>	pHTT <i>thL11</i> -P22S-Mutante	diese Arbeit
pHTT <i>thG24C</i>	pHTT <i>thL11</i> -G24C-Mutante	diese Arbeit
pHTT <i>thP25C</i>	pHTT <i>thL11</i> -P25C-Mutante	diese Arbeit
pHTT <i>thG31C</i>	pHTT <i>thL11</i> -G31C-Mutante	diese Arbeit
pHTT <i>thP55H</i>	pHTT <i>thL11</i> -P55H-Mutante	diese Arbeit

2.6 Antikörper

Antikörper (Verdünnung)	Antigen	Hersteller
α-His ₅ monoklonaler Maus IgG (1:2000)	His ₅ -Epitope	Qiagen
α-His ₅ monoklonaler Maus IgG-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (1:1000)	His ₅ -Epitope	Qiagen
Ziege-α-Maus-IgG-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (1:15000)	Schwere und leichte Kette von Maus-Immunglobulinen	Pierce

2.7 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Oligonukleotide wurden in synthetischer Form von den Firmen Eurofins MWG Operon bzw. Metabion bezogen.

2.7.1 Herstellung von Fragmenten der 23S rRNA aus *Escherichia coli*

Start-Oligonukleotid (vorwärts) Wildtyp (5' → 3'):
AATTCTAATACGACTCACTATAGGCCAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCATTTAAAGAAAGCGTAATAGCTCACTGGT
Start-Oligonukleotid (rückwärts) Wildtyp (5' → 3'):
CTAGACCAGTGAGCTATTACGCTTTCTTTAAATGATGGCTGCTTCTAAGCCAACATCCTGGCCTATAGTGAGTCGTATTAG
Start-Oligonukleotid (vorwärts) U1061A (5' → 3'):
AATTCTAATACGACTCACTATAGGCCAGGATGTAGGCTTAGAAGCAGCCATCATTTAAAGAAAGCGTAATAGCTCACTGGT
Start-Oligonukleotid (rückwärts) U1061A (5' → 3'):
CTAGACCAGTGAGCTATTACGCTTTCTTTAAATGATGGCTGCTTCTAAGCCTACATCCTGGCCTATAGTGAGTCGTATTAG
Start-Oligonukleotid (vorwärts) T1066C (5' → 3'):
AATTCTAATACGACTCACTATAGGCCAGGATGTTGGCTCAGAAGCAGCCATCATTTAAAGAAAGCGTAATAGCTCACTGGT
Start-Oligonukleotid (rückwärts) T1066C (5' → 3'):
CTAGACCAGTGAGCTATTACGCTTTCTTTAAATGATGGCTGCTTCTGAGCCAACATCCTGGCCTATAGTGAGTCGTATTAG
Start-Oligonukleotid (vorwärts) A1067T (5' → 3'):
AATTCTAATACGACTCACTATAGGCCAGGATGTTGGCTTTGAAGCAGCCATCATTTAAAGAAAGCGTAATAGCTCACTGGT
Start-Oligonukleotid (rückwärts) A1067T (5' → 3'):
CTAGACCAGTGAGCTATTACGCTTTCTTTAAATGATGGCTGCTTCAAAGCCAACATCCTGGCC TATAGTGAGTCGTATTAG
Start-Oligonukleotid (vorwärts) A1067C (5' → 3'):
AATTCTAATACGACTCACTATAGGCCAGGATGTTGGCTTGAAGCAGCCATCATTTAAAGAAAGCGTAATAGCTCACTGGT
Start-Oligonukleotid (rückwärts) A1067C (5' → 3'):
CTAGACCAGTGAGCTATTACGCTTTCTTTAAATGATGGCTGCTTGAAGCCAACATCCTGGCCTATAGTGAGTCGTATTAG
Start-Oligonukleotid (vorwärts) A1067G (5' → 3'):
AATTCTAATACGACTCACTATAGGCCAGGATGTTGGCTTGAAGCAGCCATCATTTAAAGAAAGCGTAATAGCTCACTGGT
Start-Oligonukleotid (rückwärts) A1067G (5' → 3'):
CTAGACCAGTGAGCTATTACGCTTTCTTTAAATGATGGCTGCTTCAAAGCCAACATCCTGGCCTATAGTGAGTCGTATTAG
Start-Oligonukleotid (vorwärts) G1068T (5' → 3'):
AATTCTAATACGACTCACTATAGGCCAGGATGTTGGCTTATAAGCAGCCATCATTTAAAGAAAGCGTAATAGCTCACTGGT

Start-Oligonukleotid (rückwärts) G1068T (5'→3'):

CTAGACCAGTGAGCTATTACGCTTTCTTTAAATGATGGCTGCTTATAAGCCAACATCCTGGCCTATAGTGAGTCGTATTAG

Start-Oligonukleotid (vorwärts) A1089G (5'→3'):

AATTCTAATACGACTCACTATAGGCCAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCATTTAAAGAGAGCGTAATAGCTCACTGGT

Start-Oligonukleotid (rückwärts) A1089G (5'→3'):

CTAGACCAGTGAGCTATTACGCTCTCTTTAAATGATGGCTGCTTAAAGCCAACATCCTGGCCTATAGTGAGTCGTATTAG

Start-Oligonukleotid (vorwärts) A1095T (5'→3'):

AATTCTAATACGACTCACTATAGGCCAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCATTTAAAGAAAGCGTTATAGCTCACTGGT

Start-Oligonukleotid (rückwärts) A1095T (5'→3'):

CTAGACCAGTGAGCTATAACGCTTTCTTTAAATGATGGCTGCTTAAAGCCAACATCCTGGCCTATAGTGAGTCGTATTAG

Start-Oligonukleotid (vorwärts) A1095C (5'→3'):

AATTCTAATACGACTCACTATAGGCCAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCATTTAAAGAAAGCGTCATAGCTCACTGGT

Start-Oligonukleotid (rückwärts) A1095C (5'→3'):

CTAGACCAGTGAGCTATACGCTTTCTTTAAATGATGGCTGCTTAAAGCCAACATCCTGGCCTATAGTGAGTCGTATTAG

Start-Oligonukleotid (vorwärts) A1095G (5'→3'):

AATTCTAATACGACTCACTATAGGCCAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCATTTAAAGAAAGCGTGATAGCTCACTGGT

Start-Oligonukleotid (rückwärts) A1095G (5'→3'):

CTAGACCAGTGAGCTATACGCTTTCTTTAAATGATGGCTGCTTAAAGCCAACATCCTGGCCTATAGTGAGTCGTATTAG

2.7.2 Klonierung des *rplK*-Gens aus *Escherichia coli*

EcoL11 wt Start-Oligonukleotid (vorwärts) (5'→3'):

ATGGCTAAGAAAGTACAAGCCTATGTC

EcoL11 wt Start-Oligonukleotid (rückwärts) (5'→3'):

TTAGGATCCTTAGTCCTCCACTACCA

2.7.3 *In vitro* Mutagenese des *rplK*-Gens aus *Escherichia coli*

EcoL11 A63C Start-Oligonukleotid (vorwärts) (5'→3'):

CCGGTAGTAATCACCGTTTACTGCGACCGTTCTTCACTTTCGT

EcoL11 A63C Start-Oligonukleotid (rückwärts) (5'→3'):

AGTGAAAGAACGGTCGCAGTAAACGGTGATTACTACCGGAATCG

2.7.4 Klonierung des *rplK*-Gens aus *Thermus thermophilus*

a) zur heterologen Expression in *E. coli*

ThL11 wt Start-Oligonukleotid (vorwärts) (5'→3'): ATGAAGAAAGTCGTTGCGGTGGTC

ThL11 wt Start-Oligonukleotid (rückwärts) (5'→3'): TAGGATCCTTAGGCATCCTTCACCTCCGGAG

b) zur heterologen Expression in *B. subtilis*

ThL11 wt Start-Oligonukleotid (vorwärts) (5'→3'): TAGGATCCATGAAGAAAGTCGTTGCGGTGGTC

ThL11 wt Start-Oligonukleotid (rückwärts) (5'→3'): TATCTAGATTAGGCATCCTTCACCTCCGGAG

2.7.5 *In vitro* Mutagenese des *rplK*-Gens aus *Thermus thermophilus*

ThL11 M1C

Start-Oligonukleotid (vorwärts) (5'→3'): TCTGGTATCGAGGGAAGGTGTAAGAAAGTCGTTGCGGTG

Start-Oligonukleotid (rückwärts) (5'→3'): CACCGCAACGACTTTCTTACACCTCCCTCGATACCAAG

ThL11 V7C

Start-Oligonukleotid (vorwärts) (5'→3'): ATGAAGAAAGTCGTTGCGTGTGTCAAACCTTCAGCTGCCC

Start-Oligonukleotid (rückwärts) (5'→3'): GGGCAGCTGAAGTTTGACACACGCAACGACTTTCTTC

ThL11 L10C

Start-Oligonukleotid (vorwärts) (5'→3'): GTCGTTGCGGTGGTCAAATGTCAGCTGCCCGCGGGCAAG

Start-Oligonukleotid (rückwärts) (5'→3'): CTTGCCCGCGGGCAGCTGACATTTGACCACCGCAACGAC

TthL11 Q11C

Start-Oligonukleotid (vorwärts) (5' → 3'): GTTGCGGTGGTCAAACCTTGTCTGCCCGCGGGCAAGGCC

Start-Oligonukleotid (rückwärts) (5' → 3'): GGCCTTGCCCGCGGGCAGACAAAGTTTGACCACCGCAAC

TthL11 A20C

Start-Oligonukleotid (vorwärts) (5' → 3'): CGGGCAAGGCCACGCCCTGTCCCCGGTGGGCCCGGC

Start-Oligonukleotid (rückwärts) (5' → 3'): GCCGGGCCACCGGGGGACAGGGCGTGGCCTTGCCCG

TthL11 P21S

Start-Oligonukleotid (vorwärts) (5' → 3'): GCCACGCCCGCGTCCCCGGTGGGCCCG

Start-Oligonukleotid (rückwärts) (5' → 3'): CGGGCCACCGGGGACGCGGGCGTGGC

TthL11 P22S

Start-Oligonukleotid (vorwärts) (5' → 3'): CACGCCCGCGCCCTCGGTGGGCCCGGC

Start-Oligonukleotid (rückwärts) (5' → 3'): GCCGGGCCACCGAGGGCGCGGGCGTG

TthL11 G24C

Start-Oligonukleotid (vorwärts) (5' → 3'): ACGCCCGCGCCCCGGTGTGTCGGCTTTGGGCCAGCAC

Start-Oligonukleotid (rückwärts) (5' → 3'): GTGCTGGCCAAAGCCGGACACACCGGGGGCGCGGGCG

TthL11 P25C

Start-Oligonukleotid (vorwärts) (5' → 3'): CCCCGCCCCCGGTGGGCTGTGCTTTGGGCCAGCACG

Start-Oligonukleotid (rückwärts) (5' → 3'): CGTGCTGGCCAAAGCACAGCCACCGGGGGCGCGGG

TthL11 A26C

Start-Oligonukleotid (vorwärts) (5' → 3'): GCGCCCCGGTGGGCCCGTGTGGGCCAGCACGGGGCC

Start-Oligonukleotid (rückwärts) (5' → 3'): GGCCCCGTGCTGGCCAAACACGGGGCCACCGGGGGCGC

TthL11 Q29C

Start-Oligonukleotid (vorwärts) (5' → 3'): GTGGGCCGGCTTTGGGCTGTACGGGGCCAACATCATG

Start-Oligonukleotid (rückwärts) (5' → 3'): CATGATGTTGGCCCCGTGACAGCCAAAGCCGGGCCAC

TthL11 H30C

Start-Oligonukleotid (vorwärts) (5' → 3'): GGCCCGGCTTTGGGCCAGTGTGGGGCCAACATCATGGAG

Start-Oligonukleotid (rückwärts) (5' → 3'): CTCCATGATGTTGGCCCCACACTGGCCAAAGCCGGGCC

TthL11 G31C

Start-Oligonukleotid (vorwärts) (5' → 3'): GGCCAGCACTGCGCCAACATCATG

Start-Oligonukleotid (rückwärts) (5' → 3'): CATGATGTTGGCGCAGTGTGCTGGCC

TthL11 A32C

Start-Oligonukleotid (vorwärts) (5' → 3'): GCTTTGGGCCAGCACGGGTGTAACATCATGGAGTTCGTC

Start-Oligonukleotid (rückwärts) (5' → 3'): GACGAACTCCATGATGTTACACCCGTGCTGGCCAAAGC

TthL11 I34C

Start-Oligonukleotid (vorwärts) (5' → 3'): GGCCAGCACGGGGCCAACACTGTATGGAGTTCGTCGAAGGCC

Start-Oligonukleotid (rückwärts) (5' → 3'): GGCCTTGACGAACTCCATACAGTTGGCCCCGTGCTGGCC

TthL11 M35C

Start-Oligonukleotid (vorwärts) (5' → 3'): CAGCACGGGGCCAACATCTGTGAGTTCGTCGAAGGCCTTC

Start-Oligonukleotid (rückwärts) (5' → 3'): GAAGGCCTTGACGAACTCACAGATGTTGGCCCCGTGCTG

TthL11 V38C

Start-Oligonukleotid (vorwärts) (5' → 3'): GCCAACATCATGGAGTTCGTAAGGCCTTCAACGCGGCC

Start-Oligonukleotid (rückwärts) (5' → 3'): GGCCGCGTTGAAGGCCTTACAGAACTCCATGATGTTGGC

TthL11 P55H

Start-Oligonukleotid (vorwärts) (5' → 3'): GCCATCGTCCACGTGGAGATCACC

Start-Oligonukleotid (rückwärts) (5' → 3'): GGTGATCTCCACGTGGACGATGGC

2.8 Bakterienstämme

a) *Escherichia coli*

Stamm	Eigenschaft (Quelle)	Referenz
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qΔM15 Tn10(Tet^r)</i>] (Stratagene)	Bullock <i>et al.</i> ^[1]
Omnimax	[F' <i>proAB lacI^qΔM15 Tn10(Tet^r) Δ(ccdAB)</i>] <i>mcrA</i> <i>Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80(lacZ)ΔM15</i>	Blumenthal <i>et al.</i> ^[2]

BW25113 <i>ΔrplK</i>	<i>Δ(lacZYA-argF)</i> U169 <i>endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD</i> (Invitrogen) <i>lacI^q rrnB_{T14} ΔlacZ_{WJ16} hsdR514 ΔaraBAD_{AH33} ΔrhaBAD_{LD78}</i> (Keio-Collection, GenoBase)	Baba <i>et al.</i> ^[3]
-------------------------	---	-----------------------------------

b) *Bacillus subtilis*

Stamm	Eigenschaft (Quelle)	Referenz
1012	<i>leuA8, metB5, r-M, m+M</i> (Dr. H. Nguyen, CGC Dortmund)	Saito <i>et al.</i> ^[4]
IS169	<i>trpC2 thr-5 tsp-6 (rplK57)</i> (Prof. W. Haldenwang, University of San Antonio)	Smith <i>et al.</i> ^[5]

c) *Thermus thermophilus*

Stamm	Eigenschaft (Quelle)	Referenz
HB8	ATCC27634 (DSMZ)	Oshima <i>et al.</i> ^[6]

2.9 Naturstoffe und Derivate

a) *Thiopeptide*

Bezeichnung	Quelle	Referenz
Thiostrepton	Calbiochem	Donovick <i>et al.</i> ^[7]
Thiostrepton-Derivate	Semisynthese Dipl. Biochem. S. Schoof (MPI Dortmund)	Schoof <i>et al.</i> ^[8] & unpubliziert
Nosiheptid (Multhiomycin)	Prof. H. G. Floss (University of Washington), Prof. T. Mahmud (Oregon State University)	Tanaka <i>et al.</i> ^[9]
Nosiheptid-Derivate	Totalsynthese: Dr. J.-Y Lu + Dr. M. Riedrich (MPI Dortmund)	Lu <i>et al.</i> ^[10] Riedrich <i>et al.</i> ^[11]
Micrococcin	Dr. K. Shin-Ya (Biomedical Information research Center, BIRC, Tokyo)	Su <i>et al.</i> ^[12]
Promothiocin B	Dr. K. Shin-Ya (Biomedical Information research Center, BIRC, Tokyo)	Yun <i>et al.</i> ^[13]
Promoinducin	Dr. K. Shin-Ya (Biomedical Information research Center, BIRC, Tokyo)	Yun <i>et al.</i> ^[14]
Thiotipin	Dr. K. Shin-Ya (Biomedical Information research Center, BIRC, Tokyo)	Yun <i>et al.</i> ^[15]

b) *weitere Naturstoffe*

Bezeichnung	Quelle	Referenz
Biphenomycin B	Totalsynthese: Dipl. Chem. Y. He & Dr. L. Arve (MPI Dortmund)	Ezaki <i>et al.</i> ^[16] Waldmann <i>et al.</i> ^[17]
Biphenomycin-B-Derivate	Totalsynthese: Dipl. Chem. Y. He & Dr. L. Arve (MPI Dortmund)	Dissertation L. Arve ^[18] & unpubliziert

Kirromycin	Isolat: Prof. S. Grond (Eberhard Karls Universität Tübingen)	Wolf <i>et al.</i> ^[19] Weber <i>et al.</i> ^[20]
RAVII-Derivate	Totalsynthese: Dr. B. Kilitoglu (MPI Dortmund)	Dissertation B. Kilitoglu ^[21]

2.9.1 Lagerung, Lösung und Konzentrationsbestimmung verschiedener Naturstoffe

Zur langfristigen Lagerung wurden die im Rahmen dieser Arbeit studierten Naturstoffe lösungsmittelfrei bei -20°C aufbewahrt.

Bei allen schlecht-wasserlöslichen Substanzen wurde statt des meist verwendeten DMSO, als Standard-Lösungsmittel für Stammlösungen, der Alkohol Trifluorethanol (TFE) verwendet. DMSO-Lösungen verschiedener Thiopeptide färbten sich trotz sachgerechter Lagerung (+4°C/-20°C) nach relativ kurzer Zeit gelb und zeigten drastisch veränderte Bioaktivitäten. TFE-Lösungen von Thiopeptiden waren bei 4°C über lange Zeiträume (bis zu 6 Monate) stabil. TFE sorgte außerdem bei Konzentrationen bis 5 Vol.-%, für eine sehr gute Löslichkeit der Verbindungen in wässrigen RNA-Protein-Puffergemischen, ohne eine messbare Verschlechterung der Qualität von Protein und RNA zu verursachen. Die genaue Konzentration verschiedener Naturstoffe in Lösung wurde per Einwaage über das Molekulargewicht bzw. bei bekannten Extinktionskoeffizienten nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bestimmt:

$$(1) \quad \text{Lambert-Beer: } c = \frac{E}{d \times \epsilon}$$

mit C: molare Konzentration der Verbindung, E: Extinktion, d: Schichtdicke der Messküvette (in cm), ϵ : molarer Extinktionskoeffizient

Thiostrepton und Derivate ($\epsilon_{280} = 0.027 \text{ cm}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$);^[8] Nosiheptid ($\epsilon_{280} = 0.039 \text{ cm}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$);^[8] Micrococcin ($\epsilon_{280} = 0.034 \text{ cm}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$);^[8] Promothiocin B ($\epsilon_{313} = 0.010 \text{ cm}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$);^[13] Promoinducin ($\epsilon_{315} = 0.015 \text{ cm}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$);^[14] fluoreszente Thiostreptonsonden ($\epsilon_{492} = 0.078 \text{ cm}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$);^[8] Biphenomycin B und Derivate ($\epsilon_{280} = 0,0235 \text{ cm}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$);^[16] Thiotipin (MW: 1271,23 g/mol);^[15] Kirromycin (MW: 796,94 g/mol);^[19] Chloramphenicol ($\epsilon_{274} = 0.00085 \text{ cm}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$);^[22] Kanamycin (MW: 484,5 g/mol).

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 Anzucht und Lagerung von Bakterien

2.10.1.1 Anzucht von *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*

Die Anzucht von *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* zu Klonierungs- bzw. Expressionszwecken kann entweder in Flüssigkulturen (4 bis 2000 ml) oder auf Festmedium in Petrischalen („Agarplatten“) durchgeführt werden. Im Falle des Flüssigmediums wurde das Vollmedium 2YT (Ausubel et al.^[23]) eingesetzt, welches kurz vor dem Animpfen zur Selektion mit einem entsprechenden Antibiotikum (Stammlösung 1:1000) versetzt wurde. Zur Herstellung des Festmediums (Luria-Bertani-Agar)^[23] wurde die flüssige Nährlösung vor dem Autoklavieren mit 1,5 Gew.-% Bacto-Agar versetzt. Nach dem Abkühlen unter 50°C konnten die gewünschten Antibiotika (Stammlösung 1:1000) hinzugefügt werden. Für ein optimales Wachstum der Zellen wurden diese nach dem Animpfen bzw. Ausplattieren im Falle der Flüssigkulturen über Nacht im Orbital-Schüttler (180 rpm) oder im Falle des LB-Mediums im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2YT-Medium	LB-Medium	Antibiotika-Stammlösungen
1,6 Gew.-% Trypton	1,0 Gew.-% Trypton	Ampicillin (100 mg/ml)
1 Gew.-% Hefeextrakt	0,5 Gew.-% Hefeextrakt	Chloramphenicol (50 mg/ml)
0,5 Gew.-% NaCl	1 Gew.-% NaCl	Kanamycin (50mg/ml)
pH 7.5 mit NaOH	pH 7.5 mit NaOH	Carbenicillin (100 mg/ml)
dampfsterilisiert	dampfsterilisiert	Erythromycin (10 mg/ml)
		sterilfiltriert (0,2 µm Filter)

2.10.1.2 Anzucht von *Thermus thermophilus*

Thermus thermophilus HB8 wurde zur Präparation von genomischer DNA in 50 ml *Thermus thermophilus* Medium in Anlehnung an Oshima et al.^[6] bei 75°C unter starkem Schütteln (220 rpm) angezogen.

Thermus thermophilus Medium

0,4 Gew.-% Hefeextrakt	pH 7.4 mit NaOH
0,8 Gew.-% Polypepton	dampfsterilisiert
0,2 Gew.-% NaCl	

2.10.1.3 Wachstumsanalysen von Bakterien

Zur Wachstumsanalyse bakterieller Zellen wurden 40 ml LB-Medium steril mit einer frischen ü.N.-Kultur des gewünschten Bakterienstamms zu einer optischen Dichte von 0,1 bei 600 nm (OD_{600}) angeimpft. Die Bakterien wurden bei 37°C (180 rpm) kultiviert und zu definierten Zeitpunkten Proben zur Bestimmung der OD_{600} genommen. Das Experiment wurde bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase durchgeführt.

2.10.2 Stammkulturen/Glycerinkulturen

Zum Anlegen einer bakteriellen Stammkultur wurde 0,5-1 ml einer 4 ml ü.N.-Kultur 1:1 mit sterilem 50%igen Glycerin gemischt und konnte so für nahezu unbegrenzte Zeit bei -80 °C aufbewahrt werden.

2.10.3 PCR (Polymerase chain reaction)

Die präparative Vervielfältigung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), unter Verwendung thermostabiler DNA-Polymerase (*Pfu*-DNA-Polymerase inkl. 10× Puffer, Fermentas).^[24]

Pro Reaktionsansatz (50 µl) wurden auf Eis folgende Komponenten gemischt (PCR-Mix):

10-200 pg DNA-Templat (genomische DNA, Plasmide, etc.)

5 µl 10×*Pfu*-Puffer

5 µl dNTPs (2 mM Stammlösung, Fermentas)

5 µl jedes Primers (10 µM Stammlösung)

0,5 µl *Pfu*-DNA-Polymerase (1-2 U)

Die PCR wurde in einem Mastercycler ep gradient S (Eppendorf) durchgeführt.

Standardprogramm: (X = Schmelztemperatur des Primers (T_M) – 5 °C)

Initiale Schmelzphase: 5 min bei 94°C

Amplifikationsschleife: 35 Zyklen:

30 s, 94°C Schmelzphase

45 s, X°C Anlagerung der Primer (Annealing)

120 s, 72°C Synthese des neuen DNA-Stranges (Elongation)

Abschließende Elongation: 5 min 72°C

Lagerungstemperatur: 4°C, ∞

Im Anschluss an die PCR wurden die Reaktionsansätze mittels des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben von dNTPs befreit, die PCR-Produkte mittels Agarose-gelelektrophorese analysiert und das gewünschte Fragment gelgereinigt (2.10.12-13).

2.10.3.1 Kolonie-PCR

Zur analytischen Amplifikation von DNA-Fragmenten (z.B. zur Kontrolle von Ligationen, etc.) wurde die so genannte Kolonie-PCR verwendet. Hierzu wurde mit einem sterilisiertem Zahnstocher die gewünschte Kolonie auf einer Bakterienplatte angestochen, im PCR-Mix gelöst und die PCR entsprechend 2.10.3 durchgeführt.

2.10.4 *In vitro* Mutagenese

Mutagenese-Primer sowie die PCR-basierte *in vitro* Mutagenese wurde in Anlehnung an die "Site-directed Mutagenesis by Whole Plasmid Synthesis"-Technik (QuikChange[®]-Protokoll (Stratagene)) erstellt und durchgeführt (*Pfu*-DNA-Polymerase inkl. 10× Puffer, Fermentas).^[25] Die gewünschte Punktmutation wird hierbei in die Mitte von relativ langen (30-40bp) komplementären Primerpaaren (vgl. 2.7.5) eingefügt, welche als Startpunkt für eine vollständige Neusynthese des Templat-Plasmids dienen (vgl. Abbildung 2.1). Im Laufe der PCR entstehen so neben der Ausgangs-Templat-DNA, Templat-DNA/Mutanten-DNA-Hybride und reine Mutanten-Plasmide. Zur Abtrennung der Templat-Plasmide wurde die Restriktionsendonuklease *DpnI* verwendet, welche an Nukleobasen methylierte Templat-Plasmide hydrolysiert. Die Templat-Plasmide aus bakteriellen Quellen tragen solche Methylierungen. PCR-amplifizierte DNA-Fragmente sind dagegen unmethyliert und werden nicht gespalten.

Pro Reaktionsansatz (50 µl) wurde auf Eis folgender PCR-Mix erstellt:

10-200 pg DNA-Templat (*pEcoL11*, *pTthL11*)

5 µl 10×*Pfu*-Puffer

5 µl dNTPs (2 mM Stammlösung, Fermentas)

5 µl jedes Primers (10 µM Stammlösung)

0,5 µl *Pfu*-DNA-Polymerase (1-2 U)

Die PCR wurde in einem Mastercycler ep gradient S (Eppendorf) durchgeführt.

Optimiertes Mutagenese-Standard-Programm:

Initialen Schmelzphase: 60 s, 95 °C

Amplifikationsschleife: 12 Zyklen:

30s, 95°C Schmelzphase

30s, 55°C Anlagerung der Primer

12 min, 68 °C Plasmid-Neusynthese

Im Anschluss folgte eine 2 min Phase bei 4 °C um die Reaktion zu unterbrechen. Nach der Abkühlphase wurden 10 U der Restriktionsendonuklease *DpnI* direkt in den PCR-Ansatz gegeben und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Die PCR-Ansätze wurden im Anschluss direkt zur Transformation von *E. coli* (2.10.11) genutzt.

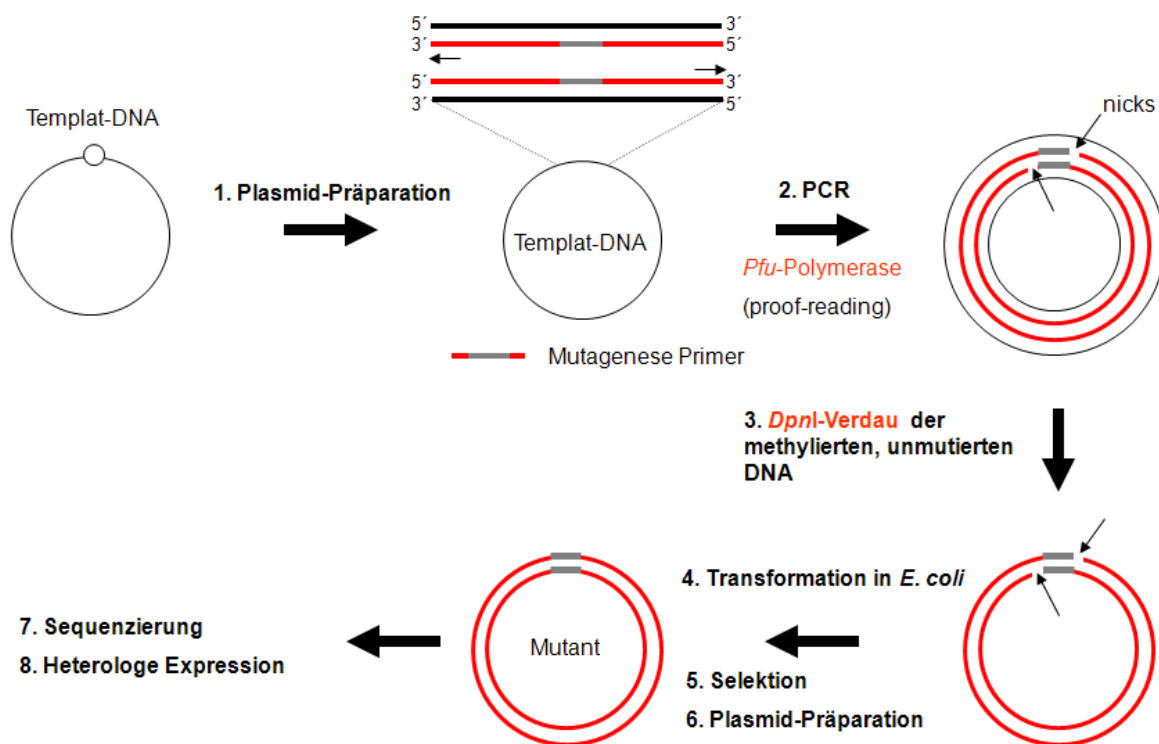


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der *in vitro* Mutagenese-Strategie

2.10.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten mit durch Restriktionsendonukleasen erzeugten überlappenden oder stumpfen Enden, wurden Fragment und Zielvektor in einem molaren Verhältnis von 3:1 gemischt und unter Verwendung von T4-Ligase (0,1U/μl) und

Ligationspuffer (Rapid-Ligation-Kit, Fermentas) nach Herstellerangaben 30 min bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die gewünschte Menge des Konstrukts wurde im Anschluss in *E. coli* transformiert (2.10.11).

2.10.6 DNA-Hydrolyse mittels Typ-II-Restriktionsendonukleasen

Zur gezielten Spaltung von DNA wurden geeignete Restriktionsendonukleasen (Fermentas, New England Biolabs) nach Herstellerangaben zu einer Endkonzentration von 0,1–1 U/μl hinzugefügt und im empfohlenen Puffersystem für 1-2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Eine Analyse der Restriktion erfolgte im Anschluss mittels Agarosegelelektrophorese (2.10.12).

Die einzusetzende Menge (Units) der jeweiligen Restriktionsendonuklease wurde nach folgender Formel berechnet:

$$(2) \quad \text{Units} = \frac{\text{Größe } (\lambda)(\text{kbp})}{\text{Größe } (DNA)(\text{kbp})} \times \frac{\text{Schnittstellen } (DNA)}{\text{Schnittstellen } (\lambda)} \times \text{Masse } (DNA) (\mu\text{g})$$

mit λ : Genom des Bakteriophagen λ

2.10.7 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Plasmidpräparationen aus *E. coli* wurden mittels alkalischer Lyse^[26] durchgeführt, je nach benötigter Plasmidmenge mittels des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) oder für größere Plasmidmengen mittels des Midiprep oder Maxiprep Kits (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers.

2.10.8 Präparation von genomischer DNA aus Bakterien

Genomische DNA aus gram-positiven (*B. subtilis*) bzw. gram-negativen Prokaryoten (*E. coli*, *T. thermophilus*) wurde nach einem standardisierten Protokoll nach Swarup *et al.* isoliert.^[27]

Hierzu wurden die Pellets von 50 ml-Kulturen des jeweiligen Stamms mit 1%iger NaCl-Lösung gewaschen und in 15 ml TES Puffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0, 2 Gew.-% SDS) resuspendiert. Die vollständige Zellyse wurde durch 15 min Inkubation bei 75°C erreicht. Das bakterielle Lysat wurde im Anschluss durch eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (2.10.9) von Proteinen befreit, die genomische DNA mittels Natriumacetat/Ethanol bzw. Isopropanol (2.10.10) ausgefällt, mittels Zentrifugation

(10000 rpm, 30 min, 4°C) sedimentiert und in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) bzw. Millipore-H₂O bei -20°C gelagert.

2.10.9 Phenol/Chloroform-Extraktion

Das bakterielle Zelllysate wurde mit Tris-EDTA-gepufferter Phenollösung (pH 7.5-8, RotiPhenol, Roth) gemischt (1:1 (v/v)) und die Phasentrennung durch 5 min Zentrifugation (5000 rpm, RT) beschleunigt. Die wässrige Phase (oben) wurde möglichst vollständig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Phenolbehandlung wurde so lange wiederholt (1-2×) bis die wässrige Phase keine Trübungen mehr aufwies. Die Probe wurde zur Entfernung von Phenolresten 1:1 mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gemischt und die wässrige Phase (oben) zur weiteren Verwendung abgenommen.

2.10.10 Ausfällen von DNA und RNA

Zur Ausfällung von DNA (RNA) wurde die Probe mit 1/10 des Probenvolumens 3M Natriumacetat (für RNA: 5M Ammoniumacetat, 100 mM EDTA) versetzt und nach Zugabe von 3 Volumina Ethanol (DNA) 1 Volumen Isopropanol (RNA) für mind. 1 h bei -20°C inkubiert. Die Proben wurden im Anschluss für 30 min (10000-13000 rpm, 4°C) sedimentiert, der feste Rückstand vom Überstand befreit und mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) bzw. Millipore-H₂O bei -20°C gelagert. Im Falle sehr niedriger Nukleinsäure-Konzentrationen wurde den Proben Glykogen (1:20, Fermentas) zur besseren Sichtbarmachung des Pellets zugesetzt.

2.10.11 Transformation von Bakterien

2.10.11.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung der kompetenten Zellen wurden zwei 200 ml 2YT- bzw. LB-Flüssigkulturen steril mit einer frischen ü.N.-Kultur 1:10 angeimpft und im Schüttler bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,6–0,8 bei 600 nm herangezogen. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Kulturen unter sterilen Bedingungen in sterile Zentrifugenbecher überführt und bei 6000 rpm sedimentiert. In den folgenden Waschschrritten mit 4 °C sterilem Millipore-H₂O, bei welchen die Zellen jedes Mal jeweils vollständig resuspendiert und im Anschluss wieder sedimentiert wurden, wurde das Flüssigkeitsvolumen unter sterilen Bedingungen in drei Schritten von 200 ml, über 100 ml auf 4 ml (jetzt resuspendiert in 4°C kaltem 10 Vol.-%

Glycerin) reduziert. Die Zellen wurden im Anschluss in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.10.11.2 Transformation elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Die im Eisbad aufgetauten elektrokompetenten *E. coli* Zellen wurden mit der gewünschten Menge der zu transformierenden DNA gemischt und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (BioRad, Elektrodenabstand 0,2 cm) blasenfrei überführt. Die Elektroporation wurde im GenePulser Elektroporationsgerät (BioRad) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Gene-Pulser: 25 µF; 2,5 kV Pulse-Controller: 200 Ω

Nach erfolgtem Elektropuls wurden die Zellen mit 700 µl frischem 2YT-Flüssigmedium versetzt und 30–60 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss konnten die Zellen auf Agarplatten mit dem gewünschten Selektionsdruck ausgestrichen werden.

2.10.11.3 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

Chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen wurden in Anlehnung an Inoue *et al.*^[28] hergestellt. 250 ml SOB-Medium wurden hierzu steril mit 10-12 Kolonien beimpft und bei 20°C unter starkem Schütteln (180-200 rpm) zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. Nach Erreichen der Ziel-OD wurde die Kultur für 10 min auf Eis gelagert und im Anschluss durch Zentrifugation (10 min, 4000 rpm, 4°C) geerntet. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 80 ml TB-Lösung resuspendiert und nach 10 min Inkubation auf Eis erneut sedimentiert. Nach erneuter Resuspendierung in 20 ml TB wurde die Zelllösung mit 1,4 ml DMSO versetzt, in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Transformation bei -80°C gelagert.

SOB-Medium

0,5 Gew.-% Hefeextrakt

2 Gew.-% Trypton

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

dampfsterilisiert

TB-Lösung

10 mM PIPES

15 mM CaCl₂

250 mM KCl

55 mM MnCl₂

pH 6,7 mit KOH bzw. HCl

sterilfiltriert: 0,2 µm Filter

2.10.11.4 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

Chemisch-kompetente *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und nach Inoue transformiert.^[28] Die Zellaliquots wurden hierzu mit 1-2 ng Plasmid-DNA versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Zur Transformation wurden die Zellen nun für 1 min einem Temperaturpuls von exakt 42°C ausgesetzt, mit 800 µl LB-Medium versetzt und zur Regenerierung für 1 h bei 37°C inkubiert.

Im Anschluss wurde die gewünschte Menge Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit dem gewünschten Selektionsdruck ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert.

2.10.11.5 Herstellung und Transformation natürlich-kompetenter *B. subtilis* Zellen

Die Herstellung und Transformation natürlich kompetenter *B. subtilis* Zellen erfolgte in Anlehnung an Anagnostopoulos *et al.*^[29] *B. subtilis* wurde bei 37°C in HS-Medium über Nacht angezogen. Am nächsten Tag wurden 20 ml frisches LS-Medium mit 1 ml der Vorkultur beimpft und bei 30°C (150 rpm) unter konstanter Verfolgung der OD₆₀₀ bis zum Erreichen der frühen stationären Wachstumsphase angezogen. Die Zellen sind zu diesem Zeitpunkt natürlich transformations-kompetent.^[29] Pro Transformation wurde 1 ml der LS-Kultur mit 10 µl einer 0,1 M EGTA-Lösung für 5 min bei RT inkubiert. Den Transformationsansätzen wurden 1-2 µg Plasmid-DNA zugegeben und die Zellen für 2 h bei 37°C unter langsamem Schütteln inkubiert. Zur Selektion wurden die Ansätze im Anschluss auf LB-Agarplatten mit dem gewünschten Selektionsdruck ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert.

HS-Medium

1× Spizizen's Medium
0,5 Gew.-% Glukose
50 µg/ml DL-Tryptophan
50 µg/ml Uracil
0,02 Gew.-% Casein Hydrolysat
0,1 Gew.-% Hefeextrakt
8 µg/ml Arginin
0,4 µg/ml Histidin
1 mM MgSO₄

sterilfiltriert: 0,2 µm Filter

LS-Medium

1× Spizizen's Medium
0,5 Gew.-% Glukose
5 µg/ml DL-Tryptophan
5 µg/ml Uracil
0,01 Gew.-% Casein Hydrolysat
0,1 Gew.-% Hefeextrakt
1 mM MgSO₄
2,5 mM MgCl₂
0,5 mM CaCl₂

sterilfiltriert: 0,2 µm Filter

10× Spizizen's Medium2 Gew.-% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 14 Gew.-% K_2HPO_4 6 Gew.-% KH_2PO_4

1 Gew.-% Na-Citrat

*autoklavieren; + 0,1 Vol.-% 1 M MgSO_4 (sterilfiltriert; 0,2 μm Filter)***2.10.12 Auftrennung von DNA mittels horizontaler Agarosegelelektrophorese**

In Abhängigkeit der jeweiligen DNA-Fragmentgröße wurde die Auftrennung auf 0,8–1,2%igen Agarosegelen (0,8-1,2% Agarose in 1×TAE-Puffer; Elektrophorese-Kammer: Sub-Cell GT, BioRad) durchgeführt. Um ein Einsinken der Proben in die Geltaschen zu gewährleisten, wurden sie mit Gelladepuffer versetzt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in 1×TAE-Puffer bei einer Spannung von 150V. Zur Färbung der DNA wurden die Gele im Anschluss mit dem Interkalationsfarbstoff Ethidiumbromid (0,0005 Gew.-% in 1×TAE-Puffer) für ca. 30 min gefärbt und ermöglichten so einen Nachweis mittels UV-Licht (Geldokumentationsanlage Gel Logic 200, Kodak; bzw. UV-Tisch zur Präparation).

50×TAE-Puffer

2 M Tris

5,71 Vol.-% Essigsäure

50 mM EDTA

Gelladepuffer

1 Gew.-% SDS

50 Vol.-% Glycerin

0,05 Gew.-% Bromphenolblau

2.10.13 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die in einem Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe von Skalpell und Pinzette aus dem Gel präpariert und mittels des QIAquick Gelextraktionskit (Qiagen) nach Herstellerangaben aus den Gelstücken eluiert.

2.10.14 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde mittels der Kettenabbruch-Methode nach Sanger *et al.*^[30] durch die Firma MWG Eurofins durchgeführt. Hierzu wurden 2 μg „Kit-reiner“ Plasmid-DNA mittels einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac, Eppendorf) getrocknet und dem Anbieter zur

Sequenzierung zugesandt. Sequenzierstartprimer je nach Plasmid: pUC19 (M13-Primer, MWG), pQE30 *Xa* (pQE30-Primer, MWG), pHT08 (5'-GTGTTATGGCTTGAACAATCACG-3')

2.10.15 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde über die UV-Absorption der Nukleobasen bei 260 nm bestimmt. Im Falle kleiner Fragmente DNA- und RNA-Fragmente (<80 bp) konnte die molare Konzentration über das Lambert-Beer'schen Gesetzes unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten des Fragments berechnet werden.

$$(1) \quad \text{Lambert-Beer: } c = \frac{E}{d \times \epsilon}$$

mit c: Konzentration; E: Extinktion; d: Schichtdicke; ϵ : molarer Extinktionskoeffizient

(ϵ berechnet über http://www.ambion.com/techlib/misc/oligo_calculator.html)

Im Falle größerer DNA Fragmente, Plasmiden und genomischer DNA ist die Bestimmung molarer Extinktionskoeffizienten aufgrund der Molekülgröße und der damit verbundenen Komplexität der Berechnung erschwert. In diesen Fällen wurden Konzentration auf Basis eines empirisch ermittelten Wertes von 50 $\mu\text{g/ml}$ bei $E_{260} = 1$ für große Nukleinsäuren bestimmt (Bio-Photometer, Eppendorf). Die Genauigkeit dieser Methode reicht für Klonierungszwecke vollständig aus.

2.10.16 Klonierung des *rpLK*-Gens aus Prokaryoten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *rpLK*-Gene (kodiert für das ribosomale Protein L11) der Prokaryoten *Escherichia coli* K12 (NP_418410.1) und *Thermus thermophilus* HB8 (NC_006461.1) zu Expressionszwecken kloniert. Hierzu wurde zunächst die genomische DNA der Organismen präpariert (2.10.8) und der *rpLK*-ORF mittels PCR (2.10.3) unter der Verwendung der unter 2.7.2+4 beschriebenen Primer amplifiziert.

2.10.16.1 Plasmidkonstruktion zur heterologen Expression von His₆-Fusionskonstrukten des ribosomalen Proteins L11 bzw. Mutanten in *Escherichia coli*

Der für die Expression gewählte Vektor pQE30 *Xa* (Qiagen) erlaubte die Expression von Proteinen unter der Kontrolle des Bakteriophagen T5-Promotors, welcher direkt von der

E. coli RNA-Polymerase erkannt wird. Die Expression der LacI-reprimierten Konstrukte kann über die Zugabe von IPTG kontrolliert induziert werden.^[31] Die Zielproteine wurden als N-terminal His₆-markierte Fusionsproteine synthetisiert und erlaubten so eine Reinigung über Immobilisierter-Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC, vgl. 2.11.4). Die enthaltende Faktor *Xa* Erkennungssequenz ermöglichte zusätzlich eine spurlose, proteolytische Entfernung des Affinitätsmarkers mittels der Plasmaprotease Faktor *Xa* (2.11.4.1).

Zur heterologen Expression der L11-Proteine aus *E. coli* und *T. thermophilus* als N-terminal His₆-markierte Fusionsproteine, wurden die das jeweilige *rplK*-tragenden PCR-Fragmente über eine *StuI/BamHI* Strategie in den pQE30 *Xa* Vektor (Qiagen) ligiert (2.10.5) und in *E. coli* XL1 blue (2.10.11.1-4) transformiert. Transformanten wurden im Anschluss auf LB-Agarplatten (+ Ampicillin) selektiert (2.10.1). Resistente Kolonien wurden in LB-Medium (+Ampicillin) angezogen (2.10.1), die pQE30 *Xa* Vektor-*rplK*-Konstrukte (p*EcoL11*, p*TthL11*) isoliert (2.10.7), die Fragmentinsertion per Restriktionsanalyse überprüft (2.10.6) und die Fragmente sequenziert (2.10.14).^[31] Auf Basis der hergestellten Expressionsplasmide p*EcoL11* und p*TthL11* wurden Mutanten von L11 (2.4b) über *in vitro* Mutagenese (vgl. 2.7.5 u. 2.10.4) erzeugt und mittels Sequenzierung (2.10.14) verifiziert. Eine Auflistung sämtlicher zur Expression des *EcoL11/TthL11* Wildtyps oder Mutanten hergestellten Plasmide findet sich in Kapitel 2.4b. Zur Kontrolle und Optimierung der Expression wurden die L11-Wildtypkonstrukte (*TthL11* bzw. *EcoL11*) in 4 ml LB-Kulturen unter Variation von Temperatur, Zeit und Induktor-Konzentration (IPTG) zur Expression gebracht und mittels SDS-PAGE überprüft (2.11.7). Die so ermittelten Expressionsbedingungen wurden für alle L11-Mutanten übernommen.

2.10.16.2 Heterologe Expression von L11-Proteinen in *Escherichia coli* zur Herstellung von *TthL11* komplementierter *E.coli*-Ribosomchimären

Zur Herstellung von *TthL11-E.coli*-Ribosomchimären wurden die unter 2.4b beschriebenen Plasmide p*TthL11* bzw. L11-Mutantenplasmide in den L11-defizienten *E. coli* Stamm BW25113 $\Delta rplK$ transformiert und die Transformanten auf LB-Platten (+Ampicillin, Kanamycin) selektiert. Zur Expression wurden die Zellen im gewünschten Kulturvolumen ü.N. bei 37°C angezogen. Auf eine Induktion der Expression wurde verzichtet. Die Basalaktivität des relativ schlecht LacI-reprimierten pQE30 *Xa* T5-Promotorkonstrukts genügte zur Herstellung der Ribosomchimären vollständig. Zur Kontrolle wurden die Ribosomenchimären

isoliert (2.10.17.2) und der Einbau von *TthL11* mittels Immunoblots (α -His₅-AK, vgl. 2.11.8) überprüft.

2.10.16.3 Heterologe Expression von L11-Proteinen in *Bacillus subtilis* zur Herstellung von *TthL11* komplementierter *B. subtilis*-Ribosomchimären

Die *rplK*-Wildtyp- bzw. Mutanten-Sequenzen wurden zur heterologen Expression in *B. subtilis* mittels PCR, ausgehend von p*TthL11* wt bzw. Mutanten-Plasmiden (2.10.16.1), amplifiziert. Die Fragmente wurden über eine *Bam*HI/*Xba*I Strategie in den *E. coli*/*B. subtilis* „Shuttle“-Vektor pHT08 (MoBiTec) ligiert (2.10.5), in *E. coli* XL1 blue (2.10.11.1-4) transformiert und die transformierten Zellen auf LB-Agarplatten (+ Ampicillin) selektiert (2.10.1). Resistente Kolonien wurden in LB-Medium (+Ampicillin) angezogen (2.10.1) und die pHT*TthL11*-Konstrukte isoliert (2.10.7). Die Fragmentinsertion wurde per Restriktionsanalyse überprüft (2.8.6) und die Fragmente sequenziert (2.10.14). Eine Übersicht sämtlicher pHT08-Derivate zur Expression von *TthL11* wt bzw. Mutanten in *B. subtilis* ist in 2.4d dargestellt. Korrekte Konstrukte wurden in zur Kontrolle in *B. subtilis* 1012 (Wildtypstamm) bzw. zur Herstellung chimärer Ribosomen in *B. subtilis* IS169 (*rplK*) transformiert (2.10.11.5) und die transformierten Zellen auf LB-Agarplatten (+ Chloramphenicol) selektiert (2.10.1). Die Überexpression der N-terminal His₈-markierten Fusionsproteine wurde mittels SDS-PAGE (2.11.7) überprüft.

2.10.17 Isolation bakterieller Ribosomen

Ribosomenisolationen aus Prokaryoten wurde entweder klassisch mittels Ultrazentrifugation unter Verwendung eines Saccharose-Kissens (2.10.17.1) bzw. über die Verwendung einer Ribosomenaffinitätssäule (2.10.17.2) durchgeführt. Aufgrund der Effizienz und Schnelligkeit der Affinitätsreinigung, wurde diese als Standardverfahren verwendet (Abbildung 2.2).

2.10.17.1 Ultrazentrifugation

Die Isolation von Ribosomen mittels Ultrazentrifugation wurde in Anlehnung an Merryman *et al.*^[32], Rodina *et al.*^[33] und Spedding *et al.*^[34] durchgeführt.

Zellanzucht: Zur Herstellung einer Vorkultur wurden 200 ml LB-Medium aus einer *E. coli* A19 Glycerinkultur steril beimpft und ü. N. bei 37°C angezogen. Je 15 ml dieser Vorkultur wurden in 4×1 l Hauptkulturen überimpft und bei 37°C, 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8

kultiviert. Je 750 ml der Bakterienkultur wurden auf 6×1 l eisgekühlte Zentrifugenbecher verteilt und die Zellen durch Zentrifugation (30 min, 5000 rpm, 4°C) geerntet. Die Zellen wurden im Anschluss mit je 50 ml eiskaltem Puffer A gewaschen, die Fraktionen vereinigt und erneut sedimentiert (15 min 5000 rpm, 4°C).

Zellyse: Die Zellen wurden in 20 ml eiskaltem Puffer resuspendiert und mittels eines Microfluidizers (Microfluidics Corporation, vgl. 2.11.3) lysiert. Das bakterielle Lysat wurde durch anschließende Zentrifugation (30 min, 10000-12000 rpm, 4°C) von nicht löslichen Bestandteilen (Zelltrümmer, etc.) befreit und das Lysat so geklärt.

Ultrazentrifugation: Zur Reinigung der Ribosomen wurden 4 Ultrazentrifugationsröhrchen mit 7,5 ml eiskaltem Puffer B + 30 Gew.-% Saccharose befüllt, mit je 5 ml des geklärten Zellysats überschichtet und für mind. 2 h ultrazentrifugiert (300000×g, 4°C). Im Anschluss wurde das ribosomale Pellet mit eiskaltem Puffer A gewaschen und so von locker assoziiertem bräunlichen Verunreinigungen befreit. Das Pellet wurde in 4 ml eiskaltem Puffer A resuspendiert und zum Überschichten von 8,5 ml Puffer B + 30 Gew.-% Saccharose genutzt. Nach erneuter Ultrazentrifugation (2h, 300000×g, 4°C) und Waschen mit Puffer A wurde das ribosomale Pellet in 2 ml Puffer C resuspendiert. Nach einer Reinheitskontrolle mittels SDS-PAGE (2.11.7) wurden die Ribosomen zur Lagerung in 1 ml Fraktionen in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Puffer A	Puffer B	Puffer C
10 mM Tris-HCl, pH 7.6	10 mM Tris-HCl, pH 7.6	10 mM Tris-HCl, pH 7.6
10 mM Mg(Ac) ₂	10 mM Mg(Ac) ₂	10 mM Mg(Ac) ₂
100 mM NH ₄ Cl	500 mM NH ₄ Cl	60 mM NH ₄ Cl
0,25 mM EDTA	7 mM β-ME	3 mM β-ME
7,1 mM β-ME	(+30 Gew.-% Sucrose)	

2.10.17.2 Ribosomenaffinitätssäule

Die Isolation von Ribosomen mittels einer Ribosomenaffinitätssäule wurde in Anlehnung an Maguire *et al.*^[35] durchgeführt.

Herstellung der Affinitätsmatrix: 5 ml der Sulfolink-Harzes (50%ige Lösung, Pierce) wurden sedimentiert (1000 rpm, 5 min), durch dreimaliges Waschen mit 5 ml Kupplungspuffer äquilibriert und im Anschluss in 5 ml 50 mM Cysteinhydrochlorid-Lösung (in Kupplungs-

puffer) für 1 h unter sanftem Schütteln bei RT funktionalisiert. Die funktionalisierte Matrix wurde im Anschluss luftblasenfrei in eine variable ÄKTA-kompatible Leersäule (GE Healthcare) überführt und mittels einer Peristaltikpumpe (Pharmacia) bzw. dem ÄKTA-FPLC System mit mindestens 10 Säulenvolumina Millipore-H₂O gewaschen. Eine so hergestellte Ribosomenaffinitätssäule war nahezu unbegrenzte Zeit verwendbar. Zur Vermeidung von bakteriellen Kontaminationen wurde die Säule nach Gebrauch in 30% EtOH bei 4°C gelagert.

Ribosomenisolation: Nach der Ernte der gewünschten Bakterienzellen wurde das Zellpellet zur Isolation der Ribosomen in Ribo-Lysispuffer (0,5 g/ml, 4°C) resuspendiert und mittels einer Ultraschallspitze (Bandelin) ca. 5×20 s behandelt (90% Intensität). Das Zelllysate wurde durch Zentrifugation (12000 rpm, 15 min, 4°C) und Filtration (0,4 µm Filter) geklärt. Die Affinitätssäule wurde zunächst mit >10 Volumina Ribo-Lysispuffer äquilibriert, das Zelllysate mit einer Flussrate von 1 ml/min injiziert und die Ribosomen so auf der Matrix immobilisiert. Nach einer Waschphase von mindestens 10 Säulenvolumina Ribo-Lysispuffer wurden die Ribosomen durch die Zugabe von Ribo-Elutionspuffer (isokratische Elution oder Gradient) von der Säule eluiert. Nach einer Reinheitskontrolle mittels SDS-PAGE (2.11.7) wurden die Ribosomen zur Lagerung in 1 ml Fraktionen in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Konzentration der Ribosomen wurde UV-spektroskopisch unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten ϵ_{260} : $4,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt.^[36]

Kupplungspuffer	Ribo-Lysispuffer	Ribo-Elutionspuffer
50 mM Tris-HCl, pH 8.5	20 mM Tris-HCl, pH 7.5	20 mM Tris-HCl, pH 7.5
5 mM Na ₂ -EDTA	10,5 mM Magnesiumacetat	10,5 mM Magnesiumacetat
	100 mM NH ₄ Cl	300 mM NH ₄ Cl
	0,5 mM Na ₂ -EDTA	0,5 mM Na ₂ -EDTA



Abbildung 2.2: (a) Schematische Darstellung der Ribosomen-Affinitätsreinigung nach Maguire *et al.*^[35] (b) Vergleich von affinitätsgereinigten (1) und per Ultrazentrifugation (2) präparierten Ribosomen mittels 15% SDS-PAGE.

2.11 Proteinbiochemische Methoden

2.11.1 Heterologe Expression von L11-Fusionsproteinen in *E. coli*

Zur heterologen Expression von L11-Fusionsproteinen in *E. coli* zu Reinigungszwecken wurden 0,5-2l 2YT bzw. LB-Flüssigkulturen steril 1:10 mit einer frischen ü.N.-Kultur des jeweiligen Überexpressionsstamms beimpft. Die Zellen wurden bei 37°C (150-180 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1 angezogen und dann auf 20°C herab gekühlt. Die Expression wurde durch 0,1 mM des Induktors IPTG ausgelöst und die Zellen für weitere 24 h bei 20°C kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation (5000 rpm, 10 min) geerntet und mit 1/10 des Kulturvolumens 1% NaCl Lösung gewaschen. Bis zum Zellaufschluss konnten die Zellpellets bei -80°C gelagert werden.

2.11.1.1 Uniforme ¹⁵N-Markierung von L11-Fusionsproteinen in *E. coli*

Zur uniformen ¹⁵N-Markierung von Proteinen in *E. coli* wurde eine frische LB-ü.N.-Kultur des jeweiligen Expressionsstamms 1:100 in Minimalmedium (MEM) überimpft, welches ¹⁵NH₄Cl (Isotec) als ausschließliche Stickstoffquelle enthielt. Die Zellen wurden bei 37°C (150-180 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1 angezogen und die Zellen entsprechend 2.11.1 induziert, kultiviert und geerntet.

¹⁵N-Minimalmedium

30 mM KH₂PO₄/45 mM K₂HPO₄

0,05 Gew.-% NaCl

0,1 Gew.-% Zitronensäure-Monohydrat

0,1 Vol.-% Zink-EDTA-Lösung

0,1 Gew.-% ¹⁵NH₄Cl

0,13 Vol.-% Spurenelementlösung

0,012 Vol.-% Eisencitrat-Lösung (30 Gew.-% in konz. HCl)

pH-Wert auf 7.0 eingestellt und autoklaviert

Einem Liter Medium wurden folgende Lösungen (*sterilfiltriert; 0,2 µm Filter*) zugesetzt:

25 ml 20 Gew.-% Glucose-Lösung

560 µl 1 Gew.-% Thiamin-Hydrochlorid-Lösung

2 ml 1 M MgSO₄

+ gewünschte Menge Antibiotikum zur Selektion

Spurenelementlösung

2,5 g/l Borsäure

2,0 g/l CoCl₂ × 6 H₂O

1,1 g/l CuCl₂ × 2 H₂O

9,8 g/l MnCl₂ × 2 H₂O

2,9 g/l Na₂MoO₄ × 2 H₂O

(sterilfiltriert; 0,2 µm Filter)

Zink-EDTA-Lösung

5,0 g/l EDTA

8,4 g/l Zn(Ac)₂ × 2 H₂O

(sterilfiltriert; 0,2 µm Filter)

2.11.2 Heterologe Expression von L11-Fusionsproteinen in *B. subtilis*

Die heterologe Expression von L11-Fusionsproteinen in *B. subtilis* wurde unter der Verwendung der Expressionsbedingungen für *E. coli* (2.11.1) durchgeführt. Zur Induktion wurde die IPTG-Konzentration auf 1 mM erhöht.

2.11.3 Aufschluss von *Escherichia coli* zur Herstellung eines Proteinrohextrakts

Zum Zellaufschluss wurden die, wie unter 2.11.1 beschrieben, geernteten Zellen in eiskaltem Lysispuffer resuspendiert (0,5 g(Zellen)/ml) und entweder durch Verwendung einer Ultraschallspitze (Bandelin) ca. 5×20 s sonifiziert (90% Intensität, 1 min Kühlung auf Eis zwischen den Sonifizierungsschritten) oder mittels eines Microfluidizers (Microfluidics Corp.) mehrfach mit Hochdruck (800 bar) durch eine enge Kapillare (eisgekühlt) gepresst und somit lysiert. Durch eine anschließende Zentrifugation bei 12000 rpm für 30 min bei 4°C wurde das erhaltende Zelllysate von Zelltrümmern und unlöslichen Proteinbestandteilen befreit.

Lysispuffer

50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 8.0 (bei cysteinhaltigen Proteinen + 2 mM TCEP)

300 mM NaCl

50 mM Imidazol

2.11.4 Nickel-NTA-Agarose-Affinitätschromatographie

Die native Aufreinigung von His₆₋₈-L11-Fusionsprotein erfolgte in Anlehnung an Hochuli *et al.*^[37] mittels Immobilisierter-Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC). Als Affinitätsmatrix diente eine Nitrilotriessigsäure-Agarosematrix, dessen Nitrilotriessigsäure-Komponente komplexiert mit Ni²⁺-Ionen vorlag (His-Trap FF crude Ni²⁺-NTA-Säule, GE Healthcare).

Mittels einer Peristaltikpumpe (Pharmacia) bzw. dem ÄKTA FPLC-System (GE Healthcare) wurde die Säule vor Benutzung mit >10 Säulenvolumina Lysispuffer gespült (Flussrate 5 ml/min) und im Anschluss der bakterielle Proteinrohextrakt (vgl. 2.11.3, Flussrate 1 ml/min) vollständig auf die Säule gegeben. Zur Vermeidung unspezifischer und zu schwacher Interaktionen wurde die Säule anschließend mit >10 Säulenvolumina Lysispuffer gespült. Das spezifisch gebundene Protein wurde durch Erhöhung der Imidazolkonzentration (isokratische bzw. Gradientenelution, Elutionspuffer) von der Säule eluiert und fraktioniert

gesammelt. Im Anschluss wurde die Säule zur vollständigen Reinigung mit 5 Säulenvolumina Elutionspuffer (1 M Imidazol) und anschließend 10 Säulenvolumina Millipore-H₂O gespült bevor sie zur Lagerung in 30% Ethanol gebracht wurde. Das gesammelte Protein-Eluat wurde zur Lagerung mittels PD-10 bzw. NAP-5-Säulen (GE Healthcare) in das gewünschte Ziel-Puffersystem gebracht (vgl. 2.11.5), die Proteinkonzentration bestimmt (vgl. 2.11.6), in flüssigem N₂ schockgefroren und im Anschluss bei -80 °C gelagert.

Lysispuffer

50 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 8.0

300 mM NaCl

50 mM Imidazol

Elutionspuffer

50 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 8.0

300 mM NaCl

250 mM Imidazol (isokratische Elution)

1 M Imidazol (Gradientenelution)

2.11.4.1 Faktor X α Verdau von His₆-L11-Fusionsprotein

Die Verwendung des pQE30 X α Vektorsystems (Qiagen) erlaubt eine rückstandslose Entfernung der N-terminalen His₆-Markierung von His₆-Fusionsproteinen durch proteolytischen Verdau mit Faktor X α (Qiagen). Die Entfernung der Markierung bot sich in Fällen an, bei denen sich diese aufgrund ihrer Größe und Flexibilität (z.B. Kristallisation) oder ihrer Aminosäurekomposition (z.B. pK_a-Titrationsen) als störend erwies. Der proteolytische Verdau wurde nach Herstellerangaben (vgl. Handbuch: The Expressionist, Qiagen) und zusätzlicher Optimierung bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml und 0,02 U/ μ l Faktor X α ü.N. bei RT durchgeführt. Freie His₆-Marker und ungeschnittene His₆-Fusionsproteine wurden im Anschluss mittels Nickel-NTA-Affinitätschromatographie entfernt. Die Protease konnte entweder über das Faktor X α Removal Kit (Affinitätsmatrix, Qiagen) bzw. über präparative Gelfiltration (Superdex 200, GE Healthcare, vgl. 2.11.12) vom Zielprotein getrennt werden.

2.11.5 Gelfiltration mittels PD-10-Säulen/NAP-5-Säulen

PD-10 bzw. NAP-5-Säulen (Sephadex G25 Gelfiltrationsmatrix, GE Healthcare) ermöglichen effiziente Puffersystemwechsel bzw. Entsalzung von Protein- und Nukleinsäurelösungen in kurzer Zeit (10 min). Die Säulen wurden hierzu nach Herstellerangaben zunächst mit 3-4 Säulenvolumina des Zielpuffersystems äquilibriert. Die Biomakromoleküllösung wurde in

einem Volumen von 0,5 bzw. 2,5 ml auf die jeweilige Säule gegeben (NAP-5 bzw. PD-10) und mit 1 bzw. 3,5 ml des Ziel-Puffers eluiert.

2.11.6 Protein-Quantifizierung

2.11.6.1 UV-Spektroskopie

Die Konzentration von gereinigten Proteinen wurde über die UV-Absorption der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm jeweils in Triplikaten bestimmt. Die molare Konzentration wurde über das Lambert-Beer'schen Gesetzes unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten des Proteins berechnet:

$$(1) \quad \text{Lambert-Beer: } c = \frac{E}{d \times \epsilon}$$

mit c: Konzentration; E: Extinktion; d: Küvettendicke; ϵ : molarer Extinktionskoeffizient

(ϵ berechnet über ProtParam: <http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)

2.11.6.2 Bradford-Test

Die Proteinkonzentration von Proteinen bzw. Proteingemischen wurde mittels der Methode nach Bradford *et al.*^[38] durchgeführt. Hierzu wurden 25 μ l der jeweiligen Probe mit 1 ml Bradford-Lösung (RT) versetzt und nach 15 min Inkubation die Absorption bei 595 nm bestimmt. Als Blindprobe dienten 25 μ l des Proteinpuffers. Die genaue Proteinkonzentration (mg/ml) konnte durch den Vergleich mit einer Rinderserumalbumin-Eichreihe bestimmt werden.

Bradford-Lösung

0,01 Gew.-% Coomassie Brilliant Blau G-250

4,7 Vol.-% Ethanol

8,5 Vol.-% H₃PO₄

Die Komponenten wurden 2-3 h im Dunkeln gerührt, filtriert und die Lösung bei 4°C dunkel gelagert.

2.11.7 SDS-PAGE (Sodium-dodecyl-sulfate – Polyacrylamidgelelektrophorese)

2.11.7.1 Auftrennen von Proteinmischungen

Die Auftrennung von Proteinen nach Größe unter denaturierenden Bedingungen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE nach Laemmli^[39] und Studier.^[40] Die Proteinproben wurden zunächst 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die elektrophoretische Trennung wurde in Elektrophoresekammern (Mini-Protean III, BioRad) standardmäßig in einem System aus einem 5%igen Sammelgel und 15%igen Trenngel, bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA/Gel durchgeführt. Zum Größenvergleich wurde auf jedes Gel ein Molekulargewichtsstandard (BioRad, Fermentas) mit aufgetragen.

10×Laufpuffer

250 mM Tris-HCl
2 M Glycin
1 Gew.-% SDS

4×Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl pH 8.8
0,4 Gew.-% SDS

4×Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl pH 6.8
0,4 Gew.-% SDS

SDS-Probenpuffer

125 mM Tris
20 Vol.-% Glycerin
1 Gew.-% SDS
0,001 Gew.-% Bromphenolblau
5 Vol.-% β-ME

Polymerisation der Acrylamid-Puffermischung

10-20 µl TEMED + 200 µl 10 Gew.-% APS pro 15 ml
Lösung
40% Acrylamid/Bisacrylamid
(37,5:1)

2.11.7.2 Coomassie-Färbung

Färbungen von Proteinbanden in SDS-PAGE Gelen wurden in Anlehnung an Neuhoff *et al.*^[41] mittels Coomassie Brilliant Blau-Färbelösung durchgeführt. Die mit Millipore-H₂O gewaschenen Gele wurden für mindestens eine Stunde unter Schütteln in der Färbelösung inkubiert und anschließend mittels Entfärber entfärbt, bis die Proteinbanden klar zu erkennen waren. Die Gele konnten im Anschluss bis zur photographischen Dokumentation in Millipore-H₂O aufbewahrt werden.

Färbelösung

0,2 Gew.-% Coomassie Brilliant Blau R

10 Vol.-% Essigsäure

40 Vol.-% Methanol

Entfärber

10 Vol.-% Essigsäure

40 Vol.-% Methanol

2.11.7.3 Silber-Färbung

Zur Detektion kleinster Proteinmengen auf SDS-PAGE Gelen wurden die Gele mittels des Silver Stain Snap II-Kits (Thermo Scientific) nach Herstellangaben angefärbt.

2.11.8 Immuno-(„Western“-)-Blotting

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteingemische wurden nach Towbin *et al.*^[42] durch den Transfer auf eine Trägermembran (Polyvinylidenfluorid, PVDF) immobilisiert und die Zielproteine mittels spezifischer Antikörper (AK) detektiert (Immuno-(„Western“-)-Blotting). Der Transfer auf PVDF-Membranen wurde in SemiDry-Blotkammern (BioRad) für 45-60 min bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA durchgeführt. Die Verwendung vorgefärbter Proteingrößenstandards oder reversibler Proteinfärbungen (Ponceau- bzw. Tusche-Färbung) ermöglichten eine Überprüfung des Proteintransfers. Die Membran wurde im Anschluss durch eine einstündige Inkubation in Blocklösung vollständig mit Protein abgesättigt. Zur Detektion von His₆₋₈-Fusionsprotein wurde die blockierte Membran im folgenden ü.N. mit α -His₅-AK (1. AK, entsprechende Verdünnung in Blocklösung, vgl. 2.6) inkubiert und ungebundener AK durch drei 10 min Waschschrte mit TBS-T entfernt. Zum Nachweis von spezifisch gebundenem 1. AK wurde die Membran 1 h mit einem Ziege- α -Maus-IgG-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (2. AK, entsprechende Verdünnung in TBS-T, vgl. 2.6) inkubiert und durch drei 10 min Waschschrte mit TBS-T von ungebundenem 2.AK befreit. Die Verwendung von α -His₅-IgG-Meerrettich-Peroxidase-Konjugaten als 1. AK ermöglichte eine direkte Detektion der Zielproteine ohne 2. AK. Der Nachweis von Meerrettich-Peroxidase-Konjugaten erfolgte über die Luminol-Reaktion. Die Membran wurde hierzu in einer Dunkelkammer für ca. 1 min mit dem Luminol-Reagenz und H₂O₂ (Pierce) inkubiert und die Position und relative Intensität des lumineszenten Reaktionsprodukts auf der Membran über die Belichtung eines Röntgenfilms (CL-XPosure, Pierce) dokumentiert.

Transferpuffer	TBS-T	Ponceau-Färbelösung
48 mM Tris-HCl pH 8.2	50 mM Tris-HCl pH 7.8	0,2 Gew.-% Ponceau-S
39 mM Glycin	150 mM NaCl	1 Vol.-% Essigsäure
1,3 mM SDS	0,1 mM MgCl ₂	
20 Vol.-% Methanol	0,05 Vol.-% Triton X-100	

Blocklösung

3,8 Gew.-% Milchpulver in TBS-T

2.11.9 Ellman's Test

Die Konzentration intakter Sulfhydrylgruppen von Protein-Cysteinen wurde mittels des Ellman'schen Tests kolorimetrisch in Anlehnung an Riener *et al.*^[43] bestimmt. Der eigentlich für 1 ml-Küvetten ausgelegte Test wurde zur Reduktion des Probenvolumens auf einen 100 µl Maßstab reduziert und konnte so in 96-Loch-Platten (Falcon Microtest 96 Becton, Dickinson Labware) durchgeführt werden. Pro Proteinkonstrukt wurden 50 µl Probe mit 5 µl Ellman's Reagenz und 45 µl Reaktionspuffer versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Bestimmung der Absorption des gelben Reaktionsprodukts bei 412 nm (Platereader Infinite M200, Tecan) erlaubte die Berechnung der Konzentration freier, intakter Sulfhydrylgruppen durch den Vergleich mit einer Eichreihe von zwitterionischem Cystein (in Reaktionspuffer).

Reaktionspuffer	Ellman's Reagenz
10,1 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.4	10 mM 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure)
1,76 mM KH ₂ PO ₄	in Reaktionspuffer
137 mM NaCl	
1 mM Na ₂ -EDTA	

2.11.10 pK_a-Bestimmung von Protein-Cysteinen mittels UV-Spektroskopie

Die Ionisierung von Cystein-Thiolen in Proteinen wurde in Anlehnung an Witt *et al.*^[44] UV-spektroskopisch über die Absorption des Thiolat-Anions bei 240 nm bestimmt. Das Protein wurde hierzu (nach Entfernung der His₆-Markierung, vgl. 2.11.4.1) in 20 mM Natriumcitrat/NH₂PO₄ des jeweiligen pH-Werts zu einer Endkonzentration von 10-20 µM verdünnt und der pH-Wert des Systems nach Proteinzugabe nochmals überprüft. Die

Absorption der Proben bei 240 und 280 nm wurde bei RT in einer Quartzküvette ($d=1$ cm) bestimmt (UV-Spektrometer: Cary 100 Bio, Varian, vgl. 2.13.6). Der Extinktionskoeffizient des jeweiligen Proteins bei 240 nm wurde über folgende Formel berechnet:

$$(3) \quad \varepsilon_{240} = \varepsilon_{280} \times \frac{A_{240}}{A_{280}}$$

Die hierzu benötigten ε_{280} -Werte für das jeweilige Protein wurden mittels ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) bestimmt. $\Delta\varepsilon_{240}$ -Werte wurden über die Subtraktion des ε_{240} -Wertes des kleinsten pH-Wertes von allen anderen ε_{240} -Werten bestimmt. Die graphische Auftragung der $\Delta\varepsilon_{240}$ -Werte als Funktion des pH-Werts lieferte sigmoidale Kurven, deren Verlauf mit einer Variante der Henderson-Hasselbalch-Formel analysiert und zur Bestimmung des Cystein- pK_a genutzt werden konnte:

$$(4) \quad \Delta\varepsilon_{240}(pH) = \varepsilon_{240}^{SH} + \frac{\varepsilon_{240}^{S-} - \varepsilon_{240}^{SH}}{1 + 10^{pK_a - pH}}$$

mit ε_{240}^{S-} als Extinktionskoeffizienten der Thiolat-Form des Proteins bei 240 nm und ε_{240}^{SH} als Extinktionskoeffizienten der Thiol-Form des Proteins bei 240 nm. Zur Analyse wurde das Program OriginPro V7.5 (OriginLab Corporation) verwendet.

2.11.11 Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)

Die Größenausschlusschromatographie trennt Biomoleküle anhand ihrer unterschiedlichen Größe und Form. Dabei werden poröse Matrices definierter Porengröße (Sephadex/Superdex 75 bzw. 200, GE Healthcare) verwendet. Das Trennprinzip beruht auf der unterschiedlichen Permeation der Biomoleküle in die Poren der Matrix. Große Moleküle können nicht in die Poren eindringen und eluieren im Ausschlussvolumen, kleine Moleküle dringen in die Poren ein und eluieren entsprechend verzögert.

Größenausschlusschromatographien wurde im analytischen als auch präparativen Maßstab unter Verwendung des ÄKTA FPLC Systems (GE Healthcare) durchgeführt. Die analytische Größenausschlusschromatographie (Säule: Superdex 75 10/300 GL, GE Healthcare) diente zur Analyse der Ausbildung von Biomolekülkomplexen wie Protein/Nukleinsäure-Komplexen bzw. Biomolekül/Ligand-Komplexen. Die präparative Größenausschlusschromatographie

(Säule: Highload 26/60 Sephadex 75 prep grade bzw. Highload 16/60 Sephadex 200 prep grade, GE Healthcare) wurde als finaler Reinigungsschritt von Biomolekülen (Protein, RNA) bzw. Protein/Nukleinsäure/Ligand-Komplexen zu Kristallisationszwecken eingesetzt. In beiden Fällen wurden die Proben bis auf ein Volumen von 1 bis 2 ml konzentriert (Ultrafiltration mit Amicons (Millipore) nach Herstellerangaben) und auf die jeweilige mit Laufpuffer äquilibrierte Säule aufgebracht. Die Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 0.5-1.5 ml/min Die Separationsprodukte wurden fraktioniert (Fraktionsgröße 0,5-1 ml) gesammelt und gelelektrophoretisch (vgl. 2.11.7.1 für Protein bzw. 2.12.2.1 für RNA) bzw. durch adäquate biophysikalische Methoden analysiert.

Laufpuffer

50 mM Tricin pH 8.0

100 mM NaCl

10 mM MgCl₂

2.12 RNA-biochemische Methoden

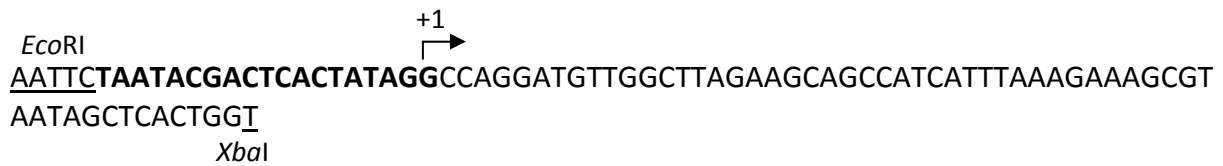
2.12.1 RNA-Synthese

2.12.1.1 *in vitro* Transkription

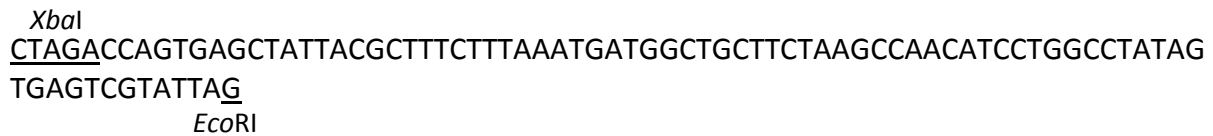
Arbeiten von Ryan *et al.*^[45] zeigten, dass ein 58 nt langes Fragment der *E. coli* 23S rRNA (1051-1109) ausreicht um einen funktionalen Komplex mit dem ribosomalen Protein L11, als auch den ternären Komplex aus RNA/Protein und Thiopeptid-Ligand herzustellen und zu studieren. Basis dieser Arbeit war daher ein an dieses RNA-Fragment angelehntes RNA-Konstrukt.

Der Großteil der in dieser Arbeit verwendeten Fragmente der *E. coli* 23S rRNA (1051-1109) bzw. entsprechender Mutanten wurde mittels T7 basierter „run-off“ *in vitro* Transkription synthetisiert. Hierzu wurden komplementäre Oligonukleotide entworfen, welche die Information für das jeweilige RNA-Fragment unter der Kontrolle eines T7-Minimal-Promotors (**fett** gedruckt), sowie 5′-EcoRI- und 3′-XbaI-Erkennungssequenzen enthielten (unterstrichen). Exemplarisch für:

Start-Oligonukleotid (vorwärts) native (5'→3'):



Start-Oligonukleotid (rückwärts) native (5'→3'):



Die Oligonukleotidpaare (je 100 µM in H₂O, vgl. 2.7.1) wurden 1:1 gemischt, thermisch denaturiert (94°C) und durch die Abkühlung auf RT hybridisiert. Die so hergestellten dsDNAs wurden über eine *EcoRI/XbaI*-Strategie in den pUC19-Vektor kloniert (vgl. 2.10.5-6) und in *E. coli* XL1-blue transformiert (vgl. 2.10.11.1-4). Diese Vorgehensweise erlaubte eine Kontrolle der DNA-Sequenz mittels Sequenzierung als auch eine unbegrenzte Amplifikation der Vektorkonstrukte (vgl. 2.5a) in *E. coli*. pUC19 wurde als Trägervektor gewählt, da es sich hierbei um einen Klonierungsvektor ohne intrinsische T7-Promotoren handelt, welcher zusätzlich eine Kontrolle der Insertion von relativ kleinen Inserts über Blau-Weiß-Selektion^[46] ermöglicht. Zur *in vitro* Transkription wurden die Templat-Vektoren zunächst mit *XbaI* linearisiert (vgl. 2.10.6) um das RNA 3'-Ende festzulegen. Die *in vitro* Transkription wurde mittels des MEGAscript T7 *in vitro* Transkriptionskits bzw. MEGAscript T7 *in vitro* Transkriptionskits (Ambion/Applied Biosystems) nach Herstellerangaben ü.N. bei 37°C durchgeführt (siehe Abbildung 2.2). Die RNAs wurden im Anschluss ausgefällt (vgl. 2.8.10), über eine native bzw. denaturierende PAGE gelgereinigt (vgl. 2.12.3), mittels NAP5-Säulen entsalzen (vgl. 2.11.5) und im gewünschten Puffersystem bzw. Millipore-H₂O bei -20°C gelagert. Die Reinheit der RNA wurde mittels denaturierender PAGE (2.12.2.2) überprüft und die Konzentration über UV-Spektroskopie bestimmt (2.13.6). Die Faltung der RNA konnte mittels CD-Spektroskopie analysiert werden (2.13.1). Aufbau des RNA-Konstrukts, exemplarisch für die *E. coli* 23S rRNA Wildtyp-Sequenz:

5'-GGCCAGGAUGUUGGCUUAGAAGCAGCCAUCAUUUAAAGAAAGCGUAAUAGCUCACUGGUCUAG-3'

Fett markiert sind die durch den T7-Promotor (5'-Ende) und die *XbaI*-Schnittstelle (3'-Ende) bedingten zusätzlichen Nukleobasen. Das Konstrukt ist folglich insgesamt 63 nt lang.

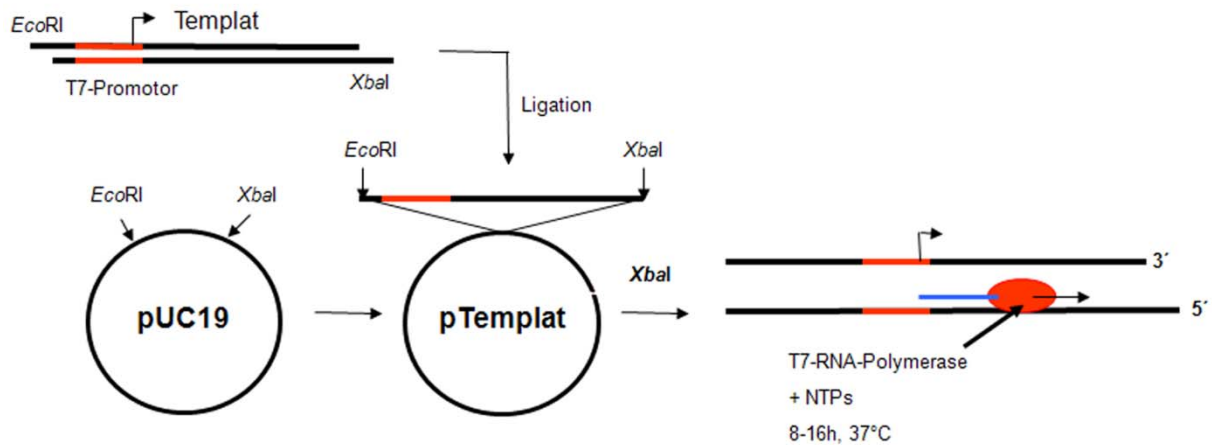


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der *in vitro* Transkriptionsstrategie

2.12.1.2 Chemische Synthese von RNA

Einige der in dieser Arbeit verwendeten RNAs wurde chemisch über standardisierte Phosphoramidit-Festphasensynthese (Dharmacon, Thermo Scientific) hergestellt. Die RNAs wurden als PAGE-gereinigte, vollständig 2'-ACE^[47] geschützte Lyophilisate eingesetzt. Zur Entschützung wurden die RNAs entsprechend der Herstellerangaben in 2'-Entschützungspuffer (saure Hydrolyse der Schutzgruppen in 100 mM Na-Acetat/TEMED pH 3.8) gelöst und für 30 min bei 60°C inkubiert. Eine anschließende Trocknung der RNAs in der Vakuumzentrifuge erlaubte die vollständige Entfernung des Puffers sowie der ACE-Hydrolyseprodukte, ohne den Verlust der RNA Konstrukte. Die RNAs wurden im Anschluss in das gewünschte Puffersystem bzw. Millipore-H₂O überführt. Die Reinheit der RNA wurde mittels denaturierender PAGE (2.12.2.1) überprüft und die Konzentration UV-spektroskopisch bestimmt (2.13.6). Eine native Konformation der RNA wurde durch thermische Denaturierung und Rückfaltung induziert (2.12.6). Die Faltung der RNA wurde mittels CD-Spektroskopie analysiert und mit durch *in vitro* Transkription hergestellten Analoga verglichen (2.13.1).

2.12.1.3 Auflistung und Extinktionskoeffizienten hergestellter RNAs

Wt (640400 cm⁻¹ M⁻¹), 2'-O-Me-A1067 (640400 cm⁻¹ M⁻¹), U1061A (644900 cm⁻¹ M⁻¹) A1067U (635900 cm⁻¹ M⁻¹), A1067G (636300 cm⁻¹ M⁻¹), A1067C (634000 cm⁻¹ M⁻¹), A1095U (638100 cm⁻¹ M⁻¹), A1095G (637500 cm⁻¹ M⁻¹), A1095C (634800 cm⁻¹ M⁻¹), U1066C (637100 cm⁻¹ M⁻¹), G1068U (640400 cm⁻¹ M⁻¹), A1089G (639700 cm⁻¹ M⁻¹)

2.12.2 Vertikale Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) von RNA und DNA

2.12.2.1 Native und Nicht-native Standard-PAGE

Synthetisierte RNA-Konstrukte bzw. DNA-Oligonukleotide wurden zu *analytischen* bzw. *präparativen* Zwecken unter denaturierenden Bedingungen (nicht-native PAGE) bzw. zu Erhaltung der natürlichen Faltung mittels nativer PAGE aufgetrennt und analysiert.

Die Polyacrylamidgelelektrophorese von 5'-³²P-markierten bzw. unmarkierten Nukleinsäuren wurde im Kleinmaßstab in Mini-Protean III Gelkammern (BioRad) bzw. im Großmaßstab in Protean II Xi Gelkammern (BioRad) durchgeführt. Die gewünschte Menge RNA wurde hierzu mit dem jeweiligen Gelladepuffer gemischt und in 10% PAGE (1×TBE)-Gelen (im Fall denaturierender Gele + 8M Harnstoff) in einem 1×TBE-Puffersystem bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA/Gel aufgetrennt (Gelgieß-, Kammer-Aufbauanleitung: siehe Betriebsanleitung der jeweiligen Kammer). Die Verwendung von RNA-Größenstandards ist bei nativen Gelen aufgrund der RNA-Faltung nicht möglich. Unter nicht-nativen Bedingungen wurden RNA-Größenstandards (Fermentas) bzw. RNA-Fragmente bekannter Größe zum Vergleich verwendet.

(a) Im Fall von *analytischen, nicht radioaktiven* RNA-Gelen wurde die Gele für 1 min mit dem Interkalationsfarbstoff Ethidiumbromid (0,0005 Gew.-% in 1×TAE-Puffer) (vgl. 2.10.12) gefärbt, kurz mit Millipore-H₂O gewaschen und photographisch dokumentiert (Geldokumentations-analage Gel Logic 200, Kodak).

(b) *Präparative, nicht radioaktive* RNA-Gele wurden auf in Plastikfolie verpackte Dünnschichtchromatographie-(DC-)-Platten mit einem 254 nm Fluoreszenzindikator transferiert und die Platten durch Applikation von UV-Licht (UV-Handlampe) zur Fluoreszenz angeregt. Die RNA konnte im Gel durch ihre Absorption im UV-Wellenlängenbereich und einer somit ausbleibenden Fluoreszenz der DC-Platte (violette Signal, „UV-Shadowing“) detektiert werden. Die entsprechenden Bereiche wurden mittels eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die RNA aus dem Gel eluiert (vgl. 2.12.3).

(c) *Analytische, radioaktive* RNA-Gele wurden im Geltrockner (BioRad, vgl. 2.12.9.1) getrocknet und mittels Phosphorimaging (2.12.9.2) analysiert.

(d) Präparative, radioaktive RNA- und DNA-Gele wurden zum Exponieren eines Röntgenfilms genutzt (vgl. 2.12.9.1) und die RNA/DNA nach der Detektion aus dem Gel eluiert (2.12.3).

2.12.2.2 Sequenziergele

Zur hochauflösenden Auftrennung von 5'-³²P-markierten Nukleinsäuren (Einzelnukleotid-Auflösung) wurde nicht-native PAGE im Sequenziergelformat^[31, 48] in Elektrophoresekammern (Sequigen-GT, BioRad) durchgeführt. Es wurden nicht-native 6-20 Gew.-% Acrylamid/1×TBE-Gele mit 6-8M Harnstoff verwendet und entsprechend der Herstellerangaben im Sequenziergel-System gegossen. Hierbei ist darauf zu achten, die vordere Glasplatte des Systems (mit Puffertank) mit Sigmacote[®] (Sigma-Aldrich) zu beschichten um zu gewährleisten, sodass die extrem dünnen Gele bei Trennen der Glasplatten nicht zerreißen und auf nur einer Glasplatte haften bleiben. Die Gele wurden für 1-2 h bei einer konstanten Leistung von 40-50 W äquilibriert und damit auf die optimale Betriebstemperatur von 50°C erwärmt (die Temperatur sollte exakt 50°C betragen, Thermofühler des Spannungsgeräts verwenden). Zwischenzeitlich wurden die RNA-Proben mit Geladepuffer gemischt, für ca. 5 min auf 95°C erhitzt und möglichst schnell in ein Eisbad überführt. Kurz vor der Beladung wurde der Gel-Kamm entfernt und überschüssiger Harnstoff aus den Geltaschen gespült. Die Proben wurden möglichst direkt z.B. mit Hilfe spezieller Gel-Ladespitzen auf die Geloberkante appliziert und für 1-2 h bei 40-50 W und 50°C Geltemperatur aufgetrennt. Das Gel wurde im Anschluss im Geltrockner (BioRad, vgl. 2.12.9.1) getrocknet und mittels Phosphorimaging (2.12.9.2) analysiert.

10×TBE-Laufpuffer

89 mM Tris-HCl pH 8.3

89 mM Borsäure

2 mM Na₂-EDTA

2× Gelladepuffer (nicht-nativ, Ambion)

95 Vol.-% Formamid

18 mM Na₂-EDTA

0,025 Gew.-% SDS

0,05 Gew.-% Xylenecyanol

0,05 Gew.-% Bromphenolblau

30% Acrylamid/Bisacrylamid

(19:1)

2.12.3 Gelelution von RNA/DNA

Zur Elution von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen wurden die Gelstücke in möglichst kleine Stücke zerschnitten und in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Gelstücke wurden mit 3-5 ml Millipore-H₂O versetzt und die RNA ü.N. bei RT unter Schütteln eluiert. Die Flüssigkeit wurde am nächsten Tag möglichst vollständig abgenommen und gelagert. Zur vollständigen Elution wurden die Gelstücke nochmals mit 3 ml Millipore-H₂O für 2 h geschüttelt. Die RNA-Lösungen wurden vereint und mittels einer SpeedVac-Vakuumentrifuge bis auf ein Volumen von 100 (radioaktive Proben) bis 500 µl (nicht-radioaktive Proben) konzentriert. Im Falle radioaktiver-markierter Nukleinsäuren wurden diese nun präzipitiert (vgl. 2.10.10) und im Zielpuffersystem bzw. Millipore-H₂O bei -20°C gelagert. Nicht-radioaktive Proben wurden mittels NAP-5-Säulen (vgl. 2.11.5) in das gewünschte Puffersystem oder Millipore-H₂O gebracht und bei -20°C gelagert. Die Reinheit gelgereinigter RNA konnte im Folgenden mittels Massenspektroskopie (2.13.7); UV-Spektroskopie (2.13.6); CD-Spektroskopie (2.13.1) bzw. analytische, nicht-native PAGE (2.12.2.1) analysiert werden.

2.12.4 Dephosphorylierung von RNA

DNA- bzw. RNA-Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Enzyms alkalische Phosphatase (Calf Intestine Phosphatase, CIP, Fermentas) 5'-dephosphoryliert. Pro Ansatz wurden 100 pmol phosphorylierte Nukleinsäure-Termini mit 0,02 U/µl Phosphatase im vom Hersteller empfohlenen Puffersystem (Fermentas) in einem Gesamtvolumen von 500 µl für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden im Anschluss mit Phenol/Chloroform extrahiert (2.10.9), ausgefällt (2.10.10) und im gewünschten Puffersystem bzw. Millipore-H₂O resuspendiert.

2.12.5 Radioaktive 5'-³²P-Markierung von DNA und RNA

Dephosphorylierte DNA- bzw. RNA-Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Enzyms T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK, Fermentas) 5'-³²P-markiert. Das Enzym katalysiert hierbei den Transfer eines ATP-³²P-γ-Phosphats an die 5'-Hydroxygruppe von DNA/RNA-Oligonukleotiden. Pro Ansatz wurden 20 pmol dephosphorylierte Nukleinsäure-Enden mit 20 pmol γ-³²P-ATP (150 mCi/ml; 6000 Ci/mmol, Perkin Elmer) und 10 U T4-PNK in 1×Reaktionspuffer (Fermentas) in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 30 min bei 37°C phosphoryliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA (final 1 mM) und 2 min Erhitzung auf 95°C gestoppt.

Überschüssiges γ -³²P-ATP wurde im Anschluss mittels illustra Minispin G25/G50 Gelfiltrationssäulen (GE Healthcare) nach Herstellerangaben entfernt und die RNA mittels PAGE gelgereinigt (2.12.2.1). Die spezifische Aktivität der markierten Proben wurde mittels eines Szintillationszählers (WALLAC 1409, Wallac Oy) bestimmt.

2.12.6 Thermische Denaturierung und Rückfaltung von RNA

Fragmente der 23S rRNA von *E. coli* wurden zur Rückfaltung in Anlehnung an Bausch *et al.*^[49] in Renaturierungspuffer für 5 min auf 65°C erhitzt und langsam (ca. 15 min) auf 25°C gekühlt.

Renaturierungspuffer

10 mM MOPS pH 7.0

20 mM MgCl₂

175 mM KCl

2.12.7 Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA)

Der EMSA- oder auch "Gelshift"-Assay^[50] ist eine Affinitäts-Elektrophoresetechnik, die im Allgemeinen die Analyse von Nukleinsäure/Protein-Interaktionen im Rahmen einer nativen Polyacrylamidgelelektrophorese erlaubt. Die Wanderungsgeschwindigkeit von Biomakromolekülen in Gelelektrophoresen ist bei konstanter Stromstärke neben der Gelpolymerkonzentration primär von der Molekülgröße bzw. -masse und Ladung abhängig. Nukleinsäuren besitzen aufgrund ihres modularen Aufbaus ein konstantes Masse/Ladungsverhältnis mit genau einer negativen Ladung/Nukleotid und zeigen ein dementsprechend charakteristisches Laufverhalten. Die spezifische Interaktion solcher Nukleinsäuren mit weiteren ungeladenen Makro- oder auch Kleinmolekülen in Form von Molekülkomplexen verändert das Masse/Ladungsverhältnis des Komplexes und dementsprechend dessen Mobilität im Gel. Dies äußert sich im Gel durch eine, im Vergleich zur ungebundenen Nukleinsäure, kürzere Laufstrecke des Komplexes, den so genannten „Gelshift“. Ist es dem Komplex möglich noch weitere ungeladene Makromoleküle zu binden, äußert sich dies durch eine noch weitere Reduktion der Komplexmobilität, so genannten „Supershifts“.

Bedingungen: Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen „Gelshift“-Assays wurden zur Analyse von Komplexen aus *E. coli* 23S rRNA Fragmenten; bakteriellen, ribosomalen L11

Proteinen und verschiedenen Thiopeptid-Antibiotika genutzt. Die elektrophoretischen Trennungen wurden hierzu in nativen 10 Gew.-% Acrylamid-(1×TBE)-Gelen in Mini-Protean III Gelkammern (BioRad) durchgeführt. Zur Erhöhung der Komplexstabilität wurden die Experimente standardmäßig unter eiskalten Bedingungen durchgeführt. Die Gelkammern wurden hierzu mit eisgekühltem Laufpuffer gefüllt, in Eisboxen vollständig mit Eis ummantelt und so bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA für 1 h äquilibriert. Das System wurde je nach Fragestellung für die Analyse unmarkierter **(a)** fluoreszenzmarkierter **(b)** oder radioaktiv-³²P-markierter Komplexe **(c)** genutzt.

Probenvorbereitung und Gellauf: Für die EMSA-Studien wurden die gewünschte Menge (markierter) RNA mit variierenden Konzentrationen L11-Protein und/oder Thiopeptid (ev. fluoreszenzmarkiert) in Bindepuffer für 1 h bei 4°C inkubiert und nach Zugabe des Gelladepuffers auf die äquilibrierten Gele geladen. Die Proben wurden im Anschluss bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA für 2-3 h aufgetrennt.

Geldokumentation: **(a)** Im Fall vollständig unmarkierter RNA-Protein-(Thiopeptid)-Komplexe wurden mögliche „Gelshifts“ über eine Ethidiumbromidfärbung der RNA (vgl. 2.12.2.1a) nachgewiesen und dokumentiert. **(b)** Im Fall fluoreszenzmarkierter Komplexe wurden die Gele im PhosphorImager FLA-5000 (vgl. 2.12.9.3) unter der Verwendung eines Lasers entsprechender Wellenlänge angeregt und fluoreszente Banden so detektiert. **(c)** Radioaktive Gele wurden getrocknet (2.12.9.1), mittels PhosphorImaging (2.12.9.3) digitalisiert und schließlich *in silico* analysiert.

10×TBE-Laufpuffer

89 mM Tris-HCl pH 8.3

89 mM Borsäure

2 mM Na₂-EDTA**3× „Gelshift“-Ladepuffer**

1×TBE pH 8.3

10 Gew.-% Ficoll

0,05 Gew.-% Bromphenolblau

0,05 Gew.-% Xylencyanol

Bindepuffer

10 mM MOPS pH 7.0

10 mM MgCl₂

100 mM KCl

2.12.7.1 Durchführung und *in silico* Analyse von radioaktiven EMSA zu Abschätzung von Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K_D)

Radioaktive „Gelshifts“ wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Abschätzung von Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten von 23S rRNA/L11-Komplexen bzw. 23S rRNA/L11-Thiopeptid-Komplexen genutzt. Da die Affinitäten der Komplexpartner am Anfang solcher Studien nicht bekannt sind, werden sie generell bei sehr geringen Konzentrationen der markierten Komponente (0,1-1 nM RNA) durchgeführt, welche mit aufsteigenden Konzentrationen des Bindungspartners (Protein, Ligand) titriert werden. Eine solche K_D -Bestimmung beruht auf der Annahme, dass die jeweils detektierten Bandenintensitäten proportional zu den Molekül- bzw. Komplexkonzentrationen zum Zeitpunkt der Gelbeladung sind. Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_D ist definiert als:

$$(5) \quad K_D = \frac{[RP]}{[R][P]}$$

Außerdem gilt: $K_D = [P]$, wenn: $[RP] = [R]$; mit $[R]$: Konzentration der freien RNA; $[P]$: Konzentration des freien Proteins und $[RP]$: Konzentration des Komplexes. Eine Abschätzung des K_D -Werts ist demnach über die Bestimmung des freien Proteins $[P]$ möglich. Er entspricht der Konzentration des freien Proteins bei der 50% der RNA gebunden vorliegt. Ist die Konzentration der freien RNA zusätzlich viel kleiner als der K_D ($[R] \ll K_D$), entspricht die freie Proteinkonzentration ungefähr der Gesamteinkonzentration ($[P] \sim [P] + [RP]$).

$$(6) \quad \text{Folglich gilt bei } ([R] \ll K_D) \rightarrow K_D \sim [P] + [RP]$$

Der K_D entspricht demnach ungefähr der Proteingesamtkonzentration bei der 50% der RNA gebunden vorliegt.^[51]

(a) Gelshift-Titrations zur Bestimmung der 23S rRNA/L11-Affinität

Zur Bestimmung der RNA/L11-Affinität wurden konstante Konzentrationen ^{32}P -markierter RNA (1 nM) in Bindepuffer (10 mM MOPS pH 7.0, 10 mM MgCl_2 , 100 mM KCl) mit aufsteigenden Konzentrationen von *EcoL11*- bzw. *TthL11* titriert und entsprechend 2.12.7 gelelektrophoretisch aufgetrennt.

(b) Gelshift-Titrations zur Bestimmung der RNA/L11/Thiopeptid-Affinität

Die Grundlage dieser Titrations bildet der Befund, dass unter den Analysebedingungen (1 nM ^{32}P -markierte RNA und bis 10 μM *EcoL11*) kein Gelshift für den *EcoL11*/RNA-Komplex zu beobachten war, wo hingegen im Fall von *TthL11* bereits 17,7 nM Protein zu einer halbmaximalen Komplexbildung führten (vgl. Kapitel 3). Wurden jedoch konstante Konzentrationen von RNA (1 nM) und *EcoL11* (0,7 μM) in Bindepuffer mit aufsteigenden Konzentrationen der Thiopeptide Thiostrepton bzw. Nosiheptid titriert, führte dies zu einem konzentrationsabhängigen Auftreten von „Gelshifts“. Dieses Phänomen wurde zur Abschätzung von RNA/L11/Thiopeptid-Affinitäten genutzt.

Nach der Durchführung und Dokumentation der radioaktiven „Gelshift“-Experimente wurden die digital erfassten Gele mittels der AIDA-Software (v3.22, Kodak) oder Adobe Photoshop (Creative Suite 2, Adobe) analysiert und Bandenintensitäten von RNA/L11- bzw. RNA/L11/Thiopeptid-Komplexen („shift“) und RNA allein („unshift“) bestimmt. Die Bandenintensitäten (I) wurden mittels folgender Gleichung normiert:

$$(7) \quad \% \text{ Bindung} = \frac{I_{\text{shift}}}{I_{\text{shift}} + I_{\text{unshift}}} \times 100$$

Die normierten Intensitäten wurden graphisch gegen die Proteingesamtkonzentration aufgetragen. Die hieraus resultierenden sigmoidalen Kurven wurden zur Ermittlung des jeweiligen Komplex- K_D mittels nicht-linearer Regression an die Hill-Gleichung angepasst (OriginPro v7.5, OriginLab Corporation).

2.12.8 Geldokumentation Fluoreszenz- bzw. Phosphorimaging

Die Dokumentation fluoreszenter (a) bzw, radioaktiver (b) PAGE-Gele wurde im PhosphorImager (FLA-5000, Fujifilm) durchgeführt: (a) Fluoreszente PAGE-Gele wurden direkt unter der Verwendung eines Lasers entsprechender Anregungswellen (473, 532 bzw. 635 nm) analysiert und in der gewünschten Auflösung gescannt. (b) Radioaktive PAGE-Gele wurden zunächst zur Belichtung (einige Minuten bis ü.N.) von FLA-5000 Imaging-Platten genutzt. Die Platten wurden nach Beendigung der Belichtungsdauer im IP-Modus des Imagers in der gewünschten Auflösung gescannt.

Eine digitale Nachbearbeitung und Analyse der Scans war über die AIDA-Software (v3.22, Kodak) oder AdobePhotoshop (Creative Suite 2, Adobe) möglich.

2.12.9 Entwicklung und Analyse radioaktiver PAGE-Gele

2.12.9.1 Gel-Entwicklung

Präparative, radioaktive RNA/DNA-PAGE-Gele wurden nach dem Gellauf, auf einer der beiden Elektrophorese-Glasplatten klebend, in Frischhaltefolie verpackt und die radioaktive Strahlung zur Belichtung eines Röntgenfilms (CL-XPosure, Pierce) genutzt. Der durch die Filmschwärzung angezeigt radioaktive RNA-haltige Gelbereich wurde mittels eines Skalpell aus geschnitten und die RNA aus dem Gel eluiert (vgl. 2.12.3).

Analytische radioaktive PAGE-Gele, wie „Gelshift“-Assays oder Sequenziergele wurden nach dem Gel-Lauf auf Whatman-Papier übertragen und zum Versiegeln des Gels kurz in 10% (v/v) Essigsäure gelegt. Die Gele wurden im Anschluss blasenfrei mit Frischhaltefolie bedeckt, für 1 h im Geltrockner (BioRad) getrocknet und anschließend mittels PhosphorImaging (2.12.9.2) dokumentiert.

2.12.9.2 Geldokumentation Fluoreszenz- bzw. Phosphorimaging

Die Dokumentation fluoreszenter (a) bzw, radioaktiver (b) PAGE-Gele wurde im PhosphorImager (FLA-5000, Fujifilm) durchgeführt: (a) Fluoreszente PAGE-Gele wurden direkt unter der Verwendung eines Lasers entsprechender Anregungswellen (473, 532 bzw. 635 nm) analysiert und in der gewünschten Auflösung gescannt. (b) Radioaktive PAGE-Gele wurden zunächst zur Belichtung (einige Minuten bis ü.N.) von FLA-5000 Imaging-Platten genutzt. Die Platten wurden nach Beendigung der Belichtungsdauer im IP-Modus des Imagers in der gewünschten Auflösung gescannt.

Eine digitale Nachbearbeitung und Analyse der Scans war über die AIDA-Software (v3.22, Kodak) oder AdobePhotoshop (Creative Suite 2, Adobe) möglich.

2.13 Biophysikalische Methoden

2.13.1 Circular dichroismus-(CD)-Spektroskopie

Sekundärstrukturen bzw. Sekundärstrukturänderungen von Proteinen, RNAs bzw. Protein/RNA-Komplexen wurden mittels CD-Spektroskopie (*circular dichroism*, CD) untersucht. Die Methode basiert auf der unterschiedlichen Absorption einer optisch aktiven Substanz von links- bzw. rechts-polarisiertem Licht in Abhängigkeit ihrer strukturellen Assymetrie. Linear polarisiertes Licht kann als Überlagerung von rechts- und links-polarisiertem Licht gleicher Amplitude und Phase betrachtet werden. Eine Projektion der resultierenden Amplitude entspricht hier einer Geraden. Absorbiert eine optisch aktive Substanz nun das Licht einer der beiden Polarisierungsrichtungen stärker als die andere Richtung, erniedrigt sich die entsprechende Amplitude. Die resultierende Amplitude dieser beiden Schwingungen in der Projektion entspricht nun nicht mehr einer Geraden sondern einer Ellipse. Das Auftreten einer solchen Elliptizität wird als Circular dichroismus bezeichnet. Je nach Wellenlänge können für eine optisch aktive Probe, in Anhängigkeit der Struktur, positive und negative Signale detektiert werden.^[52]

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die CD-Spektroskopie u.a. zum Vergleich und Kontrolle der Faltung von Proteinen bzw. RNAs und mutierten Derivaten genutzt. Im Fall von Proteinen ist die Konformation der Peptidbindung in Strukturmotiven wie α -Helices, β -Faltblättern und „random coils“ entscheidend, welche in einem Wellenlängenbereich von **190-250 nm** untersucht wurde. Im Fall von RNAs ist Konformation der Ribose-Einheiten (C3'-endo bzw. C2'-endo) sowie der Nukleobasen (*syn* bzw. *anti*) konformations- bzw. CD-signalbestimmend und wurde in einem Wellenlängenbereich von **200-300 nm** untersucht.^[53] (Siehe hierzu auch www.imb-jena.de/ImgLibDoc/cd/index.htm)

2.13.1.1 Generelle Durchführung

CD-Spektren wurden in einem CD-Spektrometer (J-815, Jasco) bei 5°C (Peltierelement PTC-423 S, Jasco) oder RT in Quatzküvetten verschiedener Schichtdicken (0,1-1 cm) aufgenommen. Die Bearbeitung der Spektren wurde mit dem Programm Spectra Manager (Jasco Software Packet v1.0) durchgeführt. Die Proben wurden bei konstanten Stickstofffluss

von 3 l/min bei folgenden Parametern vermessen: Schrittweite: 0,5 nm; Bandbreite: 0,5 nm; Geschwindigkeit: 100 nm/min; 10-20 Akkumulationen.

2.13.1.2 Faltungsanalysen von RNA- bzw. Proteinmutanten

CD-Spektren der jeweiligen Protein- oder RNA-Mutanten bzw. Derivate (konstante Konzentrationen; 1-5 μM) wurden in 25 mM Natrium- bzw. Kaliumphosphatpuffer pH 8.0 (+ 10 mM MgCl_2 bei RNAs) aufgenommen und mit dem CD-Spektrum des Wildtyps verglichen.

2.13.1.3 CD-Titrations zur Analyse des Einflusses organischer Lösungsmittel auf die Faltung von RNA und Protein

Zur Analyse des Einflusses des organischen Lösungsmittels Trifluorethanol (TFE) auf die Faltung von Biomakromolekülen wurden konstante Konzentrationen des gewünschten Moleküls (1-5 μM) in 25 mM Natrium- bzw. Kaliumphosphatpuffer pH 8.0 (+ 10 mM MgCl_2 bei RNAs) mit variierenden Konzentrationen TFE hergestellt und vermessen.

2.13.1.4 CD-Titrations zur Analyse des Einflusses von Thiopeptidantibiotika auf die Faltung des ribosomalen Proteins L11, 23S rRNA-Fragmenten bzw. L11/23S rRNA-Komplexen

Zur Analyse des Einflusses verschiedener Thiopeptidantibiotika auf die Faltung von L11/23S rRNA-Komplexen wurden äquimolare Mischungen (1-5 μM) von RNA und Protein bzw. das jeweilige Makromolekül allein, mit variierenden Konzentrationen des gewünschten Thiopeptids versetzt und die CD-Spektren nach 1 h Inkubation auf Eis aufgenommen. Die Messwerte der Spektren-Minima bzw. Maxima wurden mit der Software OriginPro v7.5 (OriginLab Corporation) graphisch gegen die eingesetzte Thiopeptid-Konzentration aufgetragen und analysiert.

2.13.2 Fluoreszenzpolarisation bzw. -anisotropie

Das Prinzip der Fluoreszenzpolarisation bzw. -anisotropie, zuerst durch Perrin (1926) beschrieben, basiert auf der Eigenschaft fluoreszenter Moleküle, bei einer Anregung mit linear-polarisiertes Licht ebenfalls linear-polarisiertes Licht zu emittieren.^[54] Ist das Molekül dabei stationär, entspricht die Polarisation/Anisotropie des emittierten Lichts exakt der des anregenden Lichts. Da Moleküle jedoch in starker Bewegung (Rotation, etc.) sind, ändert sich

die Polarisation/Anisotropie des Emissionslichts in Abhängigkeit der Stärke der Molekularbewegung. Die Polarisation/Anisotropie eines Moleküls ist proportional zur Rotations-Relaxations-Zeit d.h. der Zeit die es braucht um einen Winkel von $68,5^\circ$ zu rotieren. Die Rotations-Relaxations-Zeit ist ihrerseits anhängig von der Viskosität des Lösungsmittels, der Temperatur des Systems, der Gaskonstante und der Größe des Moleküls. Kleine Moleküle rotieren sehr schnell und das emittierte Licht ist im Vergleich zum Anregungslicht stark depolarisiert (kleine Polarisationssignale). Große Moleküle hingegen rotieren langsam und das emittierte Licht bleibt stark polarisiert (große Polarisationssignale). Zur Messung der Fluoreszenzpolarisation/-anisotropie eines Moleküls wird dieses mit z.B. vertikal-polarisiertem Licht seiner Anregungswellenlänge angeregt und die Intensität des emittierten Lichts in der vertikalen und horizontalen Ebene gemessen. Die Fluoreszenzpolarisation P und Fluoreszenzanisotropie r sind definiert als:

$$(8) \quad P = \frac{(I_{\parallel} - GI_{\perp})}{(I_{\parallel} + GI_{\perp})}, \quad r = \frac{(I_{\parallel} - GI_{\perp})}{(I_{\parallel} + 2GI_{\perp})} \Rightarrow P = \frac{3r}{(2+r)}, \quad r = \frac{2P}{(3-P)}$$

mit I_{\parallel} : vertikale Emissionsintensität, I_{\perp} : horizontale Emissionsintensität G : Gerätefaktor

Die Fluoreszenzpolarisation/-anisotropie eignet sich sehr gut zur Analyse von Molekülinteraktionen wie von Nukleinsäure-Protein-, Protein-Protein- bzw. Protein-Nukleinsäure-Liganden-Interaktionen. In Gleichgewichtstitrationen wird hierbei die Änderung der Größe und entsprechend der Polarisation der Emission eines (fluoreszenzmarkierten) Liganden an ein weiteres Molekül zur Bestimmung von Molekülaffinitäten genutzt.^[55]

Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Fluoreszenzpolarisationsexperimente wurden als Gleichgewichtstitrationen mit Fluorescein-markierten Thioestreptonsonden^[8, 56] (Abb. 2.4) in einem Safire II Plattenlesegerät (Tecan) in 384-Mikrotiter-Lochplatten (Optiplate-384 F, PerkinElmer) durchgeführt. Die Fluorescein-Einheit der Thioestreptonsonde wurde mit linear-polarisiertem Licht einer Wellenlänge von 470 nm angeregt und die Fluoreszenzemission bei 520 nm detektiert. Folgende Geräteeinstellungen wurden verwendet: G-Faktor: 1,154; Emissionsbandbreite: 5 nm; optimal gain; 50 Scans pro Loch; 22°C.

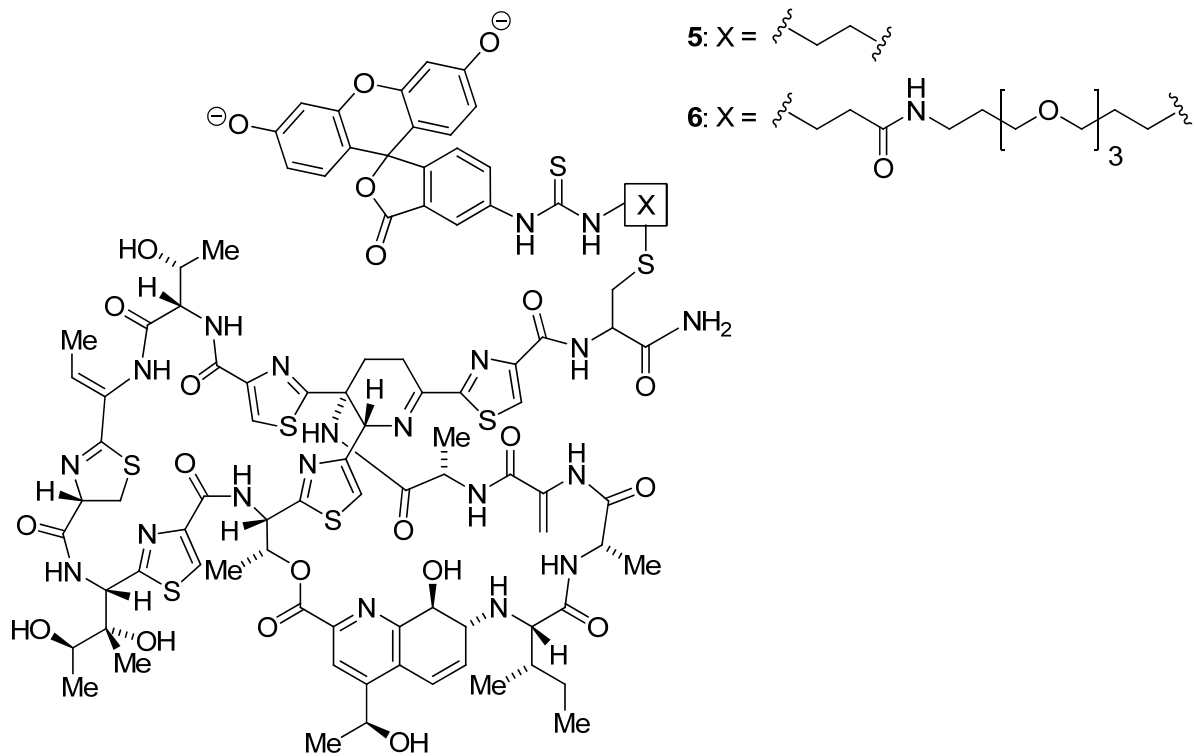


Abbildung 2.4: Chemische Strukturen der verwendeten fluoreszenten Thiostreptonsonden **5** und **6**.

2.13.2.1 Bestimmung der Sondenaffinität an *E. coli* 23S rRNA-Fragmente bzw. an das ribosomale Protein L11

Zur Bestimmung der Affinität der fluoreszenten Thiostreptonsonde **5** bzw. **6** an isolierte Fragmente der *E. coli* 23S rRNA (1051-1109) bzw. L11-Proteine wurden unter Gleichgewichtsbedingungen, konstante Konzentrationen der Sonde (5 bzw. 40 nM) in Bindepuffer (5 mM MOPS pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 5 Vol.-% TFE) in einem Gesamtvolumen von 50 µl/Loch, mit variierenden Konzentrationen RNA oder Protein titriert. Es wurden hierzu serielle 1:1 Verdünnung von RNA bzw. Protein in einem Volumen von 40 µl/Loch erstellt und die Sonde im Anschluss in einem Volumen von 10 µl zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei 4°C wurden die Platten ausgelesen. Titrationsen dieser Art wurden dreifach durchgeführt und Mittelwerte bestimmt.

2.13.2.2 Bestimmung der Sondenaffinität an 23S rRNA-L11-Komplexe

Zur Bestimmung der Affinität der fluoreszenten Thiostreptonsonde **5** bzw. **6** an Komplexe der *E. coli* 23S rRNA-Fragmente (bzw. Mutanten) und dem ribosomalen Protein L11 (bzw. Mutanten) wurden unter Gleichgewichtsbedingungen, konstante Konzentrationen der Sonde

(5 nM) und Protein (0,6 μ M) in Bindepuffer (5 mM MOPS pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 5 Vol.-% TFE) in einem Gesamtvolumen von 50 μ l/Loch mit variierenden Konzentrationen der RNA titriert. Es wurden hierzu serielle 1:1 Verdünnung von RNA in einem Volumen von 40 μ l/Loch erstellt und Protein und Sonde im Anschluss in einem Volumen von 10 μ l zugefügt. Titrationsen dieser Art wurden mindestens dreifach durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei 4°C wurden die Platten ausgelesen.

Titrationen konstanter Konzentrationen der Sonde und des Proteins mit RNA induzierten einen signifikanten Anstieg des Polarisationsignals. Die graphische Auftragung der Polarisationswerte gegen die RNA-Konzentration lieferte charakteristische sigmoidale Kurven.

In Abbildung 2.5 ist eine Übersicht aller möglichen Gleichgewichte bzw. Vergleichsgewichte des ternären Komplexes aus 23S rRNA, L11 und Sonde (T^*) dargestellt:

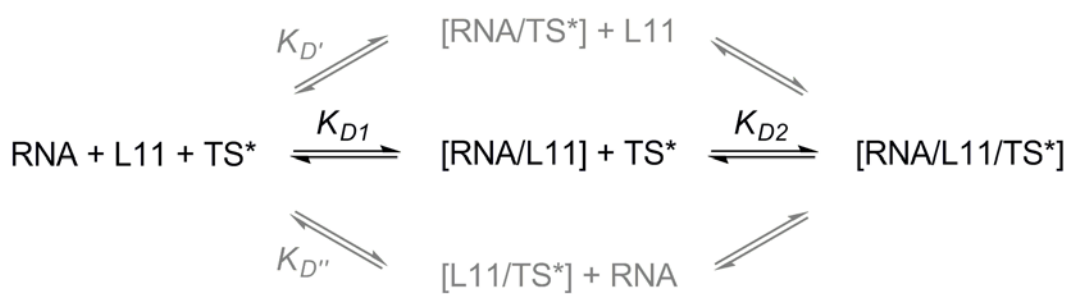


Abbildung 2.5: Darstellung aller möglichen Gleichgewichte des ternären Komplexes aus 23S rRNA, L11 und Sonde (T^*). In dieser Arbeit dokumentierte Gleichgewichte sind in schwarz dargestellt. Unter den verwendeten Bedingungen nicht-detektierte Interaktionen bzw. Gleichgewichte sind grau dargestellt.

Die unter 2.13.2.1 beschriebenen Titrationsen der Sonde mit RNA bzw. Protein lieferte keine Änderung des Polarisationsignals (vgl. Kapitel 3). Unter den hier betrachteten Bedingungen bindet die Sonde demnach nicht an Protein und RNA allein, die Gleichgewichtskonstanten $K_{D'}$ bzw. $K_{D''}$ der Vergleichsgewichte $RNA + TS^* \rightleftharpoons [RNA/TS^*]$ bzw. $L11 + TS^* \rightleftharpoons [L11/TS^*]$ sind also für weitere Betrachtungen zu vernachlässigen. K_{D1} des Vergleichsgewichts $RNA + L11 \rightleftharpoons [RNA/L11]$ wurde auf Basis von EMSA-Studien bestimmt.^[8]

Zur Ermittlung der Sonden-Komplex-Affinität K_{D2} wurden diese Messkurven mittels nicht-linearer Regression (OriginPro v7.5, OriginLab Corporation) an die folgende Formel für zwei

gekoppelte Gleichgewichte $\text{RNA} + \text{L11} \rightleftharpoons [\text{RNA/L11}]$ und $[\text{RNA/L11}] + \text{TS}^* \rightleftharpoons [\text{RNA/L11/TS}^*]$ angepasst:

$$(9) A = (A_{max} - A_0) \left(\frac{c_{RNA} + T^* + \frac{k_1 k_2}{l} + k_2}{2T^*} - \sqrt{\left(\frac{c_{RNA} + T^* + \frac{k_1 k_2}{l} + k_2}{2T^*} \right)^2 - \frac{c_{RNA}}{T^*}} \right) + A_0$$

mit A : Anisotropie/Polarisation; A_{max} und A_0 : max./min Polarisationwerte; c_{RNA} : Konzentration des RNA-Fragments; T^* : Konzentration der fluoreszenten Thiostreptonsonde (5 nM); l : Konzentration des L11-Proteins (0,6 μM); k_1 : K_{D1} der RNA/L11-Komplex Bildung; k_2 : K_{D2} der Sonden + RNA/L11-Komplex Bildung. Zur Herleitung der Formel siehe Anhang.

2.13.2.3 Verdrängungstitrationen der Thiostreptonsonde zur Bestimmung scheinbarer Affinitäten (K_{app}) von Thiopeptid-Naturstoffen und -Derivaten an isolierten L11/23S rRNA Komplexen

Verdrängungstitrationen wurden unter Verwendung konstanter Konzentrationen der Thiostreptonsonde **5** bzw. **6** (5 nM), des 23S rRNA Wildtyp-Fragments (5 nM), des *Tth*L11 Wildtyps (0,6 μM) und variierender Konzentrationen der thiopeptidischen Analytverbindung in Bindepuffer (5 mM MOPS pH 7.5, 5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 5 Vol.-% TFE) durchgeführt. Aufgrund der hohen Affinität der Thiostreptonsonde an den Komplex, war die Reihenfolge der Zugabe der einzelnen Bestandteile von entscheidender Bedeutung für den Erfolg des Experiments. Protein, Thiostreptonsonde wurden deshalb zunächst in Bindepuffer (40 μl) in die gewünschte Anzahl von Löchern vorgegeben. In das jeweils 1.Loche pro Reihe (A1, B1, C1, etc.) wurden 40 μl derselben Protein/Sondenmischung, diesmal zusätzlich mit der gewünschten Konzentration der Analytverbindung ($\times 2$), gegeben und zur Herstellung einer Verdünnungsreihe seriell 1:1 verdünnt. Die Komplexbildung und gleichzeitig das Verdrängungsexperiment wurden im Anschluss durch die Zugabe der RNA (10 μl) ausgelöst. Aktive Analytverbindung induzierten einen konzentrationsabhängigen signifikanten Abfall des Polarisationssignals, welcher die Verdrängung der Thiostreptonprobe vom Komplex anzeigte. Die resultierenden sigmoidalen Kurven wurde an die Hill-Funktion angepasst und die erhaltenen IC_{50} -Werte über folgende Gleichung in scheinbare K_D -Werte (K_{app}) umgerechnet:

$$(10) \quad K_{app} = \frac{IC_{50}}{TS^*} \times k_2$$

mit K_{app} : scheinbarer K_D ; IC_{50} : Konzentration der Analytverbindung bei halbmaximaler Polarisation; TS^* : Konzentration der Thioestreptonsonde; k_2 : K_{D2} der Thioestreptonsonde + RNA/L11 Komplexbildung^[8]

2.13.2.4 Analyse des Einflusses von Mg^{2+} -Ionen auf die Bildung des ternären Komplexes

Zur Analyse des Einflusses von Mg^{2+} -Ionen auf die Bildung des ternären Komplexes aus L11, 23S rRNA und der Thioestreptonsonde wurden konstante Konzentrationen der Thioestreptonsonde **6** (5 nM), des 23S rRNA Wildtyp-Fragments (5 nM) und des *Tth*L11 Wildtyps (0,6 μ M) in 5 mM MOPS pH 7.5, 50 mM KCl, 5 Vol.-% TFE mit aufsteigenden Konzentrationen $MgSO_4$ titriert. Die graphische Auftragung der Messwerte gegen die eingesetzte Mg^{2+} -Konzentration ergab sigmoidale Kurven, welche zur Ermittlung der halbmaximalen, zur Komplexbildung benötigten Mg^{2+} -Menge, an die Hill-Funktion angepasst wurden.

2.13.2.5 Bestimmung der Sondenaffinität an isolierte 70S Ribosomen

Zur Bestimmung der Affinität der fluoreszenten Thioestreptonsonde **5** bzw. **6** an isolierte prokaryotische 70S Ribosomen (Wildtyp oder Chimären, vgl. 2.8.16.1) wurden unter Gleichgewichtsbedingungen, konstante Konzentrationen der Sonde (5 nM) in Bindepuffer (5 mM MOPS pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 5 Vol.-% TFE) in einem Gesamtvolumen von 50 μ l/Loch, mit variierenden Konzentrationen von Ribosomen (als Triplikat) titriert. Hierzu wurden 40 μ l Bindepuffer/Loch vorgegeben und in das jeweils 1.Loch/Reihe (A1, B1, C1, etc.) 40 μ l Ribosomenlösung (gewünschte Konzentration in Bindepuffer) gegeben und seriell 1:1 verdünnt. Die Sonde wurde im Anschluss in einem Volumen von 10 μ l zugefügt. Nach einer Inkubationszeit 16 h bei 4°C wurden die Platten ausgelesen. Titrationsen dieser Art zeigten einen konzentrationsabhängigen Anstieg des Polarisationsignals. Die graphische Auftragung des Polarisationsignals als Funktion der Ribosomenkonzentration lieferte sigmoidale Kurven, welche zur Bestimmung scheinbarer Sonden/Ribosomen-Affinitäten (K_{app}) an die Hill-Gleichung angepasst wurden (OriginPro v7.5, OriginLab Corporation).

2.13.2.6 Verdrängungstitrationen der Thiostreptonsonde zur Bestimmung scheinbarer Affinitäten (K_{app}) von Thiopeptid-Naturstoffen und -Derivaten an isolierten *E. coli* Ribosomen

Die Verdrängungstitrationen wurden unter Verwendung konstanter Konzentrationen der Thiostreptonsonde **5** bzw. **6** (5 nM), isolierten *E. coli* Ribosomen (5 nM) und variierender Konzentrationen der thiopeptidischen Analytverbindung in Bindepuffer (5 mM MOPS pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 5 Vol.-% TFE) durchgeführt. Die Thiostreptonsonde wurde zunächst in Bindepuffer (40 µl) in die gewünschte Anzahl von Löchern vorgegeben. In das jeweils 1. Loch pro Reihe (A1, B1, C1, etc.) wurden zusätzlich 39 µl der Sondenlösung und 1 µl der gewünschten Analytverbindung (in TFE) gegeben und zur Herstellung einer Verdünnungsreihe seriell 1:1 verdünnt. Das Verdrängungsexperiment wurde im Anschluss durch die Zugabe der Ribosomenlösung (10 µl) gestartet.

2.13.2.7 Bestimmung der Sondenaffinität an isolierten 20S Proteasomen aus *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Bestimmung der Affinität der fluoreszenten Thiostreptonsonde **2** an isolierte eukaryotische 20S Proteasomen (*Saccharomyces cerevisiae*) wurden konstante Konzentrationen der Sonde (1 µM) in Bindepuffer (10 mM MOPS pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 10 Gew.-% Glucose) in einem Gesamtvolumen von 50 µl/Loch, mit variierenden Konzentrationen von Proteasom (dreifach) titriert. Hierzu wurden 40 µl Bindepuffer/Loch vorgelegt und in das jeweils 1. Loch/Reihe (A1, B1, C1, etc.) 40 µl Proteasomenlösung (gewünschte Konzentration in Bindepuffer) gegeben. Dann wurde seriell 1:1 verdünnt. Die Sonde (**5**) wurde im Anschluss in einem Volumen von 10 µl zugefügt. Nach einer Inkubationszeit 16 h bei 4°C wurden die Platten ausgelesen (vgl. 2.13.2). Titrationsen dieser Art zeigten einen konzentrationsabhängigen Anstieg des Anisotropiesignals. Die Auftragung des Anisotropiesignals als Funktion der Proteasomenkonzentration lieferte sigmoidale Kurven, welche zur Bestimmung scheinbarer Sonden/Proteasom-Affinitäten (K_{app}) an die Hill-Gleichung angepasst wurden (OriginPro v7.5, OriginLab Corporation).

2.13.2.8 Verdrängungstitrations der Thiostreptonsonde zur Bestimmung scheinbarer Affinitäten (K_{app}) von Thiopeptid-Naturstoffen und –Derivaten an isolierten 20S Proteasomen aus *Saccharomyces cerevisiae*

Verdrängungstitrations wurden unter Verwendung konstanter Konzentrationen der Thiostreptonsonde **5** (1 μM), isolierten 20S Proteasomen (10 μM) und variierender Konzentrationen der thiopeptidischen Analytverbindung in Bindepuffer (5 mM MOPS pH 7.5, 5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 5 Vol.-% TFE) durchgeführt. Die Thiostreptonsonde wurde zunächst in Bindepuffer (40 μl) in die gewünschte Anzahl von Löchern vorgegeben. In das jeweils 1. Loch pro Reihe (A1, B1, C1, etc.) wurden zusätzlich 39 μl der Sondenlösung und 1 μl der gewünschten Analytverbindung (in TFE) gegeben und zur Herstellung einer Verdünnungsreihe seriell 1:1 verdünnt. Das Verdrängungsexperiment wurde im Anschluss durch die Zugabe der Proteasomlösung (10 μl) gestartet und Inkubationszeit 16 h bei 4°C analysiert (vgl. 2.13.2).

2.13.2.8 Datennormierung

Die Normierung von Messdaten wurde mittels der folgenden Formel durchgeführt:

$$(11) \quad \%Komplex = \left(\frac{P_{Messwerte} - P_{min}}{P_{max} - P_{min}} \right) \times 100$$

mit $P_{Messwerte}$: Polarisationsmesswert, P_{min} : minimaler Polarisationswert des Kurven-Fits (Sättigung), P_{max} : maximaler Polarisationswert des Kurven-Fits (Sättigung)

2.13.3 Bestimmung des Einflusses von Ribosomen auf die Fluoreszenzlebensdauer der Thiostreptonsonde

Der Einfluss der Thiostreptonsonden-Ribosomen-Interaktion auf die Fluoreszenzlebensdauer der Sonde wurde über die Ermittlung der zeitaufgelösten Fluoreszenzintensität mittels des K2 Multifrequency Cross-Correlation Phase und Modulation Fluorometers (ISS) bestimmt.^[57] Bei dieser Technik werden die Fluorophore mit intensitätsmoduliertem Licht angeregt, welche dann eine ebenfalls intensitätsmodulierte Fluoreszenzemission liefern. In Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors und der jeweiligen Anregungsmodulationsfrequenz, ist die Fluoreszenzemission relativ zur Anregung

phasenverschoben und demoduliert. Zur Messung wird das Anregungslicht vertikal polarisiert (0°) und das Emissionslicht mit einem Winkel von $54,7^\circ$ polarisiert. Unter diesen so genannten „Magischer Winkel“-Bedingungen ist die gemessene Intensität proportional zur Gesamtfluoreszenzintensität. Als Referenz werden Fluorophore mit bekannten Fluoreszenzlebensdauern verwendet.

Für die Messungen wurden zunächst 100 nM Sonde **5** in Bindepuffer (5 mM MOPS pH 7.5, 5 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 5 Vol.-% TFE; Volumen: 1,5 ml) mit L11 freien rplK⁻-Ribosomen bzw. *Tth*L11 Wildtyp komplementierten rplK⁻-Ribosomen (0; 100; 250 nM Ribosomen) für 30 min bei RT äquilibriert (Triplikate) und im Anschluss in Quartzküvetten überführt. Als Referenzfluorophor für die Fluoreszenzlebensdauermessungen wurde BODIPY fl in Methanol (fluorescein-like, Invitrogen) mit einer bekannten Lebensdauer von 5,7 ns verwendet und an die Fluoreszenzintensität der jeweiligen Probe angepasst. Zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer der Sonde wurde bei Raumtemperatur die Modulationsfrequenz (2 bis 400 MHz in 20 MHz Schritten) des Anregungslichts (470 nm) variiert und die Phasenverschiebung (in $^\circ$) sowie die Demodulierung der Emission (520 nm) bestimmt. Die Messdaten wurden mittels der Software Vinci (ISS) visualisiert und ausgewertet. Aus den ermittelten Messdaten F_1 , F_2 , τ_1 und τ_2 ($F_1+F_2=1$) wurde die mittlere Fluoreszenzlebensdauer nach folgender Gleichung berechnet:

$$(12) \quad \tau = (\tau_1 \times F_1) + (\tau_2 \times F_2)$$

2.13.4 Protein-NMR: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC (heteronuclear single quantum coherence)

In dieser Arbeit wurden $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-(heteronuclear single quantum coherence) Spektren zur Analyse der Faltung von N-terminal His₆-markiertem *Thermus thermophilus* L11 wt Fusionsproteinen und verschiedener L11-Cysteinmutanten, sowie zur Analyse des strukturellen Einflusses der Interaktion des L11 Proteins mit 23S rRNA Fragmenten (1051-1109) und dem Thiopeptid-Naturstoff Thiostrepton genutzt. Darüberhinaus wurden pH-Titrations mit L11-Cysteinmutanten zur Bestimmung des Cystein- pK_a -Wertes durchgeführt. In $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimenten wird nicht der ^{15}N -Atomkern, sondern das ^1H -Proton angeregt, da es ein erheblich größeres gyromagnetisches Verhältnis besitzt und seine Magnetisierung über die kovalente Bindung auf den ^{15}N -Kern übertragen kann. Im entstandenen zweidimensionalen Spektrum ist also die Protonenfrequenz mit der

Stickstofffrequenz verknüpft. Die Signale dieses Spektrums setzen sich zum größten Teil aus den Signalen der Protonen des Amidrückgrats und zusätzlich aus den Resonanzen der Seitenketten von Asparagin, Glutamin, Histidin und Tryptophan zusammen. Die chemische Verschiebung der Kerne ist charakteristisch für ihre chemische Umgebung und kann daher zum Vergleich zwischen Strukturen herangezogen werden („Fingerabdruck“).^[58]

2.13.4.1 $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimente unter Standardbedingungen

Standard- $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimente mit durchgängig ^{15}N -markierten N-terminal His₆-markierten *Thermus thermophilus* L11 Fusionsproteinen (vgl. 2.11.1.1) wurden in Anlehnung an Cavanagh *et al.* in einem Varian Inova 600-Spektrometer (600 MHz) durchgeführt.^[58c] Die Proteine waren typischerweise in Phosphatpuffer (50 mM KPi, pH 7.5, 2 mM TCEP, 12 Vol.-% D₂O) mit einer Konzentration von 0,3-0,5 mM gelöst und wurden in SHIGEMI-Röhrchen bei 25°C gemessen.

Die $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimente wurden nach der Varian-NMR-Pulsfolge mit typischerweise 2048 x 512 Datenpunkten für einen Zeitraum von 1h bzw. über Nacht aufgenommen. Die Spektren wurden mit dem Programm MNOVA v5.3 (MestReC) prozessiert und ausgewertet. Der Vergleich der Spektren mit bereits publizierten $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von *T. thermophilus* L11^[59] ermöglichte eine schnelle Zuordnung der Korrelationssignale zu den entsprechenden Aminosäuren, wie auch die Zuordnung neuer Korrelationssignale in Proteinmutanten.

Bei NMR-Analysen von L11/Ligand-Komplexen (RNA, Thiopeptide) wurden die gewünschten Komplexe in stöchiometrischen Verhältnissen vorgebildet und vermessen. Zur Stabilisierung von RNA-Strukturen wurden dem Standardpuffer zusätzlich 10 mM MgCl₂ zugefügt.

2.13.4.2 Cystein- pK_a -Titration

$^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC- pK_a -Titrations der *T. thermophilus* L11 Cysteinmutanten (G24C) wurden in dreifach-gepufferten pK_a -Puffer (10 mM H₂NaPO₄, 10 mM Borsäure, 10 mM Natriumcitrat, 1 mM Na₂-EDTA, 2 mM TCEP, 12 Vol.-% D₂O) bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mM durchgeführt. Die Probe wurde mit möglichst kleinen Volumina HCl bzw. NaOH auf den gewünschten pH-Wert eingestellt, die $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren für 1 h (vgl. 2.13.4.1) aufgenommen und der pH-Wert der Probe im NMR-Röhrchen im Anschluss an die Messung nochmals kontrolliert. Entsprechende Experimente konnten sowohl mit separaten Proben

unterschiedlicher pH-Werte als auch in Einzelproben durchgeführt werden, bei der der pH-Wert stufenweise verändert wurde.

Zur Ermittlung des Cystein- pK_a -Wertes wurden die chemischen Verschiebung für 1H (a) und ^{15}N (b) (in ppm) zur Berechnung der Entfernung des Korrelationsspot vom Spektren-Ursprung (c) umgerechnet und die Differenzwerte gegen den pH-Wert aufgetragen. Die hieraus resultierende sigmoidale Kurve wurde im Programm OriginPro v7.5 mittels nicht-linearer Regression an eine Variante der Henderson-Hasselbalch-Gleichung angepasst und so der Cystein- pK_a -Wert bestimmt:

$$(14) \quad c(pH) = c^{SH} + \frac{c^{S^-} - c^{SH}}{1 + 10^{pK_a - pH}}$$

mit c^{SH} : Entfernung c beim niedrigsten pH-Wert und c^{S^-} : Entfernung c beim höchsten pH-Wert.

2.13.5 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektroskopische Messungen wurden in 96-Loch- bis 384-Loch-Mikrotiterplatten in Infinite M200 bzw. Safire II (TECAN) Plattenlesegeräten durchgeführt.

Größere Probenvolumina wurden in Quartzküvetten in einem Fluoreszenz-Spektrometer LS50 B (Perkin Elmer) vermessen.

2.13.6 UV/VIS-Spektroskopie

UV/VIS-spektroskopische Messungen wurden in Quartzküvetten verschiedener Schichtdicken im UV/VIS-Spektrometer Cary 100 Bio (Varian) durchgeführt.

2.13.7 MALDI-TOF (Matrix-assisted-laser-desorption-ionization – Time-of-flight)

Massenspektrometrie

Zur Massenbestimmung von Peptiden, Proteinen, etc. wurde die Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) eingesetzt.

Die Spektrenaufnahme erfolgte mit einem Voyager-DE Pro MALDI-Massenspektrometer (Applied Biosystems). Als Matrix wurde eine gesättigte Lösung von Sinapinsäure in Acetonitril /0,3 Vol.-% Trifluoressigsäure (1:2) verwendet. Zur Probenvorbereitung wurde das Protein mit gleichem Volumen Matrix auf einer MALDI-Platte vermischt und

luftgetrocknet. Die Probe wurde einem Laserimpuls ausgesetzt, wobei die Laserintensität während der Messung zur Optimierung des Signal-Rausch-Verhältnisses manuell geändert wurde. Die Auswahl der verwendeten Methode richtete sich nach dem Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins. Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mit dem Voyager Software Paket.

2.13.8 Röntgenkristallographie von Proteinen-RNA-Kleinmolekül-Komplexen

Zur Auffindung geeigneter Kristallisationsbedingungen für die Kristallisation ternärer Komplexe von 23S rRNA-Fragmenten, *T. thermophilus* L11 und Fluoreszein-markiertem Thiostrepton 5 (2.11.2)^[8] wurden Untersuchungen auf Basis der kommerziellen Screening Kits JCSG Core Suite I-III, Protein Complex Suite und Nucleix (Qiagen, 96 Bedingungen/Kit) durchgeführt.

Herstellung der RNA/L11/Thiopeptid-Komplexe: Für die Kristallisation der Komplexe wurden zwei RNA-Konstrukte verwendet. Zum einen handelte es sich hierbei um das in 2.12.1.1 beschriebene Konstrukt, als auch eine verkürzte Version,^[60] bei der die flexiblen und potentiell eine Kristallisation störenden 5'- und 3'-Überhänge entfernt wurden:

Konstrukt 1: (lang)

5'-GGCCAGGAUGUUGGCUUAGAAGCAGCCAUCAUUUAAAGAAAGCGUAAUAGCUCACUGGUCUAG-3'

Konstrukt 2: (kurz)

5'-GCCAGGAUGUUGGCUUAGAAGCAGCCAUCAUUUAAAGAAAGCGUAAUAGCUCACUGGU-3'

Konstrukt 1 wurde mittels *in vitro* Transkription (2.12.1.1) und zum Vergleich mittels chemischer Synthese (2.12.1.2) hergestellt und zur Kristallisation eingesetzt. Konstrukt 2 wurde ausschließlich totalsynthetisiert verwendet.

Zur Herstellung der ternären Komplexe wurde das *T. thermophilus* L11-Protein mit entfernten His₆-Markierungen (vgl. 2.11.4.1) mit einem leichten Überschuss von RNA und Thiostreptonsonde (in TFE) in Kristallisationspuffer (50 mM Tricin pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) gemischt (Endkonzentration 10 µM in 6 ml) und für 1 h bei RT inkubiert. Die Komplexe wurden im Anschluss durch Ultrafiltration (Amicons (15 ml, 10 kDa cut-off),

Millipore) auf ein Volumen von ca. 1 ml konzentriert, mittels präparativer Gelfiltration (2.11.11) gereinigt und zu 10 mg/ml (Proteinkonzentration!) aufkonzentriert (Amicons (0,5 ml, 3 kDa cut-off), Millipore). Eine Identifizierung der reinen Komplex-Fractionen der Gelfiltration wurde über den gelelektrophoretischen Nachweis von Protein und RNA (2.11.7 & 2.11.2) sowie den fluoreszenzspektroskopischen Nachweis der Thioestreptonsonde (2.13.5) durchgeführt. Die Homogenität der gereinigten Komplexe wurde mittels EMSA (2.12.7) und Fluoreszenzpolarisationsexperimenten überprüft (2.13.2).

Screening: Zum Screening wurden mittels des Pipettier-Roboters Mosquito Crystal (Tip Labtech) 96×100 nl der Komplex-Lösung in 96-Loch-Kristallisationsplatten überführt (CrystalQuick, Greiner, „sitting drop“-Methode). Pro Loch enthielten die Platten je 70 µl einer der jeweils 96 Mutterlösungen/Screening Kit. Die Komplex-Tropfen wurden 1:1 mit 100 nl der jeweiligen Mutterlösung gemischt, die Platten mit Klebefolie luftdicht versiegelt und die Kristallbildung über einen Zeitraum von 21 Tagen (Raumtemperatur) beobachtet. Im Fall einer festgestellten Kristallbildung im Screen wurde zur Optimierung der Kristallqualität bzw. Steigerung der Kristallgröße versucht, die jeweiligen Bedingungen in 24-Loch-Platten mit 1-2 µl Tropfengröße (hanging drop) zu reproduzieren und durch Veränderung der Parameter Fällungsmittelkonzentration, pH-Wert, Salzkonzentration, etc. zu optimieren.

Kristallisierung und Datenaufnahme: Für die Datenaufnahme unter Kryo-Bedingungen wurden die gewachsenen Kristalle in flüssigem Stickstoff in einer Öse schockgefroren. Um eine Schädigung des Kristalls durch die sprunghafte Veränderung des umgebenden Puffers zu vermeiden, wurde der Kristall unter mildereren Bedingungen in sogenannten Kryo-Puffern eingefroren. Für die im Rahmen dieser Arbeit produzierten Kristalle wurde der jeweiligen Mutterlösung Glycerin zu einer Endkonzentration von 20 Vol.-% hinzugefügt. Zur Datenaufnahme wurden Synchrotronmessungen (Dr. Christian Grütter, CGC Dortmund) am SLS (Swiss Light Source) in Villingen, Schweiz durchgeführt. Die Datensammlung erfolgte unter Verwendung monochromatischer Röntgenstrahlung (Beamline X10SA).

2.14 *In vitro* Assays

2.14.1 Proximity-Induced Covalent Capture (PICC)^[61]

2.14.1.1 Kartierung der Thiopeptid-Bindegeometrie an isolierten Komplexen aus 23S rRNA und ribosomalen Protein L11 mittels PICC

Auf Basis des Vektors *pTthL11* (2.5b) zur heterologen Expression des L11 Proteins aus *T. thermophilus* wurden mittels *in vitro* Mutagenese (2.10.4) 14 Mutanten hergestellt, bei denen einzelne Aminosäuren des Protein-N-Terminus durch Cysteine ersetzt wurden:

M1C, V7C, L10C, Q11C, A20C, G24C, P25C, A26C, Q29C, H30C, A32C, I34C, M35C, V38C (*T. thermophilus* Nummerierung, M1: natürliches Start-Methionin)

Für Standard-PICC-Reaktionen wurde jedes Protein (5 μ M) stöchiometrisch mit 23S rRNA Wildtyp- bzw. Mutanten-Fragmenten (2.12.1) und dem gewünschten Analyt-Thiopeptid gemischt (in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM TCEP, 5 Vol.-% TFE) und 16 h bei RT inkubiert. Das Auftreten kovalenter Thiopeptid-L11-Addukte wurde nach thermischen Denaturierung (10 min, 95°C) der Proben mittels 15% SDS-PAGE (2.11.7) überprüft.

2.14.1.2 Analyse der PICC-Reaktionskinetik

Zur Analyse der PICC-Reaktionskinetik wurden größere PICC-Ansätze mit *TthL11* G24C hergestellt (500 μ L) zeitabhängig kleine Mengen (20 μ L) entnommen und die Reaktion durch thermische Denaturierung gestoppt. Eine Quantifizierung der Intensität der Proteinbanden wurde mit der AIDA Software (Kodak/Raytest) vorgenommen. Die Bandenintensitäten wurden mit Gleichung 14 normiert und im Anschluss graphisch gegen die Zeit aufgetragen.

$$(15) \quad \%PICC = \frac{I_{PICC}}{I_{PICC} + I_{L11}}$$

mit I_{PICC} : Intensität der PICC-Addukt Bande und I_{L11} : Intensität der Bande von freiem L11

Die PICC-Reaktion wurde zur Ermittlung der Halbwertszeit $t_{1/2}$ mit der Software OriginPro v7.5 (OriginLab Corporation) mittels nicht-linearer Regression an eine Exponentialgleichung 1.Ordnung angepasst.

2.14.1.3 Optimierung der PICC-Reaktion

Zur Optimierung der PICC-Reaktion wurde PICC-Ansätze mit *TthL11* G24C unter Variation der Temperatur, des pH-Werts, der eingesetzten RNA-Menge und der eingesetzten Thiopeptid-Konzentrationen hergestellt. Darüberhinaus wurde der Einfluss von Reduktionsmitteln wie β -Mercaptoethanol, sowie starker Hitze auf die Ausbildung des kovalenten PICC-Addukts überprüft.

2.14.1.4 Detektion von PICC-Fragmenten durch tryptischen Verdau

Zum tryptischen Verdau wurden die PICC-Reaktionsgemische (ca. 3 μ g Protein) nach thermaler Denaturierung (10 min, 95°C) in Verdauopuffer (50 mM Ammoniumbiscarboxat pH 8.5, 5 mM CaCl₂) mit 1 μ g Trypsin für 2h bei 50°C verdaut. Die Peptidmischungen wurden im Anschluss mittels MALDI-MS analysiert (2.13.7).

2.14.1.5 Kartierung der Thiopeptid-Bindegeometrie an *TthL11-E. coli* Ribosomen-chimären mittels PICC (Ribosomen-PICC)

Die entsprechend 2.10.16.2 hergestellten und gereinigten Chimären aus *TthL11*-Cysteinmutanten und L11-defizienten *E. coli* Ribosomen (5 μ M) wurden zur PICC-Analyse stöchiometrisch mit dem gewünschten Analyt-Thiopeptid gemischt (in 20 mM Tris pH 7.5, 10,5 mM Magnesiumacetat, 100 mM NH₄Cl, 0,5 mM EDTA-Na₂, 10 mM TCEP, 5 Vol.-% TFE) und für 16 h bei RT inkubiert. Die Protein/RNA/Thiopeptid-Mischung wurde im Anschluss in SDS-Ladepuffer thermisch denaturiert und mittels 15% PAGE aufgetrennt (2.11.7). Zur Detektion von Thiopeptid-L11-Addukten wurden die Proteinbanden auf Nitrozellulose-Membranen transferiert und die His₆-markierten *TthL11*-Fusionsproteine mit mittels α -His₆-Antikörpers immunodetektiert (vgl. 2.11.8). Die Quantifizierung der Intensität der immunodetektierten Proteinbanden wurde mit der AIDA Software (Kodak/Raytest) vorgenommen.

2.14.1.6 Analyse der Ribosomen-PICC-Kinetik

Ribosomen-PICC-Kinetik-Analysen wurde analog zu 2.13.2.1 durchgeführt und die kovalenten Addukte entsprechend 2.11.8 immunodetektiert.

2.14.1.7 PICC in bakteriellen Zelllysaten

Zur Überprüfung der Selektivität, wurden PICC-Reaktionen in Zelllysaten des *TthL11* G24C, Q29C bzw. I34C komplementierten *E. coli* rplK⁻-Stamms durchgeführt (vgl. 2.10.16.3). Hierzu wurden 100 µl des jeweiligen Zelllysats (1 µg/µl Protein) mit dem gewünschten Thiopeptid (5 µM in TFE) versetzt und ü.N. bei RT inkubiert. Die Proteinmischungen wurden im Anschluss mittels 15% SDS-PAGE (vgl. 2.11.7) aufgetrennt. Zur Detektion von Thiopeptid-L11-Addukten wurden die Proteinbanden auf Nitrozellulose-Membranen transferiert und die His₆-markierten *TthL11*-Fusionsproteine mit mittels α-His₆-AK immunodetektiert (vgl. 2.11.8).

2.14.2 Gekoppelter *in vitro* Transkriptions-Translations-Inhibitionsassay

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das RTS 100 *E. coli* HY Kit (Roche), ein gekoppeltes T7-basiertes *in vitro* Transkriptions-Translationssystem, als Grundlage zur Entwicklung eines quantitativen *Translations-Inhibitionsassays* genutzt.^[62] Die Optimierung des Systems für das Mitteldurchsatzformat ist in Kapitel 3 beschrieben. Zur Detektion der Proteinexpression bzw. deren Inhibierung, wurde die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP)^[63] der Qualle *Aequorea victoria* genutzt, welche von einem im Kit enthaltenen T7-Promotor-kontrollierten Kontrollvektor (pIVEX2.3d, Roche) erfolgte.

2.14.2.1 Aktivierung des Kits und Lagerung

Die empfindlichen Kit-Komponenten (*E. coli*-Lysat, Aminosäuren und Reaktionsmix) wurden als stabilisiertes Lyophilisat erhalten und nach Herstellerangaben durch Zugabe von Rekonstitutionspuffer zunächst reaktiviert, vollständig gemischt (so genannter Translationsmix) und in 100 µl Fraktionen bei -20°C gelagert. Das Kontrollplasmid wurde in 50 µl Millipore-H₂O (1 µg/µl) gelöst und ebenfalls bei -20°C gelagert. Es war darauf zu achten, dass alle Komponenten bei Gebrauch ständig gekühlt wurden (4°C).

2.14.2.2 Durchführung des Translations-Inhibitionsassays

(a) Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) einer Analytverbindung. Alle Experimente wurden in gekühlten schwarzen Optiplatte 384 Lochplatten (Perkin Elmer) durchgeführt. Hierzu wurden je 6 µl des kalten Translationspuffers (20 mM Tris pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 20 mM NaCl, 5 Vol.-% TFE) in die gewünschte Anzahl von Löchern pipettiert und Verdünnungsreihen der gewünschten

Analytverbindungen (Triplikate) hergestellt. Die gewünschte Konzentration der Analytverbindung wurde hierzu in einem Volumen von 6 μl (in Translationspuffer) zum jeweils 1. Loch einer Reihe pipettiert und serielle 1:1 Verdünnungen hergestellt. Im Anschluss wurden zu jedem Loch 2 μl des Translationsmix addiert, sanft mechanisch gemischt (Pipette) und die Platten für 1 h auf Eis inkubiert. Das Kontrollplasmid wurde 1:20 in Translationspuffer verdünnt und je 2 μl pro Loch (0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Endkonzentration) zum Start der Translation addiert. Die Platten wurden mit Klebefolie verschlossen und kurz (10 s) zur Sammlung der Proben zentrifugiert. Die Reaktionsansätze wurden nun für 1,5 h bei 30°C im Wärmeschrank inkubiert und im Anschluss, zur Vervollständigung der Bildung des GFP-Fluorophors, ü.N. bei 4°C gelagert. Als Kontrollreaktion wurden Ansätze (je 1 Triplikat/Platte) ohne Inhibitorzugabe (100% GFP, Kontrolle 1) und Ansätze ohne Plasmidzugabe (0% GFP, Kontrolle 2) genutzt.

Zur Kategorisierung der Analytverbindung als Inhibitoren der prokaryotischen Translation, wurde zusätzlich die Inhibition der T7-RNA-Polymerase überprüft. Hierzu wurden entsprechend 2.12.1.1 die *in vitro* Transkription des Plasmids in Anwesenheit (Überschuss) der Analytverbindung durchgeführt und die RNA-Menge mittels nativer PAGE analysiert (2.12.2).

(b) Detektion der ribosomalen Zielstruktur von Analytverbindungen. Neben der Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC_{50}), wurde der Translations-Inhibierungssassay zur Analyse potentieller Zielstrukturen der Analytverbindung innerhalb der komplexen Translationsmaschinerie genutzt. Hierzu wurden Translationsansätze mit konstanten Konzentrationen der gewünschten Analytverbindung inhibiert. Durch die gleichzeitige Zugabe gereinigter ribosomaler Faktoren (vgl. 2.4) sollte die Translation jedoch wieder komplementiert und der in die Inhibierung involvierte ribosomale Faktor identifiziert werden. Der gewünschte ribosomale Faktor wurde hierzu in einem Volumen von 6 μl (in Translationspuffer, $> \text{IC}_{50}$ der Analytverbindung) jeweils mit oder ohne Zugabe der Analytverbindung (final ca. in Höhe des ermittelten IC_{50} konzentriert) gemischt, der Translationsmix (2 μl) zugegeben und für ca. 1 h bei 4°C inkubiert. Die Translation wurde im Anschluss analog zu 2.14.2.2a durch die Zugabe von 2 μl Plasmid gestartet.

2.14.2.3 Detektion der GFP-Fluoreszenz

Zum Auslesen der GFP-Fluoreszenz wurden die Platten in einem Infinite M200 Plattenlesegerät (Tecan) unter Verwendung folgender Geräteparameter analysiert:

Anregungswellenlänge 395 nm; Anregungsbandbreite 9 nm; Emissionswellenlänge 504 nm; Emissionsbandbreite 20 nm; Integrationszeit 20 μ s; „optimal gain“; 25 Scan pro Loch; 22°C.

2.14.2.4 Analyse der Messdaten

Die Messdaten wurden zur Analyse zunächst mit Hilfe folgender Formel normiert:

$$(16) \quad \%Inhibition = \left(\frac{F_{Messwerte} - F_{0\% GFP}}{F_{100\% GFP} - F_{0\% GFP}} \right) \times 100$$

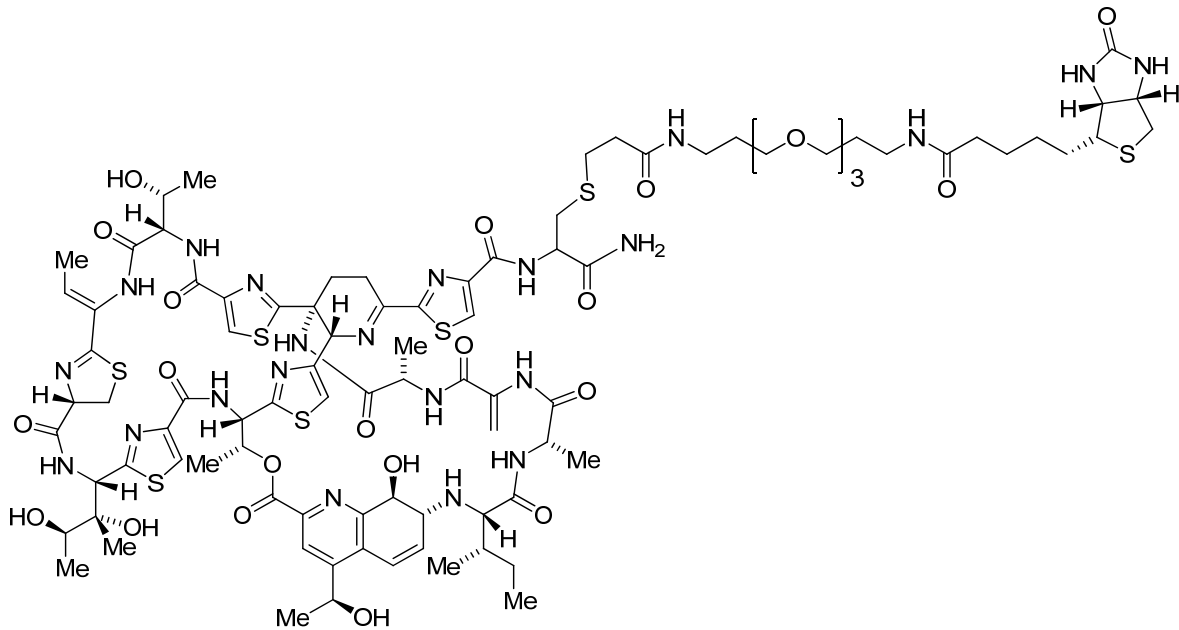
mit $F_{Messwerte}$: Fluoreszenzintensitäten der Messwerte, $F_{0\% GFP}$: Fluoreszenzintensität Kontrolle 2,

$F_{100\% GFP}$: Fluoreszenzintensität Kontrolle 2

Die Auftragung der normierten Messwerte als Funktion der Analytkonzentration ergab sigmoidale Kurven. Diese wurden zur Ermittlung der mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50}) einer Substanz, mit der Software OriginPro v7.5 (OriginLab Corporation) an die Hill-Funktion angepasst.

2.14.3 Affinitätsreinigung mit Thiostreptonderivaten (Pulldown-Experimente)

Um weitere prokaryotische bzw. eukaryotische Zielstrukturen von Thiopeptiden (z.B. Thiostrepton) zu bestimmen bzw. um prokaryotische Ribosomen selektiv zu reinigen, wurden Affinitätsreinigungen aus Zelllysaten, so genannte Pulldown-Experimente, mit Hilfe von biotinyliertem Thiostrepton **7** (Abbildung 2.6, Theorie siehe Ergebnisteil)^[56] durchgeführt.



7

Abbildung 2.6: Chemische Struktur von biotinyliertem Thiostrepton **7**. Die Biotineinheit wurde über einen PEG-Linker (3 PEG Einheiten) mittels einer 1,4-Thiol-Addition an Dehydroalanin 1 des Thiostrepton-Grundgerüsts gekuppelt.^[56]

Das Molekül wurde zunächst an magnetischen Streptavidin-modifizierten Agarose-Partikeln (Streptavidin Magnetic Beads, New England Biolabs bzw. Dynabeads Streptavidin Trial Kit, Invitrogen) immobilisiert. Hierzu wurde die gewünschte Menge magnetisierbarer Partikel (250 μ l der Partikellösung) in Eppendorfgefäße überführt und im Magnetständer (Invitrogen) an die Wände der Eppendorfgefäße bewegt. Die Lagerlösung wurde vollständig entfernt und die Partikel in PBS-Puffer gewaschen. Die Partikel wurden zur Funktionalisierung mit Lösungen (10 μ M in PBS, 5 Vol.-% TFE) des biotinylierten Thiostreptons **7** bzw. der PEG-Biotin-Einheit ohne Thiostrepton (Kontrolle) für 30 min bei RT inkubiert und die Partikel im Anschluss mit PBS-T (2 \times) gewaschen. Das gewünschte Zelllysate (in PBS), *E. coli*-Ribosomen (in Puffer A, 2.10.17.1) bzw. vorformierte Komplexe der 23S rRNA und des L11-Proteins (5 μ M in Bindepuffer, vgl. 2.13.2.1-3) wurde nun in einem Volumen von 250 μ l zu den funktionalisierten Partikeln gegeben und für 1 h bei 4°C unter sanftem Schütteln inkubiert. Die Partikel wurden im Anschluss 2-4 \times mit PBS-T gewaschen, in SDS-Probenpuffer (2.11.7.1) resuspendiert und die gebundenen Proteine zur Elution thermisch (10 min, 95°C) denaturiert. Die Proben wurden zur Entfernung der zerstörten Partikel zentrifugiert (10 min,

5000 rpm) und die Proteine im Überstand mittels SDS-PAGE (2.11.7.1) und Coomassie- (2.11.7.2) bzw. Silberfärbung (2.11.7.3) nachgewiesen.

PBS50 mM NaH₂PO₄ pH 7.4

150 mM NaCl

PBS-T

1×PBS

0,1% /v/v Tween 20

2.15 Mikrobiologische Methoden

2.15.1 Bakterien Wachstums-Inhibierungs-Assay (96-Loch-Platte)

Die mittlere letale Dosis (LD₅₀) von antibiotisch wirksamen Substanzen wurde im Rahmen eines Bakterien Wachstums-Inhibitions-Assays im 96-Loch-Format mittels der Mikrodilutionstechnik bestimmt.^[64] Hierzu wurde der gewünschte Bakterienstamm (*E. coli* XL1 blue, *B. subtilis* 1012 bzw. IS169 (rplK⁻)) in Mueller-Hinton-Bouillon bzw. LB-Medium (vgl. 2.10.1) über Nacht bei 37°C (180 rpm) angezogen. Die Konzentration der Zellen wurde auf eine optische Dichte von OD₆₀₀: 0,1 eingestellt und die Zellen nochmals 1:10 im jeweiligen Nährmedium verdünnt. Sterile 96-Loch-Platten (Falcon Microtest 96, Becton Dickinson Labware) wurden mit 100 µl/Loch der Zellsuspension gefüllt. In die jeweils ersten Lochs pro Reihe (A1, B1, C1, etc.) wurden nun zusätzlich 99 µl der Zellsuspension und 1 µl der gewünschten Analytverbindung (in TFE bzw. DMSO, Triplikate, 1:200 Verdünnung beachten) gegeben und serielle 1:1-Verdünnungen durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle wurde das jeweilige Lösungsmittel allein verwendet. Die Platten wurden unter Verwendung flüssigkeitsdichter, jedoch sauerstoffdurchlässiger „Sandwich“ Deckel (System Duetz) in Schütteladaptoren (System Duetz) befestigt und bei 37°C (180 rpm) über Nacht inkubiert. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte in einem Infinite M200 Plattenlesegerät über die Bestimmung der Absorption bei 600 nm. Zur Analyse wurden die Messwerte graphisch gegen die eingesetzten Konzentrationen der Analytverbindung aufgetragen. Sigmoidale Kurven wurden zur Bestimmung des LD₅₀-Wertes mit der Software OriginPro v7.5 (OriginLab Corporation) an die Hill-Funktion angepasst.

Müller-Hinton-Bouillon

17,5 g/l Caseinhydrolysat

2,0 g/l Rindfleisch, getrocknete Infusion aus 300 g

1,5 g/l Stärke

2 Gew.-% NaCl

pH 7.4

2.15.2 Screen der Thiopeptidantibiotika-Resistenz von L11-defizientem *B. subtilis* komplementiert mit *TthL11*-Mutanten

2.15.2.1 Mikrotiterplattenformat

Die entsprechend 2.10.16.2 hergestellten *B. subtilis* Zellen wurden unter Selektionsdruck (+Chloramphenicol) und Induktion der Expression mit 1mM IPTG über Nacht bei 37°C in LB-Medium angezogen. Die Zellen wurden entsprechend 2.15.1 verdünnt, auf die 96-Loch-Platten verteilt, Verdünnungsreihen von Thiostrepton (2,5 µM in Loch 1) erstellt und die Zellen über Nacht bei 37°C (180 rpm) inkubiert. Es war hierbei darauf zu achten, dass das verwendete Medium mit 1 mM IPTG versetzt war. Zur Normierung des Messdaten wurden Wachstumskontrollen in Anwesenheit von 5 µl TFE (= 100% Wachstum) bzw. LB-Medium (0% Wachstum) verwendet.

2.15.2.2 Reagenzglasformat

Die entsprechend 2.8.16.2 hergestellten *B. subtilis* Zellen wurden unter Selektionsdruck (+Chloramphenicol) und Induktion der Expression mit 1mM IPTG über Nacht bei 37°C in LB-Medium angezogen. Die Zellen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und zur Innokulation (1:10) von 3x5 ml LB-Medium (+Chloramphenicol, +1 mM IPTG) genutzt. Nach 2 h Inkubation bei 37°C (180 rpm) wurde den Zellen 0,5 µM Thiostrepton (5 µl einer 100 µM Lösung in TFE) zugefügt und die Zellen weiter ü.N. bei 37°C (180 rpm) angezogen. Am nächsten Tag wurden zur Analyse die OD₆₀₀-Werte bestimmt. Zur Normierung der Messdaten wurden Wachstumskontrollen in Anwesenheit von 5 µl TFE (= 100% Wachstum) bzw. LB-Medium (0% Wachstum) verwendet.

2.15.2 Agar-Diffusionstest

Zur Abschätzung der antibiotischen Aktivität von Analytverbindungen wurden in Anlehnung an Kirby und Bauer^[65] Agar-Diffusionstests durchgeführt. Hierzu wurde der gewünschte Bakterienstamm (*E.coli* XL1 blue, *B. subtilis* 1012 bzw. IS169 (rplK⁻)) ü.N. in LB-Medium angezogen. Die Zellen wurden nun entweder (a) direkt auf LB-Agarplatten ausgestrichen (300 µl/Platte) und für 1 h trocknen gelassen bzw. (b) 1:10 in flüssigem, warmen (30-40°C) Softagar (0,5 Gew.-% in LB-Medium) verdünnt und in einem Volumen von 3 ml auf die Platten aufgebracht und aushärten lassen. Falls notwendig wurden die Platten vor dem Aufbringen der Bakterien zur Induktion heterologer Proteinexpression, mit 30 µl 1M IPTG-Lösung (= 1 mM Endkonzentration) bestrichen.

Die gewünschte Anzahl von Löchern wurde mit der Rückseite einer 200 µl Pipettespitze (max. 5) in den Agar gestantzt und Analytverbindungen (in gewünschter Konzentration) in einem Volumen von 100 µl in die Löcher gefüllt. Nach einer Trocknungsphase von 1 h wurden die Platten bei 37°C ü.N. inkubiert.

2.16 *In silico* Methoden

2.16.1 Digitale Bildbearbeitung und Graphiken

Alle im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Abbildungen (Gele, Blots, etc) wurden mittels geeigneten Analyseinstrumenten (Geldokumentationsanlage Gel Logic 200, Kodak; Phosphor-Imager FLA-5000, Fujifilm), einer Digitalkamera oder eines Scanners digitalisiert. Digitale Nachbearbeitungen wurden mittels des Programms Adobe Photoshop (Creative Suite 2, Adobe Systems Incorporated) durchgeführt. Der Inhalt der Abbildungen wurde dabei nicht verändert. Chemische 2D Strukturen wurden mittels des Programms ChemBioOffice v11.0 (Cambridgesoft) erstellt. RNA Sekundärstrukturen wurden mittels des Programms RNADraw v1.1b2 (Mazura Multimedia) erstellt.

2.16.2 Sequenzanalysen

Sämtliche Sequenzinformation, insofern nicht Ergebnis eigener Sequenzierungen, wurden von der Homepage des National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/) bezogen. Sequenzanalysen (Nukleinsäuren, Protein) wurden mittels des Programms LALIGN erstellt (www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html).

Multiple Protein-Alignments wurden mit dem Programm ClustalW erstellt (www.ebi.ac.uk/clustalw/). *In silico* Translationen wurden mit dem ExPASy Translate Tool durchgeführt (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>).

2.16.3 Visualisierung von Kristallstrukturdaten bzw. NMR-Strukturdaten

Die Visualisierung von Kristallstrukturdaten bzw. NMR-Strukturdaten wurde mittels des Programms PyMol (DeLano Scientific) durchgeführt und mit dem Programm Adobe Photoshop (Creative Suite 2, Adobe Systems Incorporated) nachbearbeitet. Die benötigten Strukturdaten wurden, insofern nicht im Rahmen dieser Studie bestimmt, von der Homepage des National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/) bzw. der Homepage der Protein Data Bank (PDB, www.rcsb.org/pdb/home/home.do) im .pdb Dateiformat bezogen.

2.17 Referenzen

- [1] W. O. Bullock, J. M. Fernandez, J. M. Short, *Biotechniques* **1987**, *5*, 376-379.
- [2] S. G. Grant, J. Jessee, F. R. Bloom, D. Hanahan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1990**, *87*, 4645-4649.
- [3] T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, H. Mori, *Mol. Syst. Biol.* **2006**, *2*, 1-11.
- [4] S. Ikawa, T. Shibata, T. Ando, H. Saito, *Mol. Gen. Genet.* **1979**, *170*, 123-127.
- [5] I. Smith, P. Paress, K. Cabane, E. Dubnau, *Mol. Gen. Genet.* **1980**, *178*, 271-279.
- [6] T. Oshima, K. Imahori, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1974**, *24*, 102-112.
- [7] R. Donovan, J. F. Pagano, H. A. Stout, M. J. Weinstein, *Antibiot. Annu.* **1955**, *3*, 554-559.
- [8] S. Schoof, S. Baumann, B. Ellinger, H. D. Arndt, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 242-245.
- [9] T. Tanaka, T. Endo, A. Shimazu, R. Yoshida, Y. Suzuki, *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 231-237.
- [10] a) J. Y. Lu, M. Riedrich, M. Mikyna, H. D. Arndt, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8281-8284; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 8137-8140; b) J. Y. Lu, H. D. Arndt, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 4205-4212.
- [11] a) M. Riedrich, S. Harkal, H. D. Arndt, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7031-7035; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 2701-2703.
- [12] T. L. Su, *Br. J. Exp. Pathol.* **1948**, *29*, 473-481.
- [13] B. S. Yun, T. Hidaka, K. Furihata, H. Seto, *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 510-514.
- [14] B. S. Yun, H. Seto, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1995**, *59*, 876-880.
- [15] B. S. Yun, T. Hidaka, K. Furihata, H. Seto, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 11659-11664.
- [16] M. Ezaki, M. Iwami, M. Yamashita, S. Hashimoto, T. Komori, K. Umehara, Y. Mine, M. Kohsaka, H. Aoki, H. Imanaka, *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 1453-1461.
- [17] H. Waldmann, Y. P. He, H. Tan, L. Arve, H. D. Arndt, *Chem. Commun.* **2008**, 5562-5564.
- [18] L. Arve, Dissertation, TU Dortmund (Dortmund), **2006**.
- [19] a) H. Wolf, H. Zahner, K. Nierhaus, *FEBS Lett.* **1972**, *21*, 347-350; b) H. Wolf, H. Zahner, *Arch. Mikrobiol.* **1972**, *83*, 147-154.
- [20] T. Weber, K. J. Laiple, E. K. Pross, A. Textor, S. Grond, K. Welzel, S. Pelzer, A. Vente, W. Wohlleben, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 175-188.
- [21] B. Kilitoglu, Dissertation, TU Dortmund (Dortmund), **2010**.

- [22] M. Tronchin, F. Callegarin, F. Elisei, U. Mazzucato, E. Reddi, G. Jori, in *Drugs. Photochemistry and Photostability* (Eds.: A. Albin, E. Fasani), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1998**, s. 211-226.
- [23] F. M. Ausubel, *Current protocols in molecular biology*, Greene Publishing Associates ; J. Wiley, order fulfillment, Brooklyn, N. Y. Media, Pa., **1987**.
- [24] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1986**, 51 Pt 1, 263-273.
- [25] M. P. Weiner, G. L. Costa, W. Schoettlin, J. Cline, E. Mathur, J. C. Bauer, *Gene* **1994**, 151, 119-123.
- [26] H. C. Birnboim, J. Doly, *Nucleic Acids Res.* **1979**, 7, 1513-1523.
- [27] C. K. C. Syn, S. Swarup, *Anal. Biochem.* **2000**, 278, 86-90.
- [28] H. Inoue, H. Nojima, H. Okayama, *Gene* **1990**, 96, 23-28.
- [29] C. Anagnostopoulos, J. Spizizen, *J. Bacteriol.* **1961**, 81, 741-746.
- [30] F. Sanger, A. R. Coulson, *J. Mol. Biol.* **1975**, 94, 441-448.
- [31] T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., **1982**.
- [32] C. Merryman, E. Weinstein, S. F. Wnuk, D. P. Bartel, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 741-746.
- [33] M. V. Rodnina, W. Wintermeyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1995**, 92, 1945-1949.
- [34] G. Spedding, *Ribosomes and protein synthesis : a practical approach*, IRL Press at Oxford University Press, Oxford England ; New York, **1990**.
- [35] B. A. Maguire, L. M. Wondrack, L. G. Contillo, Z. Xu, *RNA* **2008**, 14, 188-195.
- [36] C. Arfvidsson, K.-G. Wahlund, *Anal. Biochem.* **2003**, 313, 76-85.
- [37] E. Hochuli, H. Dobeli, A. Schacher, *J. Chromatogr.* **1987**, 411, 177-184.
- [38] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254.
- [39] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, 227, 680-685.
- [40] F. W. Studier, *J. Mol. Biol.* **1973**, 79, 237-248.
- [41] V. Neuhoff, N. Arold, D. Taube, W. Ehrhardt, *Electrophoresis* **1988**, 9, 255-262.
- [42] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1979**, 76, 4350-4354.
- [43] C. K. Riener, G. Kada, H. J. Gruber, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, 373, 266-276.
- [44] A. C. Witt, M. Lakshminarasimhan, B. C. Remington, S. Hasim, E. Pozharski, M. A. Wilson, *Biochemistry* **2008**, 47, 7430-7440.
- [45] P. C. Ryan, M. Lu, D. E. Draper, *J. Mol. Biol.* **1991**, 221, 1257-1268.
- [46] A. Ullmann, F. Jacob, J. Monod, *J. Mol. Biol.* **1967**, 24, 339-343.
- [47] S. A. Hartsel, D. E. Kitchen, S. A. Scaringe, W. S. Marshall, *Methods Mol. Biol.* **2005**, 288, 33-50.
- [48] L. G. Davis, M. D. Dibner, J. F. Battey, *Basic methods in molecular biology*, Elsevier, New York, **1986**.
- [49] S. L. Bausch, E. Poliakova, D. E. Draper, *J Biol Chem* **2005**, 280, 29956-29963.
- [50] a) M. M. Garner, A. Revzin, *Nucleic Acids Res* **1981**, 9, 3047-3060; b) M. Fried, D. M. Crothers, *Nucleic Acids Res* **1981**, 9, 6505-6525.
- [51] D. R. Setzer, *Methods Mol. Biol.* **1999**, 118, 115-128.
- [52] M. Holtzhauer, J. Behlke, *Methoden in der Proteinanalytik*, Springer, Berlin ; New York, **1996**.
- [53] G. D. Fasman, *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules.*, Plenum Press New York, **1996**.
- [54] F. Perrin, *J. Phys.* **1926**, 7, 390-401.
- [55] a) G. Weber, *Biochem. J.* **1952**, 51, 155-167; b) G. Weber, *Biochem. J.* **1952**, 51, 145-155; c) A. J. Pope, U. M. Haupts, K. J. Moore, *Drug Discov. Today* **1999**, 4, 350-362; d) W. J. Checovich, R. E. Bolger, T. Burke, *Nature* **1995**, 375, 254-256.
- [56] S. Schoof, Dissertation, TU Dortmund (Dortmund), **2010**.

- [57] a) E. Gratton, M. Limkeman, *Biophys. J.* **1983**, *44*, 315-324; b) E. Gratton, D. M. Jameson, R. D. Hall, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1984**, *13*, 105-124; c) C. Czeslik, C. Royer, T. Hazlett, W. Mantulin, *Biophys. J.* **2003**, *84*, 2533-2541.
- [58] a) J. N. S. Evans, *Biomolecular NMR spectroscopy*, Oxford University Press, Oxford ; New York, **1995**; b) W. R. Croasmun, R. M. K. Carlson, *Two-dimensional NMR spectroscopy : applications for chemists and biochemists*, 2nd ed., VCH, New York, **1994**; c) J. Cavanagh, W. J. Fairbrother, A. G. Palmer, N. J. Skelton, *Protein NMR Spectroscopy—Principles and Practice* Second ed., Skelton Academic Press Inc., San Diego, **1996**.
- [59] M. A. Markus, D. Triantafillidou, T. Choli-Papadopoulou, D. A. Torchia, *J. Biomol. NMR* **2001**, *20*, 293-294.
- [60] G. L. Conn, D. E. Draper, E. E. Lattman, A. G. Gittis, *Science* **1999**, *284*, 1171-1174.
- [61] S. Baumann, S. Schoof, S. D. Harkal, H. D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5664-5666.
- [62] M. B. Iskakova, W. Szaflarski, M. Dreyfus, J. Remme, K. H. Nierhaus, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, e135.
- [63] a) O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, *J. Cell Comp. Physiol.* **1962**, *59*, 223-239; b) O. Shimomura, *J. Microsc.* **2005**, *217*, 1-15; c) M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher, *Science* **1994**, *263*, 802-805.
- [64] D. I. f. Normung, *DIN 58940, Teil 8: Methoden der Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika—Mikrodilution.*, 2 ed., Beuth-Verlag, Berlin & Köln, **1992**.
- [65] A. W. Bauer, W. M. Kirby, J. C. Sherris, M. Turck, *Am. J. Clin. Pathol.* **1966**, *45*, 493-496.

Kapitel 3

Studien zur Affinität von Thiopeptidantibiotika an der 70S ribosomalen GTPase-assoziierten Region

Teile dieses Kapitels sind bereits publiziert:

1. S. Schoof, S. Baumann, B. Ellinger, H. D. Arndt, *ChemBiochem* **2009**, *10*, 242-245.
2. H. -D. Arndt, S. Schoof, S. Baumann, *Thiostrepton-derived Probes* (TU Dortmund)
PCT/EP2009/001949
3. S. Baumann, S. Schoof, M. Bolten, C. Haering, M. Tagaki, K. Shin-Ya, and H. -D. Arndt,
J. Am. Chem. Soc. **2010**, *132*, 6973-6981.

3.1 Einleitung

Die Klasse der Thiopeptidantibiotika ist eine Gruppe hochmodifizierter makrozyklischer Polythiazolylpeptide.^[1] Die Moleküle zeigen nanomolare antibiotische Aktivitäten gegen eine Vielzahl Gram-positiver Prokaryoten u.a. auch gegen den Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA). Viele Thiopeptide, u.a. ihre prominentesten Vertreter Thiostrepton **1**, Nosiheptid **2** und Micrococcin **3** (Abbildung 3.1), inhibieren die bakterielle Translation durch eine Störung der 70S ribosomalen GTPase assoziierten Region. Sie binden dabei an einen konservierten und dynamischen Komplex des ribosomalen Proteins L11 und der 23S rRNA. Die Beeinflussung der Konformation von L11 führt hierbei meist zu einer enormen Verlangsamung der Translokation (**1** und **2**).^[2] Im Fall des Micrococcins (**3**) wurde auch die Überstimulierung der Aktivität ribosomaler GTPasen diskutiert.^[3] Trotz ihrer enormen antibakteriellen Wirksamkeit wird bisher keines der Thiopeptide in der Humantherapie eingesetzt. Gründe hierfür sind vor allem die schlechte Wasserlöslichkeit und die beträchtliche Größe der Moleküle und mögliche Resistenzbildungen. Die bemerkenswerte Aktivität der Thiopeptide gegen eine klinisch bisher ungenutzte, bakterielle Zielstruktur zeigt jedoch das Potenzial dieser Moleküle als Werkzeuge in der antibakteriellen Therapie und des „Targets“ *per se*.

Für die Entwicklung physikochemisch optimierter Derivate von Thiopeptiden und insbesondere vollkommen neuer Wirkstrukturen an dieser Zielstruktur, ist ein grundlegendes Verständnis der Thiopeptid-Zielstruktur-Interaktion von fundamentaler Bedeutung. Neben einem Verständnis der Ligand-Zielstruktur-Bindegeometrie (siehe Kapitel 5) ist vor allem die biochemische/biophysikalische Analyse der Liganden-Zielstruktur-Affinität wichtig. Das bis *dato* am besten untersuchte Thiopeptid ist Thiostrepton **1**. Frühe Studien von Pestka *et al.*^[4] sowie Cundliffe^[5] zeigten bereits, dass **1** mit mindestens nanomolaren Affinitäten an vollständige Ribosomen binden kann. Filterbindungsassays mit radioaktiv markiertem Thiostrepton oder 23S rRNA Fragmenten^[6] bzw. Fluoreszenzassays, basierend auf dem Einbau fluoreszenter Basenanaloga in die 23S rRNA,^[7] stützen diese Resultate. Darüberhinaus legten die Autoren dieser Studien nahe, dass **1** bereits an die 23S rRNA allein binden kann (Affinität $\sim 1 \mu\text{M}$) und dass die Anwesenheit des L11-Proteins die Zielstrukturaffinität kooperativ steigert.^[6-7]

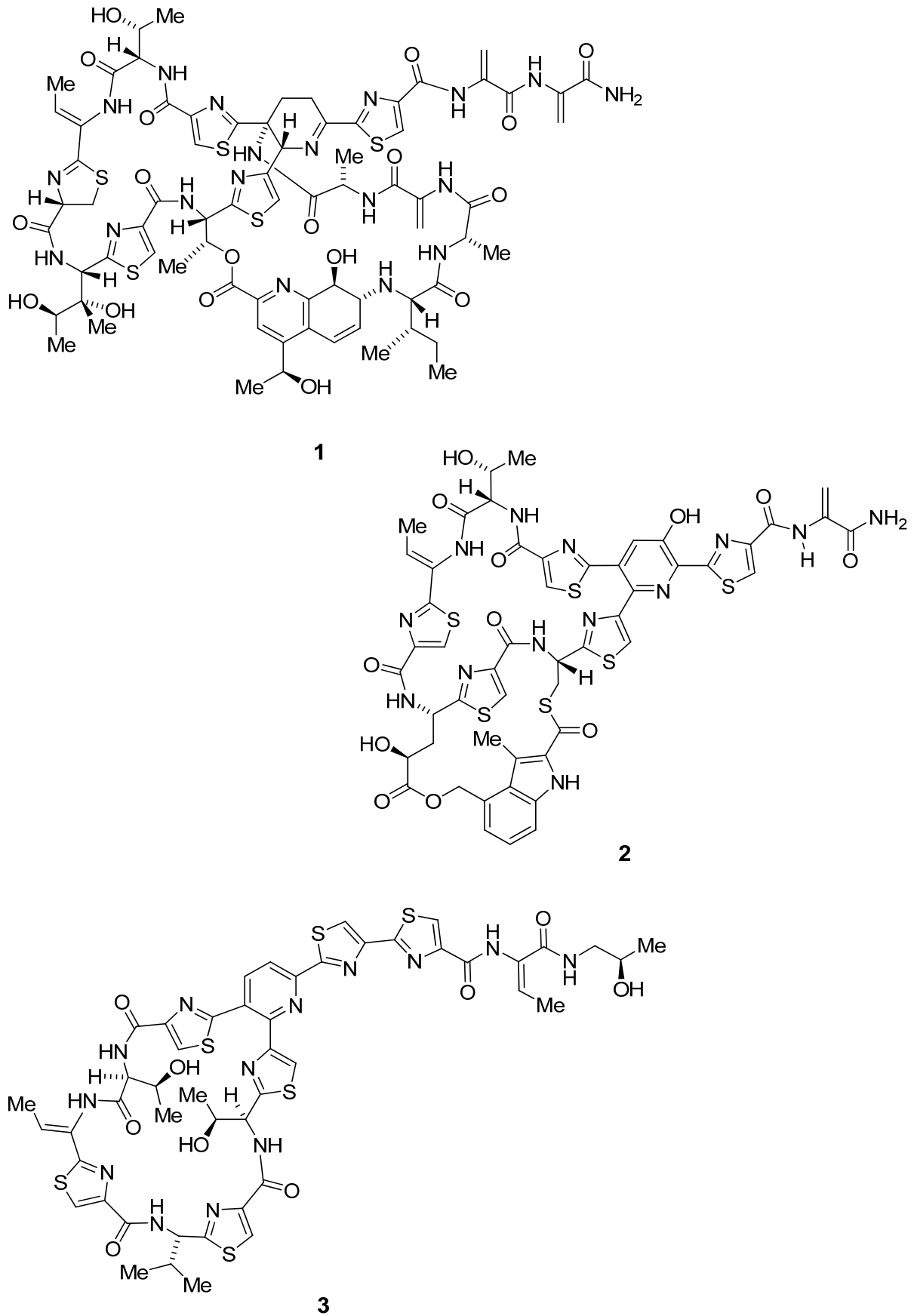


Abbildung 3.1: Chemische Strukturen von Thiostrepton (1), Nosiheptid (2) und Micrococcin (3).

Nachteile der in diesem Zusammenhang verwendeten Methoden zur Affinitätsbestimmung waren jedoch, dass sie zum einen keine quantitativen Bindedaten liefern, da die realen Thiopeptidaffinitäten den Messbereich vermutlich weit unterschreiten, und zum anderen, dass sie auf Annahme zur kooperativen Bindungsverstärkung basierten. Zudem sind diese Methoden für den Vergleich größerer Mengen von Kandidatverbindungen völlig ungeeignet. Beide Aspekte sind jedoch zum genauen Verständnis der Thiopeptidbiologie, wie auch einer darauf basierenden Entwicklung physikochemisch optimierter Thiopeptidderivate bzw. Thiopeptidfragmente zwingend erforderlich. Die hohen Zielstrukturaffinitäten bei der gleichzeitigen geringen Wasserlöslichkeit der Thiopeptidliganden, stellen hierbei hohe Anforderungen an die Empfindlichkeit und Robustheit der Messmethode. In diesem Kapitel werden die Prüfung bzw. Entwicklung und Anwendung unterschiedlicher biochemischer und biophysikalischer Methoden zur Charakterisierung der Thiopeptidligand-Zielstruktur-Interaktion und Affinität beschrieben. Die Studien führten über radioaktive „electrophoretic mobility shift assays“ und CD-spektroskopische Studien zur Entwicklung eines empfindlichen und mittel- bis hochdurchsatztauglichen Thiopeptidbindungsassays auf Basis von fluoreszenzmarkiertem Thiostrepton. Dieser Assay ermöglichte u.a. zum ersten Mal die Bestimmung quantitativer Bindedaten einer Vielzahl von Thiopeptidnaturstoffen sowie (semi-)synthetischer Thiopeptidderivate (Kapitel 4).

3.2 EMSA-Studien zur Thiopeptid-L11-23S rRNA-Interaktion

3.2.1 Interaktion von Thiopeptiden mit „nackter“ 23S rRNA

In früheren Studien wurde berichtet, dass die Bindung von Thiopeptiden an Fragmente der 23S rRNA die die L11 und Thiopeptid-Bindedomäne enthalten, nicht von der Bindung an vollständig intakte 23S rRNA unterschieden werden können.^[6a] Als minimales RNA Bindemotiv für L11 und Thiopeptid wurde hierbei ein 58 nt langes Fragment der 23S rRNA (1051-1108, *E. coli* Nummerierung), die aus Helices H43 und H44 der rRNA bestehende, so genannte L11 Bindedomäne identifiziert.^[8] Dieses Fragment ist leicht über *in vitro* Transkription oder RNA-Totalsynthese zugänglich.^[6b, 7, 9] Zur Vereinfachung der experimentellen Bedingungen wurde dieses RNA 58mer (*E. coli* Nukleotidsequenz) für die im Rahmen

dieser Arbeit beschriebenen Studien eingesetzt und wurde entsprechend 2.12.1.1 mittels T7 basierter „run-off“ *in vitro* Transkription synthetisiert.

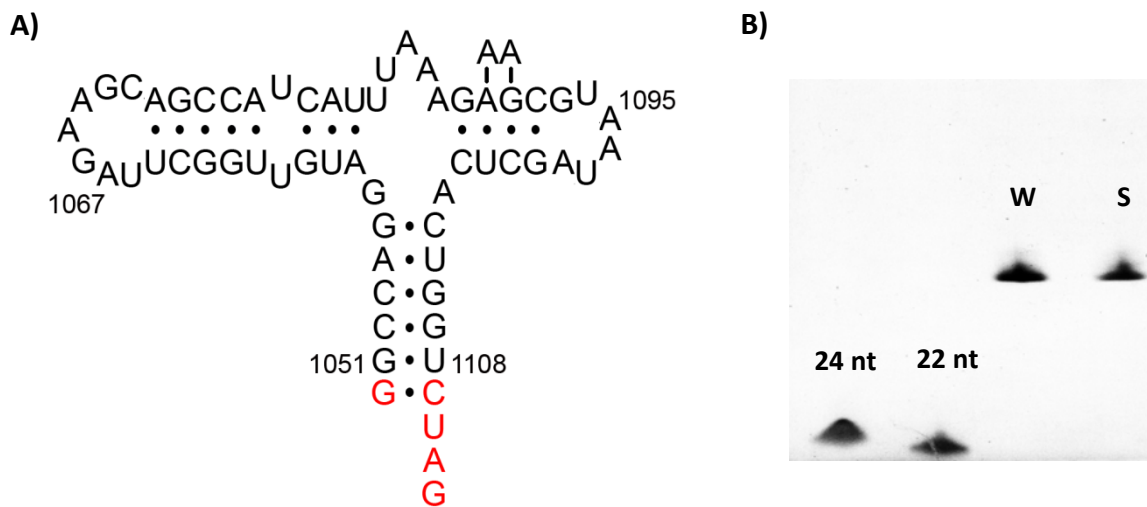


Abbildung 3.2: A) Sekundärstruktur des 23S rRNA Wildtyp-Fragments. Verändert nach Wimberly *et al.*^[10] Die, durch die gewählte Klonierungsstrategie, ergänzten Nukleotide sind in rot dargestellt. B) Analytische, denaturierende 10%ige PAGE (Ethidiumbromid gefärbt) des *in vitro* transkribierten RNA Wildtyp-Fragments (W) sowie der strukturstabilisierten Mutante U1061A (S). Als Größenstandard dienen zwei RNAs bekannter Größe (22 bzw. 24 nt).

Hierzu wurden DNA-Oligo-nukleotidpaare, kodierend für die entsprechende RNA Sequenz und 5'-fusioniert mit einem T7-Minimalpromotor, in einen pUC19 Trägervektor subkloniert und nach einer endonukleolytischen Linearisierung 3'-wärts der Zielsequenz für die *in vitro* Transkription mit T7-Polymerasen genutzt (2.12.1.1).

Statt einer direkten RNA-Synthese ausgehend von den hybridisierten Oligonukleotiden, wurde diese Subklonierungsstrategie gewählt um eine Heterogenität der RNA Produkte, bedingt durch die Heterogenität vollsynthetisch hergestellter Templat-Oligonukleotide bzw. unvollständiger Hybridisierung, möglichst zu vermeiden. Die RNA-Sequenz wurde durch diese Strategie 5'wärts um ein G (T7-Promotor bedingt) und 3'wärts um die Sequenz CUAG auf insgesamt 63 nt verlängert (Abbildung 3.2 A). Neben dem Wildtyp RNA-Fragment wurde zusätzlich die 23S RNA Mutante U1061A synthetisiert und in die Studien integriert. Diese Mutante zeichnet sich durch eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Strukturstabilität aus.^[7] Die RNAs wurden nach der Transkription gelgereinigt (native PAGE) und die Homogenität des Produkts mittels denaturierender PAGE (Abbildung 3.2 B) überprüft. Die Ausbeuten für

in vitro Transkriptionsreaktionen waren unabhängig von der RNA-Sequenz und lagen meist bei $\sim 100 \mu\text{g RNA}/\mu\text{g DNA}$ -Templat.

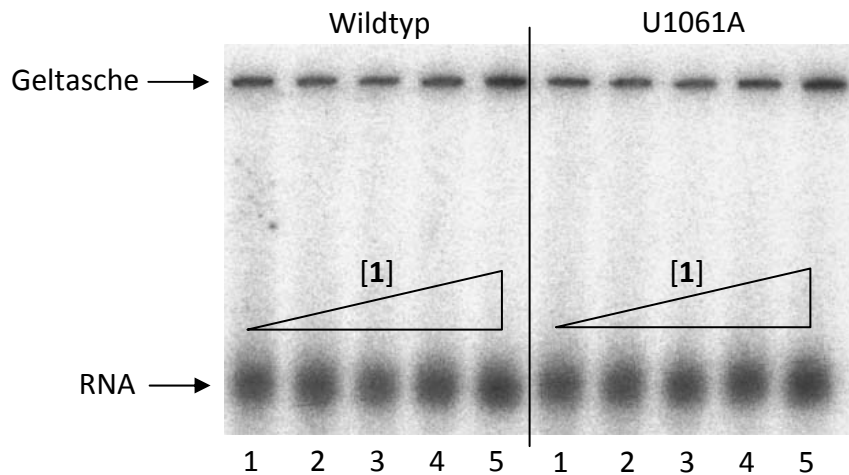


Abbildung 3.3: EMSA-Titration (nicht denaturierende eisgekühlte 10%ige native PAGE, radioaktiv) von konstanten Konzentrationen der Wildtyp- bzw. U1061A-RNA (je $1 \mu\text{M}$, thermisch rückgefalten) mit variierenden Konzentrationen von Thiostrepton **1**. 1: RNA allein; 2: RNA + $0,01 \mu\text{M}$ **1**; 3: RNA + $0,1 \mu\text{M}$ **1**; 4: RNA + $1 \mu\text{M}$ **1**; 5: RNA + $10 \mu\text{M}$ **1**.

Es war berichtet worden, dass **1** auch in Abwesenheit von L11 dazu in der Lage ist an diese RNA-Fragmente zu binden.^[7] Daher wurde zunächst die Fähigkeit von Thiopeptidantibiotika zur Bindung an diese „nackten“ RNAs mittels „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) Studien unter Gleichgewichtsbedingungen überprüft. Hierzu wurden $5'$ - ^{32}P -markierte Wildtyp bzw. Mutantenfragmente mit variierenden Mengen des kommerziell erhältlichen Thiopeptids Thiostrepton **1** (M: 1664 Da) titriert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 2.12.7; Abbildung 3.3). Sowohl bei der Wildtyp-RNA als auch der strukturstabilisierten Mutante konnte bei einer zehnfachen Übertitration mit **1** kein sichtbarer „Gelshift“ induziert bzw. detektiert werden. Entsprechende Ergebnisse lieferten Titrations mit Gelen längerer Laufstrecken in Tris-Borat-EDTA-, Tris-Glycin- und Tris-Acetat-Puffersystemen ± 5 - 10 mM MgCl_2 sowie die Verwendung von Gelladepuffern mit Glycerol, Ficoll, oder Saccharose (Daten nicht gezeigt). Mögliche Ursachen für diese Resultate sind zum einen eine potentielle Nicht-Interaktion von **1** mit der „nackten“ RNA; eine fehlende Detektion der Interaktion bedingt durch die Nachweismethode oder eine, trotz thermaler Rückfaltung, mögliche Fehlfaltung der RNA. Daher wurde die zweite Komponente der Thiopeptidzielstruktur, das ribosomale Protein L11, in die Studien mit aufgenommen.

3.2.2 Interaktion von Thiopeptiden mit 23S rRNA-L11-Proteinkomplexen

Trotz der einer generellen Unempfindlichkeit Gram-negativer Prokaryoten gegen Thiopeptidantibiotika, sind Thiopeptide in der Lage an isolierte Ribosomen dieser Organismen zu binden und so die Translationsmaschinerie zu blockieren.^[11] Die Ursache für dieses Unempfindlichkeit liegt wahrscheinlich in dem unterschiedlichen Zellwandaufbau Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien. Die äußere Membran der Gram-negativen Prokaryoten, mit ihrer charakteristischen Glykolipidzusammensetzung scheint in diesem Zusammenhang eine Aufnahme der großen, hydrophoben Thiopeptide zu vermeiden.^[12] Studien von Stark *et al.*^[13] unterstrichen, neben der Sequenzhomologie, zusätzlich die hohe funktionale Homologie und Austauschbarkeit der L11-Proteine aus Gram-negativen und Gram-positiven Prokaryoten. Aufgrund der leichten Zugänglichkeit, wurden deshalb initiale Funktionsstudien mit dem L11 Protein aus dem Gram-negativen Laborstamm *Escherichia coli* (*EcoL11*) durchgeführt. Bald zeigte sich jedoch eine geringe Stabilität des *E. coli* Proteins bzw. der *EcoL11*-23S rRNA-Komplexe (*vide infra*). Für die meisten Studien wurde in diesem Zusammenhang daher das L11-Protein aus dem Hyperthermophilen *Thermus thermophilus* (*TthL11*) eingesetzt. Bedingt durch ihre natürlich erhöhte Stabilität, werden in der strukturellen Ribosomenforschung häufig Ribosomen oder ribosomale Komplexe aus extremophilen, vor allem hyperthermophilen Prokaryoten verwendet.^[14] Die L11-Proteine beider Organismen wurden mittels des Expressionsvektors pQE30 *Xa* heterolog als His₆-Fusionsproteine in *E. coli* überexprimiert (vgl. 2.11.1). Die Nutzung des pQE30 *Xa* Systems erlaubte (falls notwendig) eine nachträgliche spurlose Entfernung der His₆-Markierung über die Protease Faktor *Xa* (vgl. 2.11.4.1). Die Fusionsproteine wurden über immobilisierte Metallchelatsaffinitätschromatographie (IMAC) unter Verwendung von Nickel-NTA-Agarose gereinigt und mittels SDS-PAGE auf Reinheit überprüft (Abbildung 3.4). Die Standardproteinausbeuten lagen bei 5-10 mg Fusionsprotein pro Liter Expressionskultur.

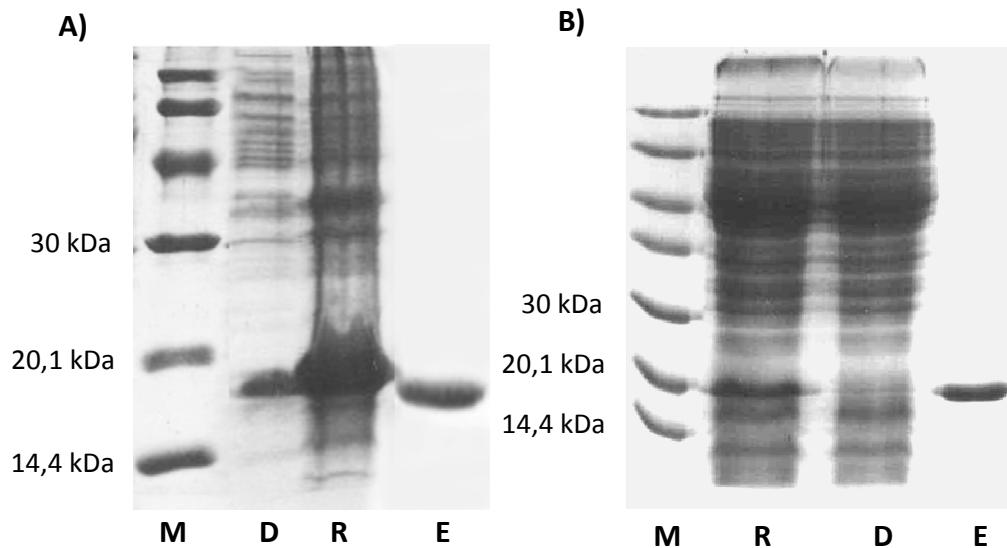


Abbildung 3.4: 15%ige denaturierende SDS-PAGE Gele (Coomassie gefärbt) der IMAC Reinigung von (A) His₆-fusioniertes *E. coli* L11 (*EcoL11*, berechnete Masse 17074 Da) bzw. von (B) His₆-fusioniertes *T. thermophilus* L11 (*TthL11*, B; berechnete Masse 17704). M: Marker; R: Proteinrohextrakt; D: Säulendurchlauf; E: Säuleneluat.

Aufgrund seiner hohen Masse war zu erwarten, dass das Protein durch seine Bindung an die RNA eine deutliche, titrierbare Verlangsamung („Shift“) der RNA-Bande im Gel induziert. Darüberhinaus könnte die Bindung des Thiopeptids zu einem detektierbaren, so genannten Supershift des ternären Thiopeptid-Protein-RNA-Komplexes führen (Abbildung 3.5), da neben dem Molekulargewicht auch Änderungen der physikalischen Eigenschaften (hydrophobe Oberfläche, Konformation) zu Änderungen im elektrophoretischen Verhalten führen können.^[15] Zunächst wurde die generelle Bindefähigkeit der Fusionsproteine an die 23S rRNA Fragmente untersucht. Hierzu wurden zunächst EMSA-Titrations der Wildtyp- bzw. Mutanten-RNA-Fragmente mit variierenden Konzentrationen des *E. coli* L11 Fusionsproteins (*EcoL11*) durchgeführt. Titrations der strukturstabilisierten RNA Mutante U1061A (0,2 μM) mit *EcoL11* zeigten einen proteininduzierten und konzentrationsabhängigen Gelshift (Abbildung 3.6 A), welcher eine Sättigung bei 0,2 μM *EcoL11*, und folglich eine 1:1 Stöchiometrie der Bindungspartner, zeigte. Auffällig ist in diesem Zusammenhang, dass außer der RNA und RNA-Proteinkomplexbande, ein „Schmierbereich“ zwischen den Banden entsteht. Dieser deutet darauf hin, dass der Komplex während der gelelektrophoretischen Trennung teilweise (1-2%) wieder zerfällt.

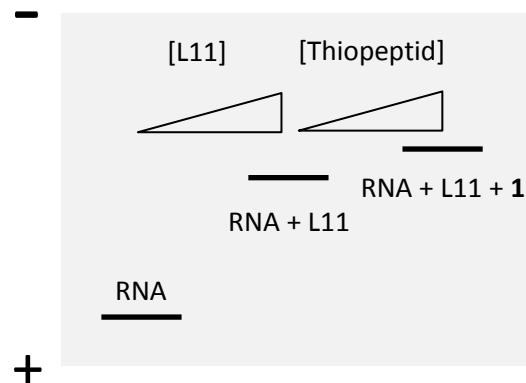


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der erwarteten „Gelshifts“ der Titrations der 23S rRNA (des 23S rRNA-L11-Komplex) mit dem ribosomalen Protein L11 (dem gewünschten Thiopeptid, z.B. **1**) +/-: Gelpolung

EMSA-Titrations von Mutanten-RNA-*EcoL11*-Komplexen mit variierenden Konzentrationen von Thiostrepton **1** (Abbildung 3.6 B) zeigten wenn überhaupt nur einen minimalen „Supershift“ der Komplexbande, welcher auf eine Bindung des Thiopeptids an den RNA-Protein-Komplex hindeuten würde. Darüberhinaus zeigt der konzentrationsabhängige Rückgang der RNA-Bandenzerersetzung eine thiopeptidabhängige Stabilisation des ternären Komplexes an. Diese Resultate bestätigen die Interaktion des strukturstabilisierten 23S rRNA 58mers mit *EcoL11*, als auch die Interaktion des RNA-Proteinkomplexes mit Thiostrepton **1**. Die Thiopeptid-RNA-Proteinkomplex-Interaktion ist demnach über das gewählte Gelshiftsystem detektierbar, jedoch, in Anbetracht des nur minimalen „Supershifts“, nicht gut quantitativ zu bestimmen. Darüberhinaus ließen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die in 3.2.1 analysierte Bindung von Thiopeptiden an die „nackte“ 23S rRNA unter den untersuchten Bedingungen nicht stattfindet, oder nicht detektierbar war.

EMSA-Bindungstudien mit dem Wildtyp RNA-Fragment und *EcoL11* erlaubten einen L11-induzierten Gelshift der RNA-Bande nur bei sehr hohen Konzentrationen der RNA (5 μM , Abbildung 3.7 A+B) mit einer geschätzten RNA-Protein-Affinität $> 3 \mu\text{M}$. Darüberhinaus wurde eine nur sehr schwache Ausbildung der Komplexbande im Gel, sowie ein relativ starkes Verschmieren der RNA-Banden beobachtet. Titrations bei sub- μM RNA-Konzentrationen zeigten keinen L11-induzierten „Gelshift“ (Abbildung 3.7 B). Beides wies auf eine hohe Instabilität des isolierten *E. coli*-RNA-Proteinkomplexes im Gelshift-System hin.

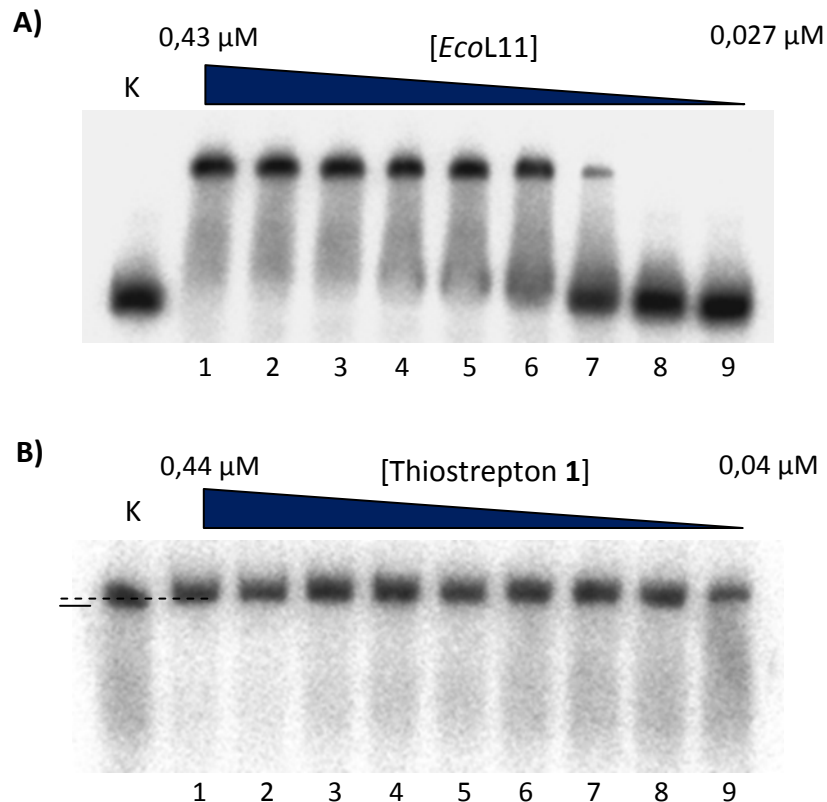


Abbildung 3.6: A) EMSA-Titration (eisgekühlte 10%ige native PAGE) der ^{32}P -markierten 23S rRNA Mutante U1061A (0,2 μM) mit variierenden Konzentrationen von EcoL11. K: nur RNA (Kontrolle); 1: 0,432 μM L11; 2: 0,378 μM L11; 3: 0,324 μM L11; 4: 0,27 μM L11; 5: 0,216 μM L11; 6: 0,162 μM L11; 7: 0,108 μM L11; 8: 0,054 μM L11; 9: 0,027 μM L11. B) EMSA-Titration von U1061A-EcoL11-Komplexen (0,2 μM RNA + 0,6 μM L11) mit variierenden Konzentrationen von Thiostrepton 1. K: Komplex (Kontrolle); 1: 0,44 μM 1; 2: 0,34 μM 1; 3: 0,28 μM 1; 4: 0,24 μM 1; 5: 0,2 μM 1; 6: 0,16 μM 1; 7: 0,12 μM 1; 8: 0,08 μM 1; 9: 0,04 μM 1. Der thiopeptidinduzierte „Supershift“ ist durch schwarze Linien angedeutet.

Ein Induktor für diese Komplexinstabilität ist möglicherweise die strukturelle Stabilität der RNA, da die strukturstabilisierte U1061A RNA-Mutante auch bei geringen RNA-Konzentrationen stabile Komplexe mit EcoL11 ergab (abgeschätzte Affinität ca. 0,12-0,16 μM). Ein weiteres Indiz für diese Hypothese ist, dass die Abwesenheit von Mg^{2+} in den Bindereaktionen als auch dem PAGE-Gel, sowohl beim RNA-Wildtyp als auch der U1061A Mutante zu einem Ausbleiben der Komplexbildung führte (Daten nicht gezeigt). Mg^{2+} wird sowohl *in vitro* als auch *in vivo* für die Faltung und Stabilisierung von RNA-Tertiärstrukturen benötigt.^[16] *In vivo* sind die für die Stabilisierung der RNA notwendigen Mg^{2+} -Konzentrationen jedoch deutlich geringer als *in vitro*.^[17] Der Grund hierfür ist, dass

ribosomale RNAs zusätzlich mit einer Vielzahl von Proteinen assoziiert vorliegen und so strukturell stabilisiert werden. Ein weiterer plausibler Grund für die Instabilität des *EcoL11*-Wildtyp-RNA-Komplexes wäre demnach auch die mangelnde Stabilisierung der RNA durch *EcoL11*, selbst bei den relativ hohen Mg^{2+} -Konzentration im Reaktionsansatz (5-10 mM).

Titrationen von Komplexen der RNA-Mutante U1061A und *EcoL11* mit Thiostrepton **1** zeigten, dass die Addition von Thiopeptidliganden zu einer Stabilisierung des ternären Komplexes führte. Eine ähnliche Stabilisierung wäre demnach auch für Komplexe mit der Wildtyp-RNA zu erwarten. Im Unterschied zur Mutanten-RNA würden in EMSA-Experimenten mit der Wildtyp-RNA bei geringen RNA-Konzentrationen (0,2 μ M oder kleiner) jedoch keine zusätzlichen thiopeptidinduzierten „Supershifts“ der RNA-Protein-Bande zum ternären Komplex, sondern ausschließlich thiopeptidinduzierte „Shifts“ der unkomplexierten RNA direkt zum ternären Komplex zu beobachten sein. Diese „Shifts“ wären dann nicht nur titrierbar, sondern, durch die ausreichende Separierung von Edukt und Produktbande, auch gut detektier- und quantifizierbar. Zum Test dieser Hypothese wurden EMSA-Titrationen konstanter Konzentrationen der Wildtyp-RNA (0,2 μ M) und *EcoL11* (0,6 μ M) mit variierenden Konzentrationen von Thiostrepton **1** durchgeführt (Abbildung 3.7 C).

Die Titration mit **1** induzierte einen konzentrationsabhängigen, deutlichen und scharfen „Gelshift“ der RNA-Bande. Da unter denselben Versuchsbedingungen, die Titration der RNA mit *EcoL11* keinen „Shift“ induzierte, konnte es sich bei der in Abbildung 3.7 C) beobachteten zusätzlichen Bande demnach nur um den ternären Thiostrepton-RNA-Protein-Komplex handeln. Die Experimente mit der U1061A RNA-Mutante (Abbildung 3.6 A) wiesen auf eine 1:1 Stöchiometrie der Protein-RNA-Interaktion hin. Die Titration (Abbildung 3.7 C) zeigt Sättigung bei einem äquimolaren Verhältnis von Thiopeptid und RNA.

Dies deutet eine Molekülstöchiometrie von 1:1:1 (Thiopeptid:RNA:Protein) im ternären Komplex an. Die postulierte Affinität von Thiostrepton **1** an den 23S rRNA-L11-Komplex war ca. 1 nM.^[4, 7] Zur Bestimmung der Thiopeptid-Zielstrukturaffinität im beschriebenen „Gelshiftsystem“ war es deshalb notwendig, die Konzentration des Wildtyp-RNA-Protein-Komplexes in den niedrigen nanomolaren bis sub-nanomolaren Konzentrationsbereich zu bringen. Aufgrund einer ausreichend guten Detektierbarkeit wurde hierzu im Experiment eine Wildtyp-RNA-Konzentration von 1 nM in einem Volumen von 20 μ l (Geltaschenmaximum) gewählt.

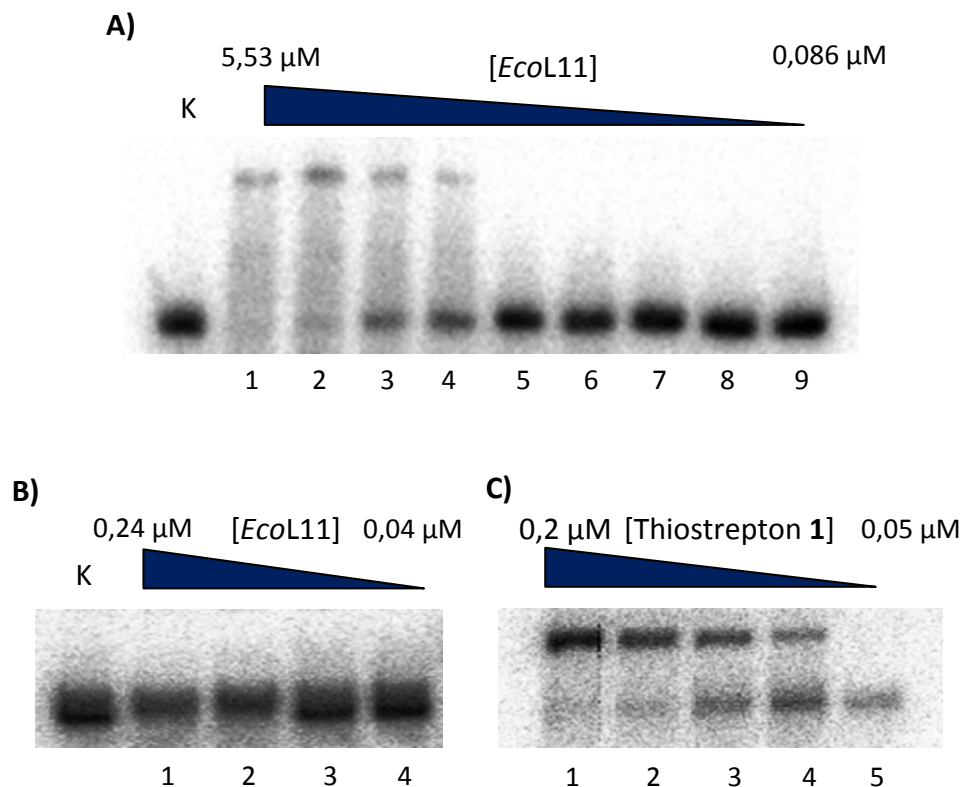


Abbildung 3.7: A) EMSA-Titration (eisgekühlte 10%ige native PAGE, radioaktiv) des 23S rRNA Wildtyps (5 μM) mit variierenden Konzentrationen von *EcoL11*. K: nur RNA (Kontrolle); 1: 5,53 μM L11; 2: 4,15 μM L11; 3: 2,8 μM L11; 4: 1,4 μM L11; 5: 0,7 μM L11; 6: 0,52 μM L11; 7: 0,35 μM L11; 8: 0,17 μM L11; 9: 0,09 μM L11. B) EMSA-Titration des 23S rRNA Wildtyps (0,2 μM) mit variierenden Konzentrationen von *EcoL11*. K: nur RNA (Kontrolle); 1: 0,24 μM L11; 2: 0,16 μM L11; 3: 0,08 μM L11; 4: 0,04 μM L11. C) EMSA-Titration des 23S rRNA Wildtyps (0,2 μM) und *EcoL11* (0,6 μM) mit variierenden Konzentrationen von Thiostrepton **1**. 1: 0,2 μM **1**; 2: 0,1 μM **1**; 3: 0,1 μM **1**; 4: 0,05 μM **1**; 5: ohne **1**.

Die Titration des RNA-Proteingemisches mit den beiden Thiopeptiden **1** und **2** führte zu einer konzentrationsabhängigen Induktion eines „Gelshifts“ der RNA-Bande (Abbildung 3.8 A+B). Halbmaximale Shifts (IC_{50}), entsprechend einem 1:1 Verhältnis von RNA und Komplexbande, wurden bei Thiostrepton **1** bei einer Konzentration von ca. 8 nM erreicht. Für Nosiheptid **2** wurde ein IC_{50} von ca. 3,6 nM bestimmt. Diese Resultate zeigten Thiopeptid-Zielstrukturaffinitäten im niedrigen nanomolaren Konzentrationsbereich und darüberhinaus eine Thiopeptid-bedingte, kooperative Stabilisierung des ternären Komplexes.

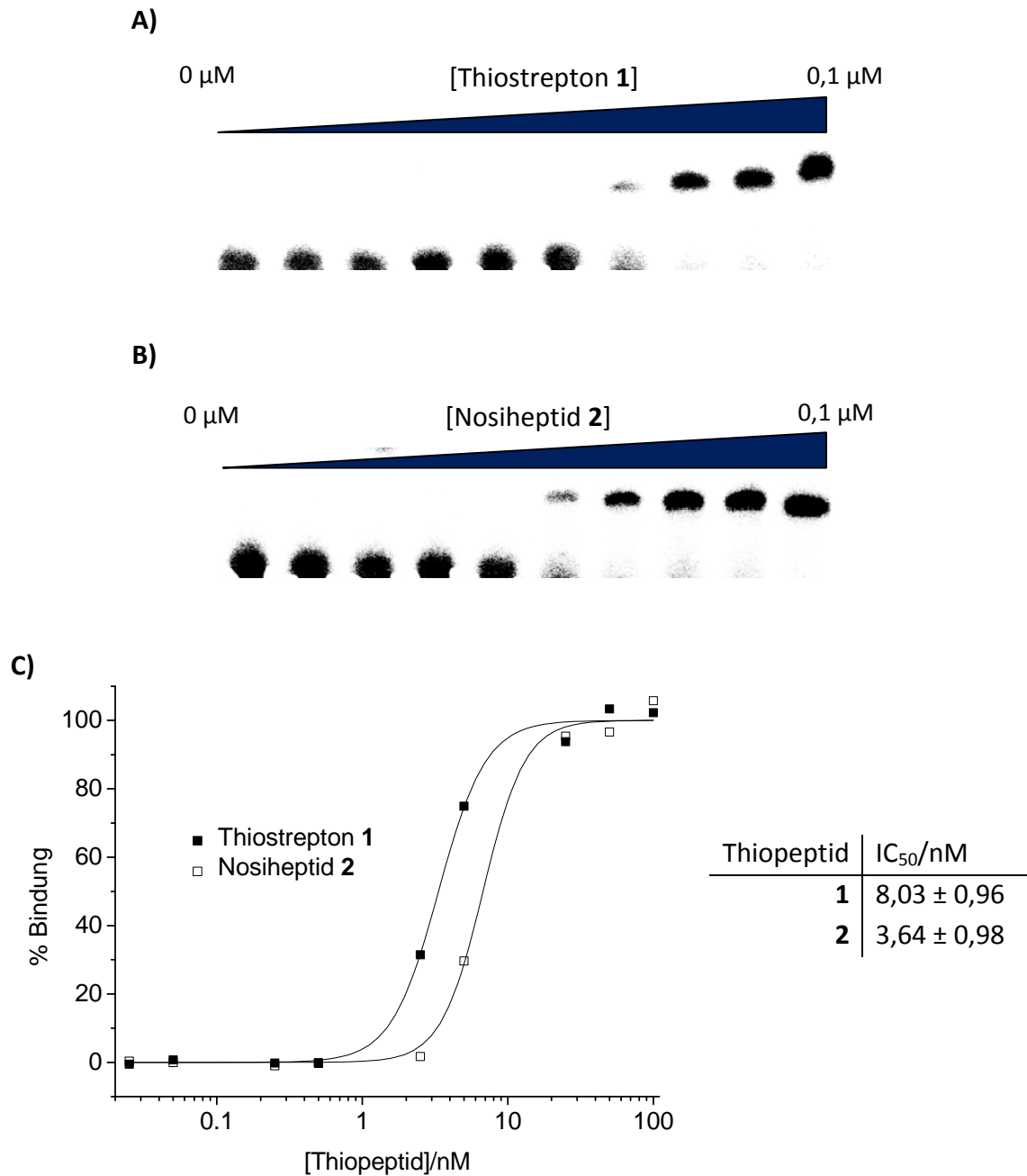


Abbildung 3.8: EMSA-Titration (eisgekühlte 10%ige native PAGE, radioaktiv) des 23S rRNA Wildtyps (1 nM) und *EcoL11* (1 μ M) mit variierenden Konzentrationen von Thiostrepton **1** (A) und Nosiheptid **2** (B). C) Graphische Auftragung des Bandenshifts als Funktion der Thiopeptidkonzentration. Die Anpassung der Messdaten (Triplikate) an die Hill-Funktion lieferte folgende IC₅₀-Werte: Thiostrepton **1**; 8,03 ± 0,96 nM und Nosiheptid **2**: 3,64 ± 0,98 nM.

Generell würden weitere Untersuchungen durch die geringe, Stabilität des Wildtyp-RNA-*EcoL11*-Komplexes erschwert werden. Ribosomale Komplexe aus extremophilen bzw.

thermophilen Prokaryoten zeigen oft deutlich höhere Stabilitäten *in vitro*.^[14] Dies gilt vor allem für den so genannten „L12 Stiel“, einer wichtigen strukturellen Komponente des 70S ribosomalen GTPase Zentrums, dessen Basis das L11-Protein bildet.^[18] Falls die Instabilität des *EcoL11*-Wildtyp-RNA-Komplexes auf eine affinitätsbedingte „Stabilisierungsschwäche“ von *EcoL11* zurückzuführen ist, sollte im Falle des L11-Homologs aus *Thermus thermophilus* (*TthL11*) die Bildung von stabilen L11-Wildtyp-RNA-Komplexen, auch bei sehr geringen RNA-Konzentrationen (1 nM), möglich sein. Zum Test dieser Hypothese wurden EMSA-Titrations der Wildtyp-RNA mit variierenden Konzentrationen von *TthL11* durchgeführt (Abbildung 3.9).

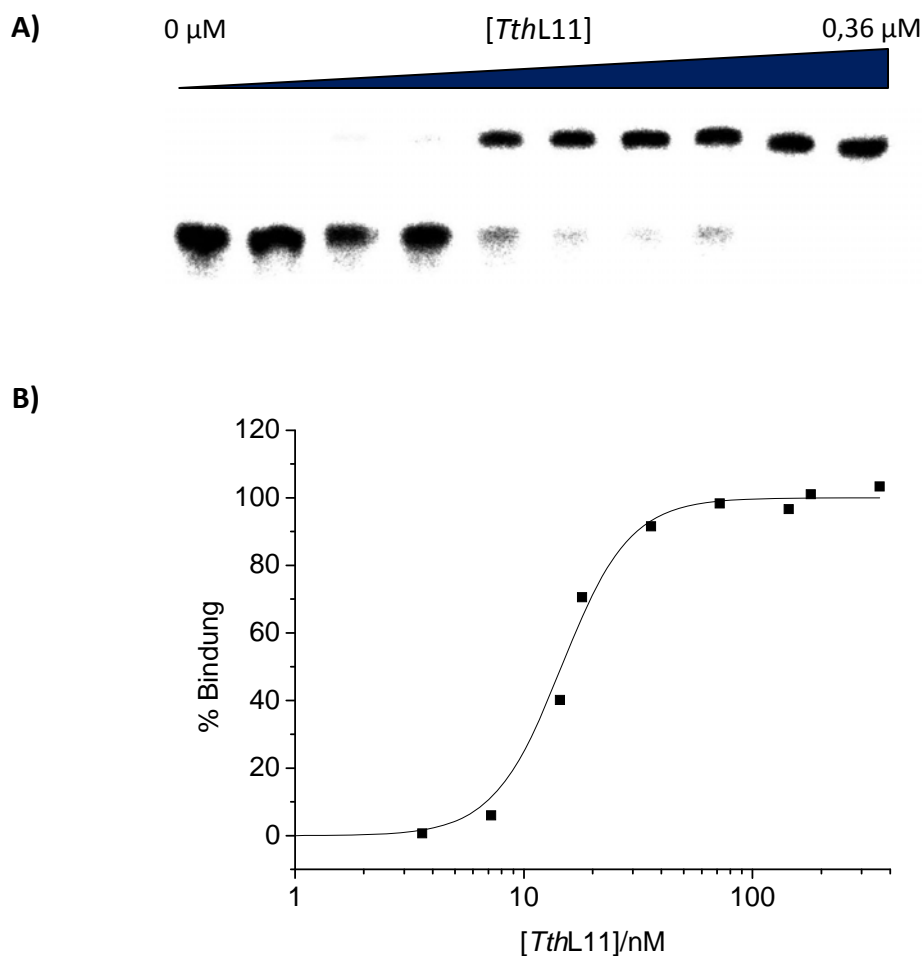


Abbildung 3.9: A) EMSA-Titration (RT) des 23S rRNA Wildtyps (1 nM) mit variierenden Konzentrationen von *TthL11*. B) Graphische Auftragung des Bandenshifts als Funktion der *TthL11*-Konzentration. Die Anpassung der Messdaten (Triplikate) an die Hill-Funktion lieferte folgenden K_D : $17,7 \pm 2,5$ nM (Triplikate).

Die Titrations lieferten klare und L11-konzentrationsabhängige „Shifts“ der RNA-Bande und erlaubten die Bestimmung des *TthL11*-Wildtyp-RNA- K_{DS} von $17,7 \pm 2,5$ nM.^[19] *TthL11* bindet somit mind. 100-200× affiner an die Wildtyp-RNA als das korrespondierende *E. coli* Homolog. Ähnliche Affinitätsunterschiede wurden auch beim Vergleich der L10/L7/L12-Stielkomplex-23S rRNA-Affinitäten von thermophilen und nicht thermophilen Prokaryoten beschrieben.^[18] Darüberhinaus zeigte *TthL11* keine Affinitätsunterschiede an die strukturstabilisierte 23S rRNA-Mutante U1061A. Die hohe Stabilität des RNA-*TthL11*-Komplexes wurde zusätzlich durch die Tatsache unterstrichen, dass EMSA-Studien mit *TthL11*, im Unterschied zu *EcoL11*, bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt werden konnte. *TthL11*-23S rRNA-Wildtyp-Komplexe lieferten somit eine stabile Grundlage für folgende Studien im Zusammenhang der Thiopeptid-Zielstrukturaffinität.

3.3 CD-spektroskopische Studien zur Thiopeptid-L11-23S rRNA-Interaktion

3.3.1 Einfluss von Thiopeptiden auf die Struktur „nackter“ 23S rRNA

In Anwesenheit von Thiopeptiden konnte in UV-spektroskopischen RNA-Schmelzexperimenten^[6b] eine titrierbare Zunahme der RNA-Strukturstabilität gefunden werden. Diese Stabilisierung geht möglicherweise mit detektierbaren Konformationsänderungen der RNA einher. Zur Überprüfung des Einflusses von Thiopeptiden auf die Gesamtstruktur bzw. Konformationen der 23S rRNA, wurden daher Zirkular Dichroismus-(CD)-spektroskopische Studien durchgeführt (vgl. 2.13.1). Falls vorhanden, könnten thiopeptidinduzierte Strukturänderungen so auch Informationen über die Liganden-RNA-Affinität liefern. Die 23S rRNA-Fragmente (Abbildung 3.10 A) der strukturstabilisierten Mutante U1061A zeigten unter den verwendeten Messbedingungen das charakteristische Spektrum einer helikalen RNA in der typischen A-Form, mit den charakteristischen Maxima bei 210 und 265 nm.^[20] Eine Titration dieser RNA mit Thiostrepton **1** hatte keinen messbaren Einfluss auf das CD-Spektrum und somit auch nicht auf die Sekundärstruktur der RNA. Dieselben Resultate wurden für das Wildtyp-RNA-Fragment erzielt (Abbildung 3.10 B). Thiostrepton **1** besaß im Rahmen der Messbedingungen vernachlässigbares Eigenspektrum und hatte somit einen nur minimalen Einfluss auf die RNA-Spektren (Abbildung 3.11). Diese Ergebnisse zeigten,

dass beide RNA-Fragmente generell gefaltet vorlagen und keine Unterschiede in ihrer globalen Sekundärstruktur aufwiesen. Die verwendeten RNAs wurden vor dem Experiment nicht thermal rückgefaltet, sondern falteten autonom kotranskriptional sekundär und durch die hohen Mg^{2+} -Konzentrationen (5 mM) tertiär^[16-17].

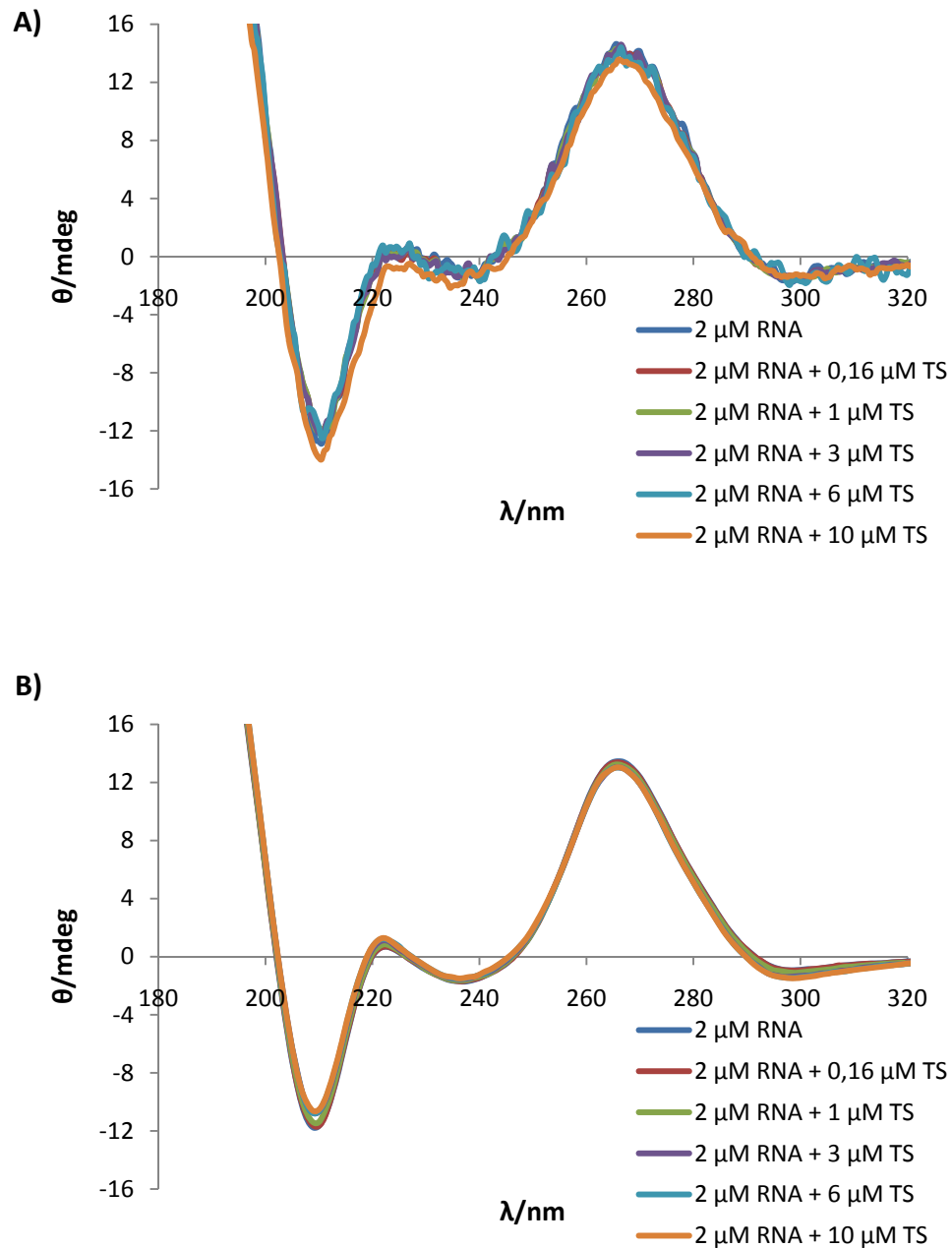


Abbildung 3.10: CD-Titrations der 23S rRNA Mutante U1061A (A) und des RNA-Wildtyps (B) (je 2 μ M RNA) mit variierenden Konzentration von Thiostrepton **1** (TS). Die Spektren wurden bei Raumtemperatur in einem Wellenlängenbereich von 180-320 nm aufgenommen. Jedes Spektrum stellt ein Summenspektrum von 10 Akkumulationen dar.

Darüberhinaus hatte die Zugabe von **1** keinen detektierbaren Einfluss auf die Gesamthelizität der RNAs. Demnach schien die globale Sekundär- und Tertiärstruktur der RNAs vor und nach der möglichen Thiopeptidassoziation unverändert. Dies schließt jedoch Konformationsänderungen auf der Nukleotidebene nicht aus, die möglicherweise über CD-spektroskopische Methoden nicht detektierbar sind. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass sich keine Komplexe ausbilden.

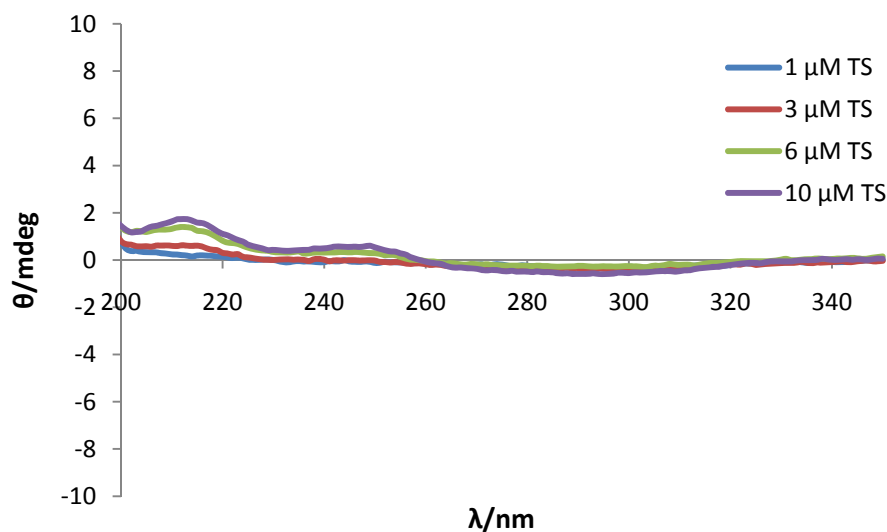


Abbildung 3.11: CD-Spektren von Thiostrepton **1** (TS) im für die Titrationsen verwendeten Konzentrationsbereich. Die Spektren wurden bei Raumtemperatur in einem Wellenlängenbereich von 180-350 nm aufgenommen. Jedes Spektrum stellt ein Summenspektrum von 10 Akkumulationen dar.

3.3.2 Einfluss von Thiopeptiden auf die Struktur von RNA-freiem L11-Protein und die Struktur von 23S rRNA-L11-Komplexen

In der Literatur existiert keine Dokumentierung der direkten Interaktion von Thiopeptiden mit isoliertem ribosomalen Protein L11. Dieser Befund führte zu der Meinung, dass die Thiopeptid-Zielstrukturinteraktion primär über die 23S rRNA verläuft.^[6b] Interessanterweise bindet Thiostrepton **1** jedoch nur mit mikromolaren Affinitäten an die „nackte“ RNA. Die Affinität an den RNA-Protein-Komplex ist jedoch nanomolar.^[4, 7] Ein plausibler Grund für diese Affinitätssteigerung wäre eine z.B. eine L11-bedingte Strukturstabilisierung der rRNA. Die RNA-Bindedomäne von L11 befindet sich in der C-terminalen Domäne des Proteins. Der N-Terminus zeigt keine Kontakte zur RNA.^[10] Studien von Bausch *et al.*^[7] in diesem

Zusammenhang wiesen jedoch darauf hin, dass eine Thiopeptidbindung an Komplexe der 23S rRNA und der C-terminalen Domäne von L11 im mikromolaren Bereich stattfindet und das der Protein N-Terminus diese Bindung kooperativ verstärkt. Dieser Sachverhalt erzwingt die Frage nach der molekularen Ursache für die Affinitätserhöhung. Eine denkbare Möglichkeit wäre eine affinitätsfördernde Konformationsänderung von L11. NMR-basierte Studien von Ilin *et al.*^[21] wiesen auf darauf hin, dass das L11-Protein bereits bei der Bindung an die 23S rRNA starke Konformationsänderungen aufweist, welche sich neben einer Rigidifizierung eines flexiblen „Loops“ der RNA-bindenden C-terminalen Domäne, in einer Reorientierung des N-Terminus äußert. Darüberhinaus zeigten „RNA-footprinting“-Studien,^[22] dass die Bindung von Thiostrepton **1**, zusätzliche Konformationsänderungen des RNA-gebundenen L11-Proteins bewirkt. Solche Konformationsänderungen sollten möglicherweise auch CD-spektroskopisch erfassbar sein. Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten CD-spektroskopischen Studien wurden mit dem thermostabilen L11 aus *Thermus thermophilus* (*TthL11*) durchgeführt. Das CD-Spektrum von freiem *TthL11* zeigte die Signatur eines weitgehend α -helikalen Proteins mit charakteristischen Elliptizitätsmaxima bei 200, 210 und 220 nm^[20] und steht im Einklang mit den publizierten NMR- und Röntgenkristallstrukturdaten des L11 Proteins.^[3, 10, 23] Eine Titration von *TthL11* mit variierenden Konzentrationen von **1** hatte keinen messbaren Einfluss auf die Gesamthelizität des Proteins (Abbildung 3.12). Die Grundkonformation des freien L11-Proteins ist demnach in Anwesenheit des Thiopeptids unverändert. Die Ergebnisse schlossen jedoch die generelle Bindefähigkeit von Thiopeptiden an freies L11-Protein nicht aus. Daher wurde die Konformation von RNA und Protein in ihrer komplexierten Form untersucht. Das CD-Spektrum des RNA-*TthL11*-Komplexes vom wt (2 μ M, Abbildung 3.13) entsprach generell einer Überlagerung der RNA und Protein-Einzelspektren. Das Maximum bei 265 nm ist hierbei ausschließlich für die rRNA charakteristisch. Die Titration mit **1** führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion dieses Maximums von 6,4 auf ca. 4,8 mdeg. Diese Reduktion ist ein generelles Indiz für eine Entstapelung der RNA-Nukleobasen,^[20] z.B. bedingt durch eine Konformationsänderung der RNA, welche durch Bindung des Liganden induziert wird. Diese Reduktion kam bei ca. 2 μ M **1** zu einer Sättigung, was einer 1:1 Stöchiometrie von RNA-Proteinkomplex und Ligand entspricht. Die Elliptizität bei 210 und 220 nm wird sowohl durch Protein- als auch RNA-Anteile bedingt. Hierbei wird das Teilmaximum bei 220 nm stärker vom Proteinanteil dominiert, da das RNA-Spektrum (vgl.

3.10 A-B) hier Werte um null aufweist. Beide Maxima zeigten bei der Titration mit **1** ebenfalls einen konzentrationsabhängigen Rückgang des CD-Signals und eine volle Sättigung bei ca. 2 μM des Liganden. Die Beobachtung, dass die „RNA- und Proteinmaxima“ in ihrem Wert ab- bzw. zunehmen deutet mögliche thiopeptidabhängige Konformationsänderungen beider Makromoleküle im Komplex an.

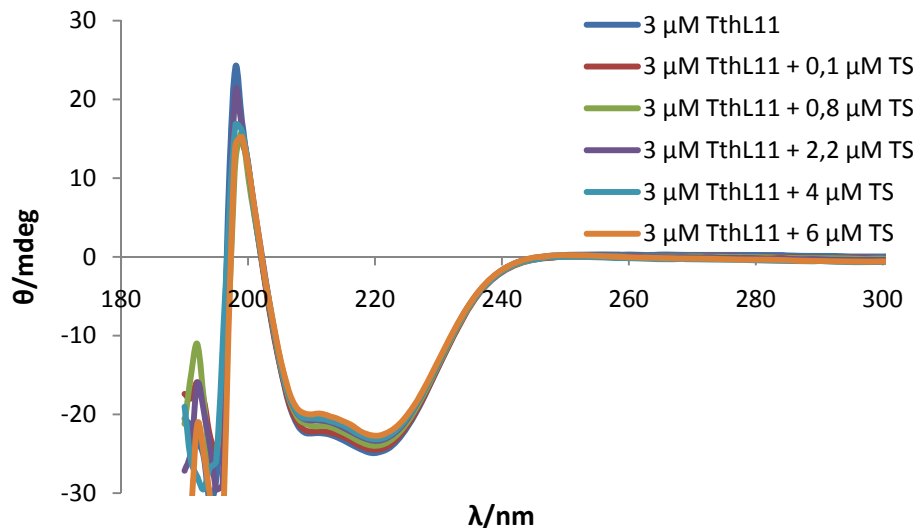


Abbildung 3.12: CD-Titrationen von *TthL11* (3 μM) mit variierenden Konzentration von Thiostrepton **1** (TS). Die Spektren wurden bei Raumtemperatur in einem Wellenlängenbereich von 180-300 nm aufgenommen. Jedes Spektrum stellt ein Summenspektrum von 10 Akkumulationen dar.

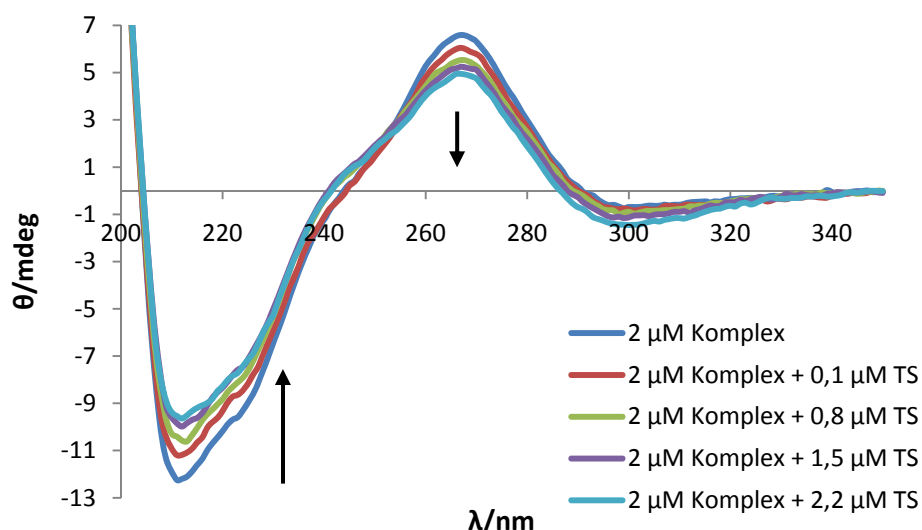


Abbildung 3.13: Exemplarische CD-Titration eines stöchiometrischen Komplexes von Wildtyp-23S rRNA Fragmenten und *TthL11* (2 μM) mit Thiostrepton **1** (TS). Die Spektren wurden bei Raumtemperatur in einem Wellenlängenbereich von 180-350 nm aufgenommen. Jedes Spektrum stellt ein Summenspektrum von 10 Akkumulationen dar.

Differenzspektren von Komplex- und Einzelmolekülspektren sind jedoch im beschriebenen Fall nicht möglich, da beide Makromoleküle im Komplex thiopeptidinduzierte Strukturänderungen aufwiesen, deren Beitrag zum Gesamtspektrum nicht abgeschätzt werden kann. Es war demnach nicht möglich kalkulatativ zu bestimmen, ob es sich bei der thiopeptidinduzierten Änderung des CD-Spektrums tatsächlich auch um Konformationsänderungen des Proteins handelte und zu bestimmen ob, falls vorhanden, eine Konformationsänderung des Proteins α -Helices, β -Faltblätter, „ β -turns“ oder „random coils“ beinhaltete um eine Ortsauflösung der Konformationsänderung zu erhalten.

3.4 Untersuchung der Thiopeptid-L11-23S rRNA-Interaktion mit Hilfe fluoreszenter Thiostreptonsonden

Fluoreszenzspektroskopie, „Fluorescence Imaging“, sowie fluoreszente Sonden sind zu unentbehrlichen Werkzeugen der modernen medizinischen und naturwissenschaftlichen Forschung (Biologie, Biophysik, Biochemie, Chemie, etc.) geworden. Die entsprechenden Anwendungen und verwendeten Fluorophore sind vielfältig.^[24] Ein wichtiger Aspekt im Rahmen dieser Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten, ist die Anwendung fluoreszenzspektroskopischer Methoden zur Analyse der Interaktion und Affinität biologischer Makromoleküle untereinander bzw. deren Interaktion mit niedermolekularen Liganden. Neben der Fluoreszenzintensität, werden hier häufig die physikalischen Phänomene der Fluoreszenzpolarisation oder -anisotropie, des „Fluoreszenzquenchings“ oder des Förster-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) zur Detektion der Molekülinteraktion genutzt.^[24b] Die Art des verwendeten Fluorophors, wie auch die genaue Lokalisierung des Fluorophors im Komplex sind darüberhinaus von Wichtigkeit und von der jeweiligen experimentellen Fragestellung abhängig. Als Fluoreszenzquelle werden in diesem Zusammenhang neben der natürlichen Eigenfluoreszenz einiger Bausteine biologischer Makromoleküle (z.B. aromatische Aminosäuren wie Tryptophan), häufig fluoreszenzintensivere Analoga dieser Bausteine wie unnatürliche Aminosäuren^[25] oder fluoreszente Nucleobasen^[26] verwendet. Darüberhinaus kommt es zum Einsatz organischer Fluorophore wie Fluoreszein, Rhodamin, Alexa Fluor, BODIPY uvm. und deren Derivate,^[24b] Quantum Dots^[27] sowie des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP)^[28] bzw. dessen vielfältige Mutanten.^[24b] Im Fall einer Makromolekül-Liganden-Interaktion ist es sehr oft sinnvoll, den

niedermolekularen Liganden an einen Fluorophor zu koppeln. Zur Analyse der Interaktion von Thiopeptiden mit Komplexen der 23S rRNA und des L11-Protein wurden im Rahmen der Dissertation von Dipl. Biochem. Sebastian Schoof^[29] (Technische Universität Dortmund) fluoreszenzmarkierte Thiopeptidliganden, in Form von Fluoreszein-gekoppeltem Thiostrepton **1** hergestellt (Abbildung 3.14 A, siehe auch Kapitel 4).^[19, 30]

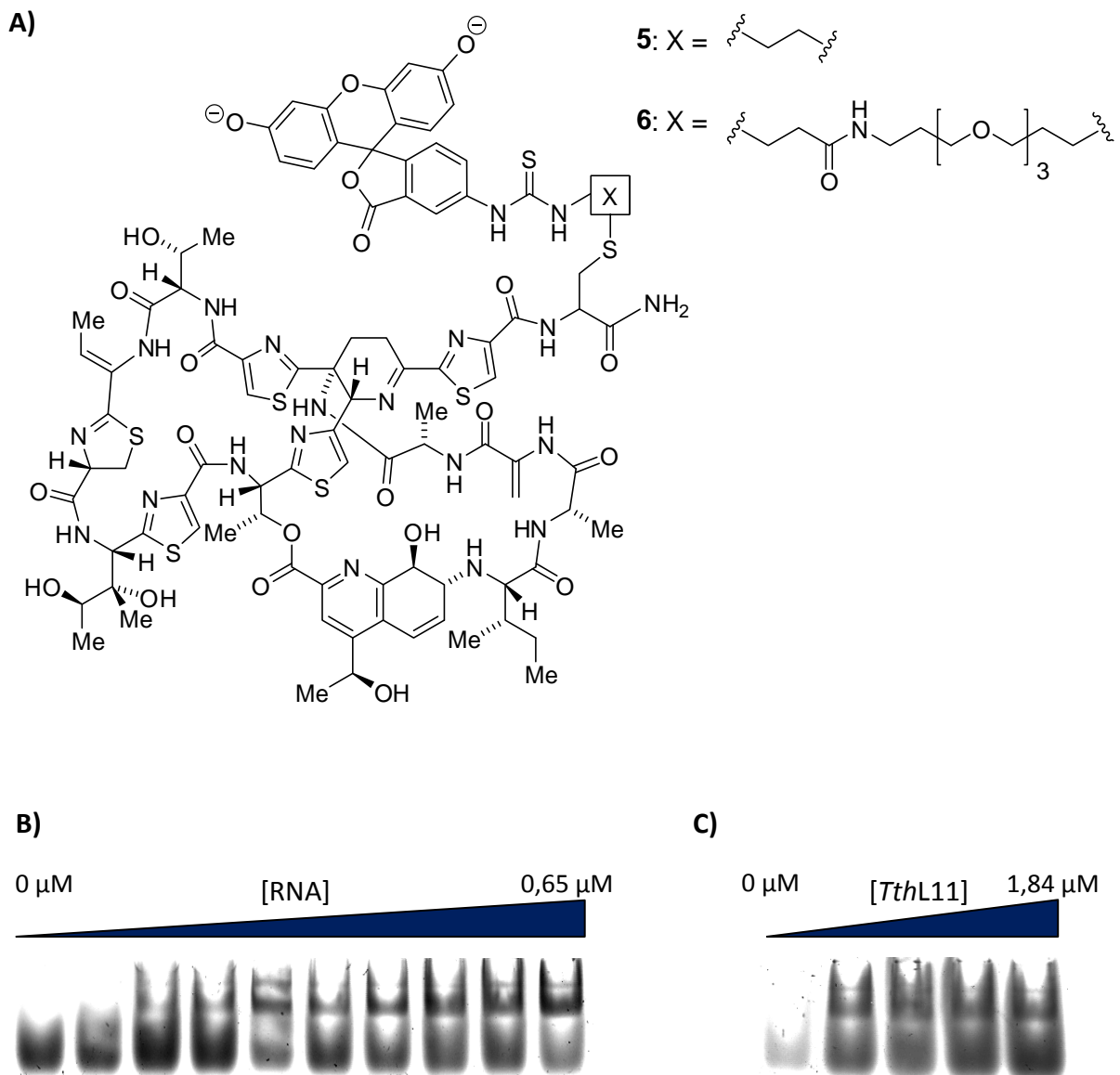


Abbildung 3.14: A) Chemische Strukturen der fluoreszenten Thiostreptonsonden **5** + **6**. B) Native PAGE (10%) der Titration stöchiometrischer Mengen von **6** und *TthL11* (je ca. 0,5 μM) mit Wildtyp 23S rRNA-Fragmenten bzw. (C) von **6** und Wildtyp RNA (je ca. 0,5 μM) mit *TthL11*. Zur Detektion wurde mit einer Wellenlänge von 475 nm angeregt und die Fluoreszenzemission bei 530 nm detektiert.

Basierend auf einem semisynthetischem Derivat von **1**, bei dem eine der beiden Dehydroalaningruppen des Molekülschwanzes entfernt wurde, wurden hierbei Fluoreszeinisothiocyanat-Einheiten über einen kurzen C2-Linker (**5**) bzw. über einen längeren, aus drei PEG-Einheiten bestehenden Linker (**6**), mittels einer 1,4-Thiol-Michael-Addition selektiv an das verbleibende Dehydroalanin des Molekülschwanzes gekuppelt.^[19, 29-30] Die qualitative Bindefähigkeit von **6** an Komplexe der Wildtyp 23S rRNA und *TthL11* wurde zunächst mit Hilfe nativer PAGE überprüft. Gleichgewichtstitrationen stöchiometrischer Mengen von Sonde und Protein (bzw. Sonde und RNA) mit RNA (bzw. Protein) zeigten hierbei eine konzentrationsabhängige Ausbildung einer zusätzlichen fluoreszenten Bande im Gel (Abbildung 3.14 B+C), welche die Formierung des ternären RNA-Protein-Thiopeptid-Komplexes andeutete.

3.4.1 Fluoreszenzanisotropiestudien der Interaktion der Thiostreptonsonde mit 23S rRNA-L11-Komplexen

Zur quantitativen Analyse der Bindung der fluoreszenten Thiostreptonsonden an 23S rRNA-L11-Komplexe wurden Fluoreszenzanisotropieexperimente im 384-Loch-Platten-Format durchgeführt. Im Unterschied zu früheren Studien mit **1**,^[6b, 7, 31] konnte unter den verwendeten Messbedingungen (1-200 nM Sonde **6**, Titration bis max. 10 μ M RNA) keine signifikante Anisotropieänderung und dementsprechend keine Bindung der Thiostreptonsonden an das proteinfreie Wildtyp-rRNA-Fragment sowie die mutationsstabilisierte RNA-Mutante U1061A detektiert werden (Abbildung 3.15 A). Dieselben Ergebnisse lieferten Titrationen der Sonden mit dem ribosomalen L11-Protein allein (*TthL11*, Daten nicht gezeigt). Unter den verwendeten Messbedingungen war die Sonde demnach nicht in der Lage an das 23S rRNA-Fragment bzw. das L11-Protein allein zu binden.

In Bindungsexperimenten mit RNA-Proteinkomplexen konnte jedoch eine deutliche und starke Bindung von **5+6** an die Komplexe detektiert werden (Abbildung 3.15 A). Der Z-Faktor^[32] für den Bindungsassay konnte hierbei zu 0,857 bestimmt werden. Diese Resultate erlaubten eine analytische Beschreibung des Bindungsszenarios unter der Berücksichtigung aller möglichen Gleichgewichte im ternären Komplex (siehe 2.13.2.2 sowie Abbildung 3.15 C). Im betrachteten Fall handelte es sich um ein System bestehend aus zwei gekoppelten Gleichgewichten: $\text{RNA} + \text{L11} \rightleftharpoons [\text{RNA/L11}]$ sowie $[\text{RNA/L11}] + \text{Sonde} \rightleftharpoons [\text{RNA/L11/Sonde}]$.

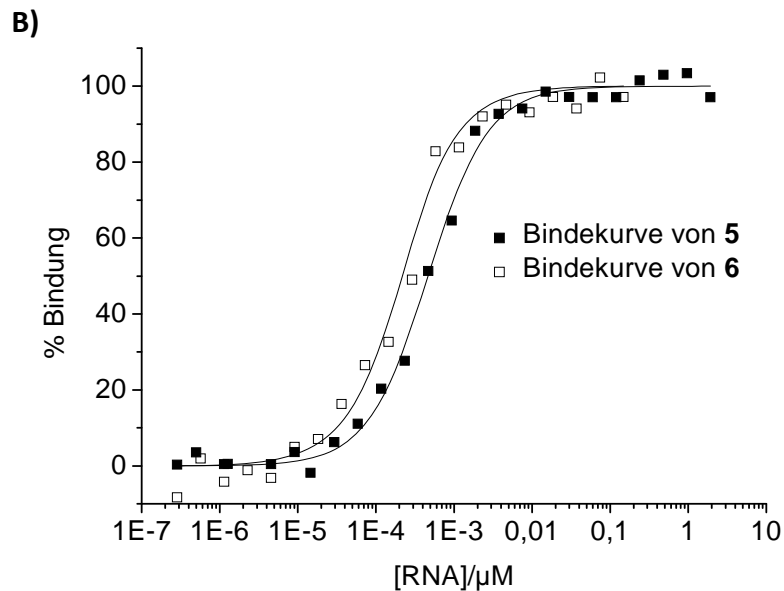
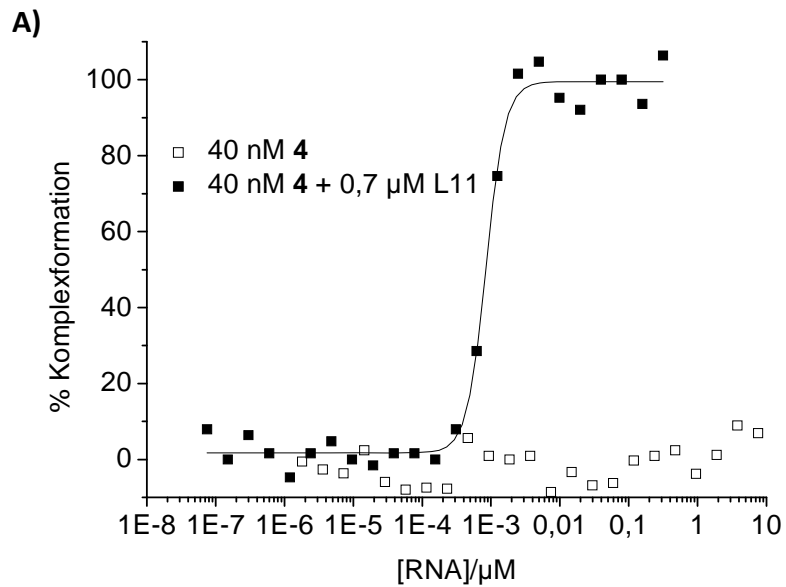
Die Existenz der Gleichgewichte $\text{RNA} + \text{Sonde} \rightleftharpoons [\text{RNA/Sonde}]$ sowie $\text{Protein} + \text{Sonde} \rightleftharpoons [\text{Protein/Sonde}]$ konnte aufgrund der experimentellen Befunde weitgehend ausgeschlossen werden. Die zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_{D2} verwendete analytische Lösung für das gekoppelte Gleichgewicht ist in 2.13.22 dargestellt (Formel 8).

Zur Bestimmung der Affinitäten der Sonden (**5+6**) an den RNA-L11-Komplex, wurden jeweils Mischungen konstanter Konzentrationen von L11 (0,6 μM) und der Sonde (5 nM) mit variierender Konzentration des RNA-Fragments titriert. Dieses Titrationsformat erlaubte die Bestimmung sub-nanomolarer Dissoziationskonstanten, trotz des verwendeten FITC-Fluorophors, da nominell nur die Steigerung der L11-RNA-Affinität in Anwesenheit der Sonde (unter den eingesetzten Molekkonzentrationen) analysiert wurde. Die Betrachtung als gekoppeltes Gleichgewicht ermöglichte so mathematisch, die Bestimmung sub-nanomolarer Affinitäten für die beiden Sonden. Die Dissoziationskonstante K_{D1} für das Gleichgewicht $\text{RNA} + \text{L11} \rightleftharpoons [\text{RNA/L11}]$ wurde im Rahmen der in 3.2.2 beschriebenen EMSA-Studien auf einen Wert von $17,7 \pm 2,5$ nM bestimmt. Die Anpassung der Bindekurven (jeweils Mittelwerte von fünf Bestimmungen) an die analytische Lösung für das gekoppelte Gleichgewicht lieferte einen K_{D2} von $0,33 \pm 0,17$ nM für **5**^[30] und einen K_{D2} von $0,14 \pm 0,08$ nM für **6**.^[19]

Frühere Studien zeigten, dass die für die Thiopeptidbindung notwendige Tertiärstruktur des Wildtyp-RNA-Fragments durch Mg^{2+} stabilisiert wird.^[33] In Übereinstimmung mit diesem Befund konnte keine Komplexbildung von **6**, L11 und RNA in Abwesenheit von Mg^{2+} und neutralem pH detektiert werden. Mittels Titration konnte für diese Interaktion ein scheinbarer $\text{EC}_{50}(\text{Mg}^{2+})$ von $0,05 \pm 0,005$ mM und eine komplette Sättigung bei 1 mM Mg^{2+} dokumentiert werden (Abbildung 3.16 A).

In Studien von Blyn *et al.*^[33] sowie Schwalbe *et al.*^[21, 23] wurde berichtet, dass die für die Thiopeptidbindung benötigte Tertiärstruktur der RNA in Abwesenheit von Mg^{2+} auch über hohe Konzentrationen monovalenter Kationen wie K^+ und NH_4^+ stabilisiert werden kann. In der Tat konnte in Fluoreszenzanisotropie-Bindungsexperimenten unter Mg^{2+} -freien Bedingungen und in Anwesenheit hoher Konzentrationen von K^+ (200 mM) eine Bindung der Sonde **6** an den RNA-Protein-Komplex detektiert werden (Abbildung 3.16 B). Die Sonden-Komplex-Affinität in diesem Mg^{2+} -freien System (K_D : 34 ± 3 nM) war jedoch 100× schwächer als im korrespondierenden System mit 5 mM Mg^{2+} (K_D : $0,33 \pm 0,06$ nM). Die verwendeten ionischen Bedingungen entsprachen hierbei exakt den, für die NMR-Strukturbestimmung des *Thermotoga maritima* L11-Protein in Komplex mit der RNA genutzten, Bedingungen (50 mM,

KP_i, 200 mM KCl pH 6.1).^[21, 23] Das Mg²⁺-freie System ist somit nicht direkt mit dem physiologischen, Mg²⁺-haltigen System vergleichbar und auf diesem System basierende Experimente somit nicht repräsentativ. Die RNA ist nicht oder nur unvollständig „nativ“ gefaltet und bindet so möglicherweise auch nicht effizient an das L11-Protein. Beide Faktoren sind für eine effiziente, hochaffine Thiopeptidbindung in gleicher Weise wichtig.^[7, 33]



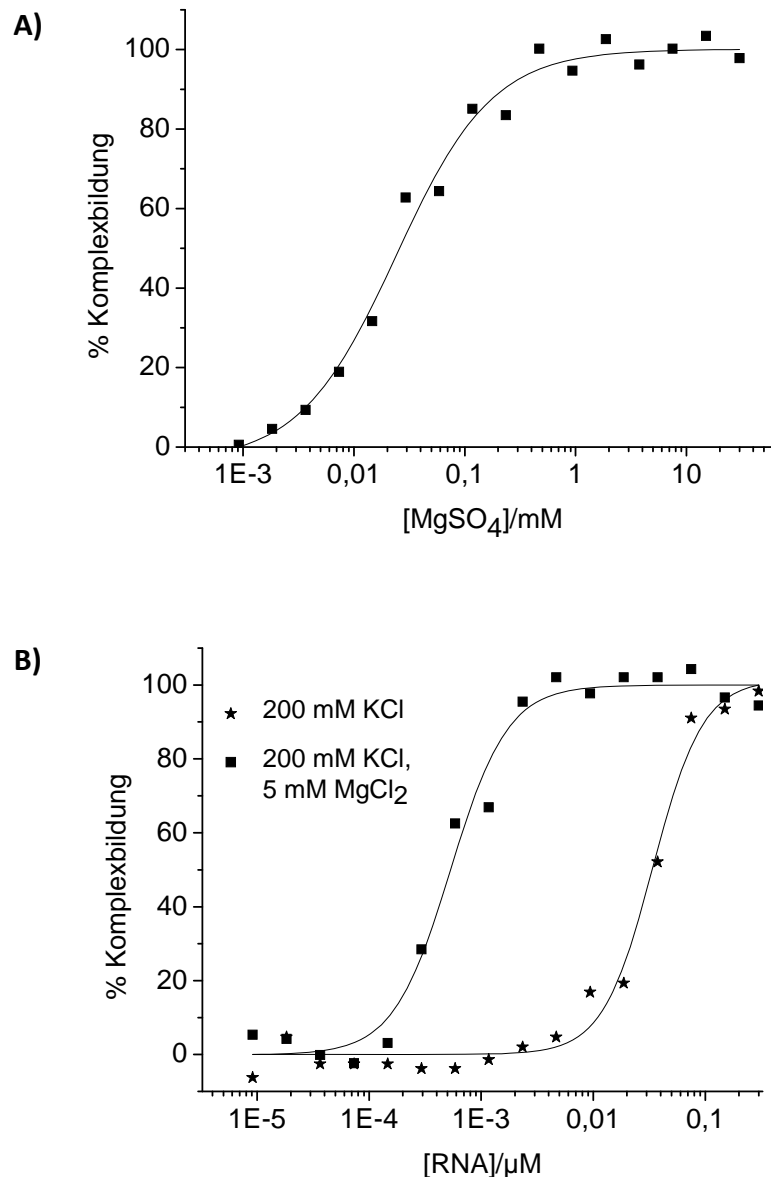


Abbildung 3.16: A) Mg^{2+} -Abhängigkeit der Thiopeptid-Wildtyp 23S rRNA-L11-Komplexformation. Konstante Konzentration von **6** (5 nM), Wildtyp-RNA (5 nM) und *TthL11* (0,6 μM) wurden mit variierenden Konzentration von $MgSO_4$ titriert und die Anisotropieänderung detektiert. B) Titration der Thiostreptonsonde **5** (5 nM) und *TthL11* (0,6 μM) mit Wildtyp-RNA unter hohen Konzentrationen monovalenter Kationen (200 mM K^+) in An- bzw. Abwesenheit von Mg^{2+} (5 mM).

3.4.2 Fluoreszenzanisotropiestudien der Interaktion der Thiostreptonsonde mit 70S Ribosomen

Zum Test der Thiostreptonsondenaffinität an bakterielle 70S Ribosomen, wurden Fluoreszenzanisotropiestudien mit isolierten Ribosomen aus *E. coli* durchgeführt. Die Ribosomen wurden hierzu mittels der klassischen Ultrazentrifugationsmethode (UZ, 136

2.10.17.1) sowie mit einer deutlich schnelleren, kürzlich beschriebenen Affinitätsreinigungsmethode^[34] (2.10.17.2) präpariert (Abbildung 3.17 A).

Beide Präparationsmethoden zeigten ein deutlich vergleichbares Proteinbandenmuster in der SDS-PAGE. Die per Affinitätsreinigung (AR) gereinigten Ribosomen zeigten im Vergleich zur UZ-Präparation deutlich mehr Proteinbanden >30 kDa in der SDS-PAGE. Das AR-Bandenmuster entspricht hierbei sehr stark dem Bandenmuster eines vollständig rekonstituierten *in vitro* Translationssystems, bei dem alle für die Translation benötigten Faktoren rekombinant hergestellt wurden (siehe hierzu z.B. das PURExpress In vitro Protein Synthesis Kit, New England Biolabs).^[35] Da die Affinitätsreinigungsmethode im Vergleich zur UZ-Methode deutlich sanfter ist, wurden bei der Reinigung höchstwahrscheinlich ribosom-assoziierte Faktoren mit isoliert. Aufgrund der Schnelligkeit und Effizienz der AR-Methode wurde diese im Rahmen dieser Arbeit als Standardmethode zur Ribosomenisolierung verwendet.

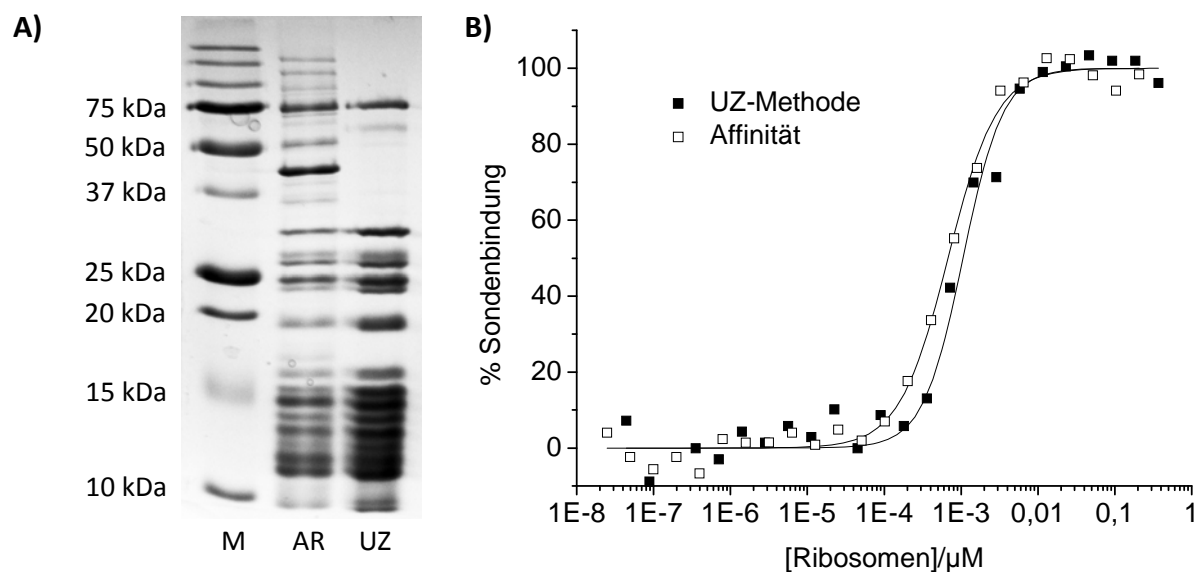


Abbildung 3.17: A) SDS-PAGE (15%) gereinigter *E. coli* Ribosomen. M: Marker; UZ: Ultrazentrifugation; AR: Affinitätsreinigung. Die zusätzlich auftretenden Proteinbanden (>30 kDa) im Fall der AR, sind vermutlich assoziierte ribosomale Faktoren. B) Repräsentative Fluoreszenz-Anisotropiekurven der Bindung der Thioestreptonsonde 6 an die per Ultrazentrifugation (UZ) bzw. affinitätsgereinigten Ribosomen aus *E. coli*, angepasst an die Hill-Funktion.

Die Titration der Sonde 6 mit den *E. coli* Ribosomen aus den zwei Reinigungsmethoden zeigte in beiden Fällen eine konzentrationsabhängige Änderung des Anisotropiesignals (Z-

Faktor^[32] des Bindungsassays 0,88). Die Anpassung der Messdaten an die Hill-Funktion lieferte vergleichbare IC_{50} -Werte von $1,02 \pm 0,12$ nM (UZ-Methode) und $0,68 \pm 0,05$ nM (Affinitätsreinigung). Es handelte sich bei diesen Werten jedoch nicht um absolute Affinitäten von **6** an das Ribosom, da der Einfluss weiterer Protein-Protein- bzw. Protein-RNA-Interaktion auf die Thiopeptid-23S rRNA-L11-Interaktion nicht abgeschätzt werden kann. Zudem wird die untere Detektionsgrenze durch die Minimalkonzentration der Sonde bestimmt. Wenn Affinitäten im sub-nM-Bereich exakt bestimmt werden sollen, müssten in zukünftigen Arbeiten empfindlichere Farbstoffe, z.B. Atto 550, in Betracht gezogen werden.

3.4.3 Fluoreszenzanisotropiestudien der Affinität von Thiopeptidnaturstoffen

Das in 3.4.1 beschriebene System eignete sich neben der Analyse der direkten Thiostreptonsondenbindung an die RNA-L11-Komplexe auch für quantitative Bestimmung der Komplexaffinitäten nicht fluoreszenzmarkierter Thiopeptide. Zur Bestimmung der Affinitäten von Thiopeptidnaturstoffen an Komplexe der Wildtyp 23S rRNA Fragmente und *TthL11* wurden Verdrängungstitrationen der fluoreszenten Sonden durchgeführt. Hierzu wurden jeweils stöchiometrische Komplexe der Sonde **5** oder **6**, des L11-Proteins und der RNA mit variierenden Konzentrationen des gewünschten Thiopeptidliganden titriert. Neben den in Abbildung 3.1 dargestellten Verbindungen wurden zusätzlich die Thiopeptide Promoinducin **4**, Thiotipin **8** und Promothiocin B **9** analysiert (Abbildung 3.18). Die Titrationen zeigten für jeden Naturstoff einen konzentrationsabhängigen Rückgang des Anisotropiesignals, welcher die Verdrängung der Sonde vom Komplex andeutete (Z-Faktor: ^[32] 0,86). Da es sich bei den hier durchgeführten Experimenten um Verdrängungstitrationen handelte, bei denen nicht die Thiopeptidbindung direkt sondern die Verdrängung der fluoreszenten Sonden detektiert wird, werden die bestimmten Affinitäten als scheinbare Affinitäten (K_{app}) dargestellt (Abbildung 3.19). Für Thiostrepton **1** konnte so unter homogenen Gleichgewichtsbedingungen, mit beiden Sonden unabhängig, ein K_{app} von ca. 0,2 nM bestimmt werden, ein Wert ca. 5× niedriger als frühere Abschätzungen der Thiostreptonaffinität von ca. 1 nM.^[4-5, 6b, 6c, 7] Nosiheptid **2** zeigte eine im Vergleich dazu zweifach höhere Affinität von 0,11 nM. Die Affinität des mono-zyklischen Thiopeptids Micrococcin **3** war etwa eine Größenordnung geringer. Das strukturell eng mit **3** verwandte Promothiocin B **9** zeigte hingegen nur mikromolare Affinitäten.

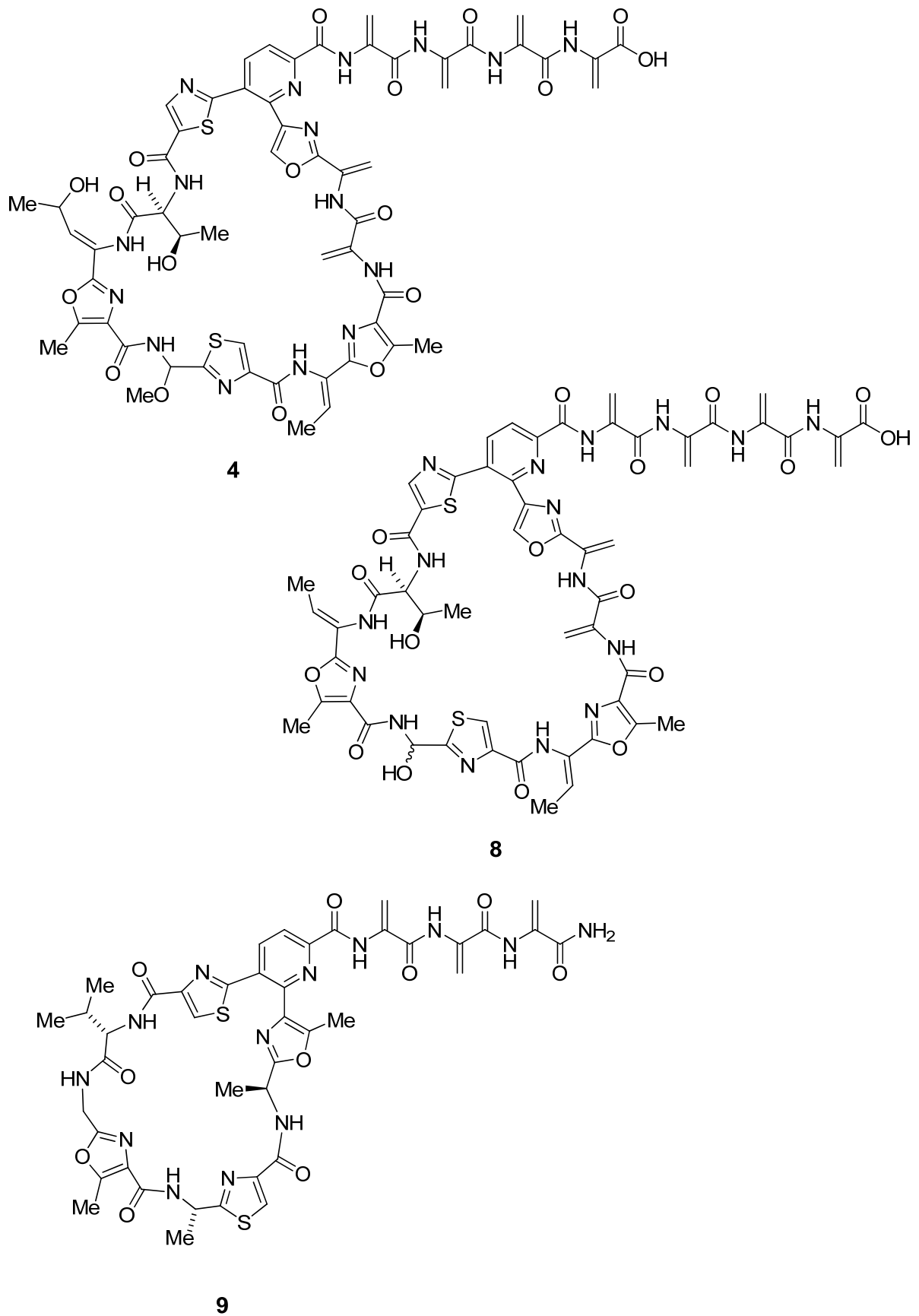
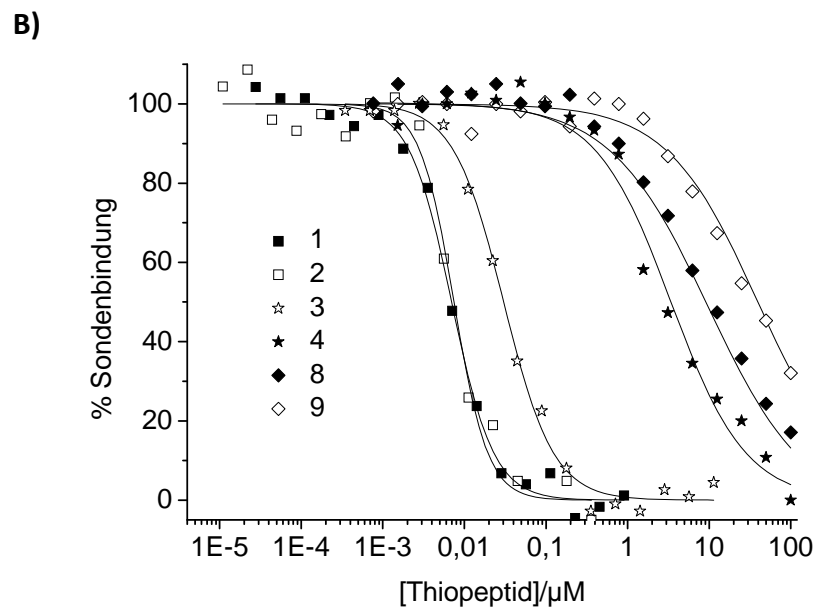
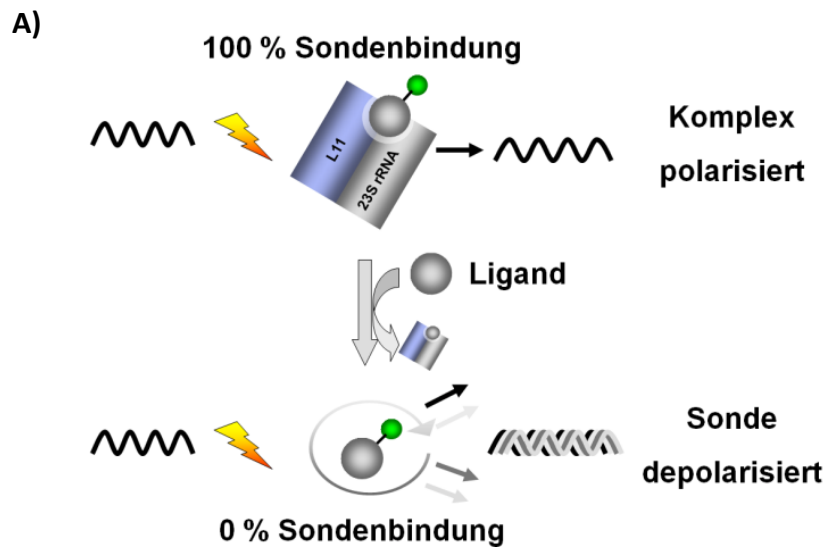


Abbildung 3.18: Chemische Strukturen der Thiopeptide Promioinducin **4**, Thiotipin **8** und Promothiocin B **9**.



C)

Thiopeptid	K_{app}/nM (5)	K_{app}/nM (6)
1	$0,22 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,05$
2	$0,11 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,02$
3	$1,46 \pm 0,11$	$1,73 \pm 0,90$
4	113 ± 13	n.b.
8	182 ± 10	n.b.
9	1040 ± 125	n.b.

Abbildung 3.19: A) Schematische Darstellung des Fluoreszenzanisotropie-Verdrängungsexperiments..
 B) Exemplarische Verdrängungstitrationen der Thiostreptonsonde 5 mit den Thiopeptidnaturstoffen

1-4 und **8-9**, angepasst an die Hill-Funktion. C) Scheinbare Affinitäten der Thiopeptidnaturstoffe auf Grundlage der Verdrängungstitrationen mit **5** bzw. **6**. n.b.: nicht bestimmt.

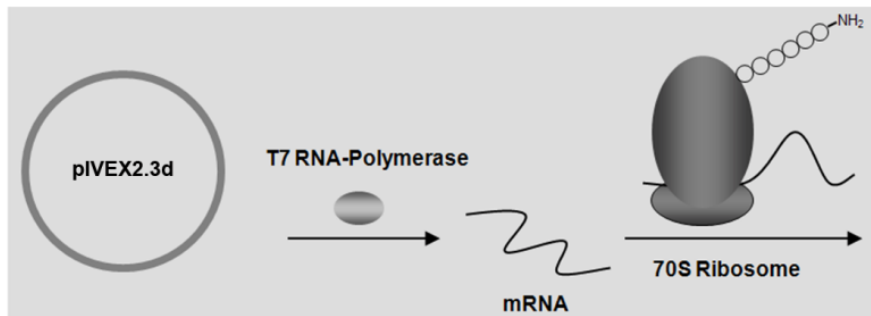
Die beiden größeren Monozyklen Promoinducin **4** und Thiotipin **8** zeigten Affinitäten im mittleren nanomolaren Bereich. Für die Verdrängungstitrationen ist anzumerken, dass diese nur dann erfolgreich waren, wenn Sonde und das Zielthiopeptid zunächst zeitgleich mit dem L11-Protein gemischt und die Komplexbildung im Anschluss durch die Zugabe der RNA induziert wurde. Selbst nach einer 72-stündigen Äquilibrierungsphase war es nicht möglich die Sonde, aus einem präformierten ternären Komplex zu verdrängen. Verdrängungstitrationen mit vollständigen 70S Ribosom waren *per se* nicht möglich. Es kann daher angenommen werden, dass die Affinitäten der Sonden zum Ribosom, noch deutlich höher als an den isolierten Komplex sind.

3.4.4 *In vitro* Inhibition der bakteriellen Proteinbiosynthese durch Thiopeptidnaturstoffe

In Anbetracht des relativ breiten Affinitätsspektrums der Thiopeptidnaturstoffe wurden zur weiteren Charakterisierung, Translationsinhibitionsstudien mit einem kommerziell erhältlichen, *E. coli* Lysat basierten, *in vitro* Transkriptions-Translationssystem durchgeführt (RTS 100 *E. coli* HY Kit, Roche Diagnostics; vgl. 2.14.2). Das eigentlich auf Proteinausbeute optimierte System wurde hierzu zur quantitativen Mitteldurchsatzanalyse (384 Loch-Platten) der Proteinexpression optimiert. Als Indikator der Proteinbiosynthese wurde die Synthese des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) genutzt, welches von einem Kontrollvektor (pIVEX2.3d) des *in vitro* Expressionssystems exprimiert wurde. Die Ziele der Optimierung waren neben einer hohen Quantifizierbarkeit und Reproduzierbarkeit auch eine maximale Ergiebigkeit des relativ teuren kommerziellen Systems. Finale Resultate der Optimierung war eine Steigerung der Reaktionsansätze von 24 Ansätzen á 50 µl auf 600 Ansätze in einem noch handhabbaren Volumen von 10 µl. Das zur Verdünnung gewählte Puffersystem (vgl. 2.14.2.2) sowie eine optimierte Menge des GFP-Vektors pIVEX2.3d von 0,01 µg pro Ansatz erlaubte die Produktion reproduzierbarer Fluoreszenzintensitäten und einem Z-Faktor^[32] von 0,8 bei einer Reaktionsdauer von 1,5 h bei 30°C. Zur vollständigen Ausbildung des Fluorophors musste jedoch noch eine Inkubation von 12 h bei 4°C angeschlossen werden. Eine schematische Darstellung des Assays ist in Abbildung 3.20 A gezeigt. Da es sich bei dem

verwendeten System um ein gekoppeltes *in vitro* Transkriptions-Translationssystem handelte, musste im Rahmen der Translationsinhibitionsstudien zunächst die Inhibition der vorgeschalteten T7-RNA-Polymerase ausgeschlossen werden.

A) gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation von GFP

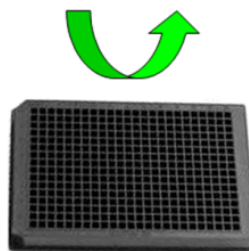


Fluorophor-
Entwicklung

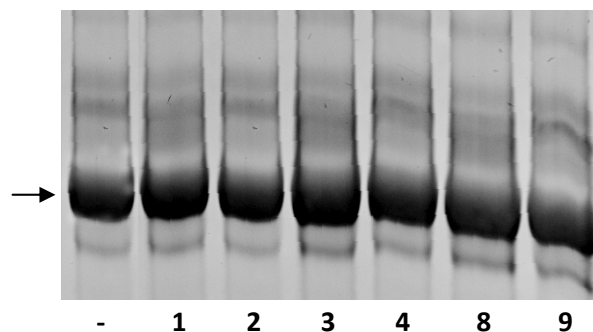


Detektion

395 nm 504 nm



B)



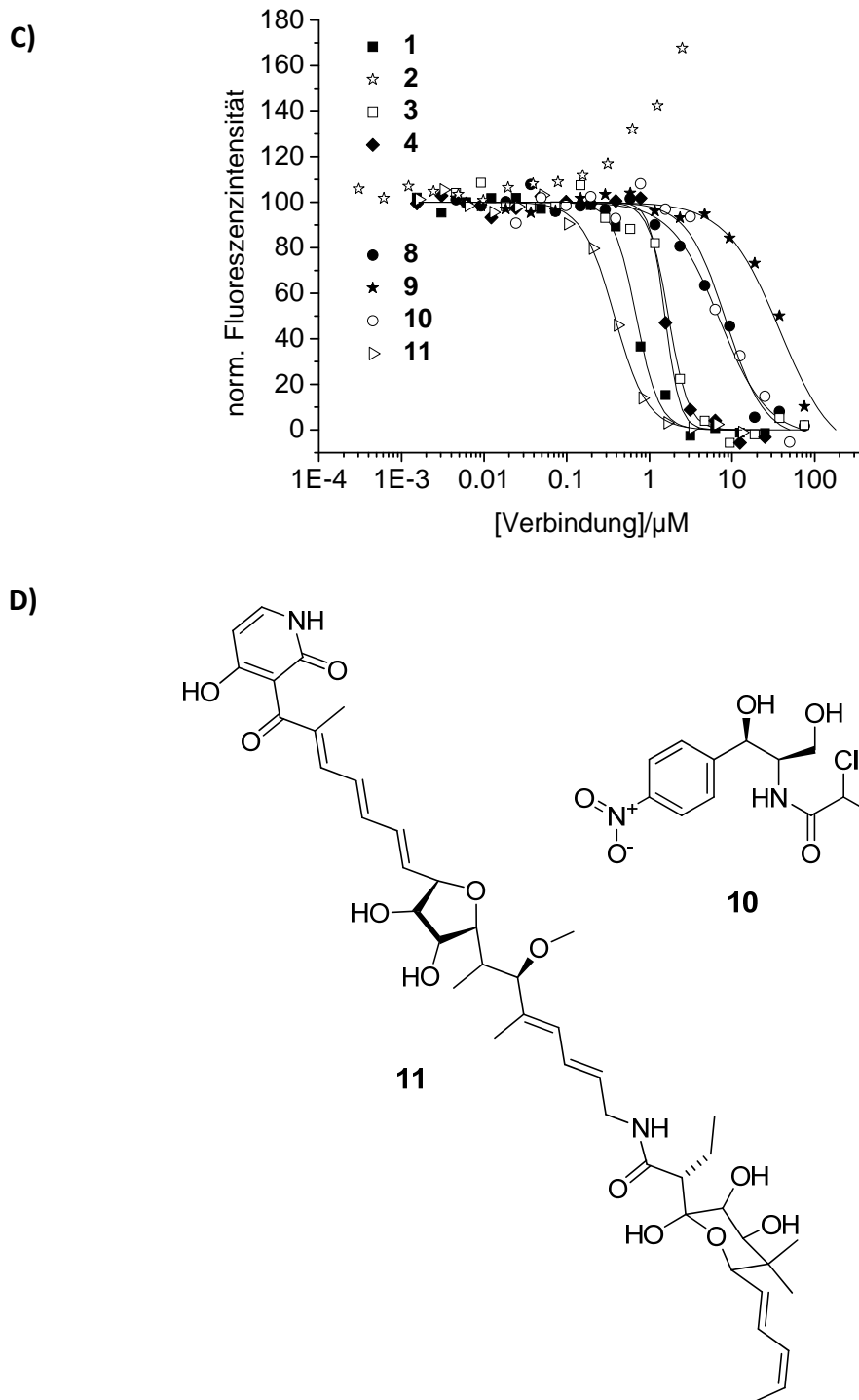


Abbildung 3.20: A) Schematische Illustration des gekoppelten *in vitro* Transkriptions-Translations-Inhibitionssystem. B) 10%ige native PAGE der *in vitro* Transkription (23S rRNA Fragmente) in Anwesenheit von 20 μM der Thiopeptide **1-4** + **8-9**. C) *In vitro* Translations-Inhibitionstitrations mit Thiopeptidnaturstoffen, sowie den bekannten Translationsinhibitoren Chloramphenicol **10** und Kirromycin **11** als Kontrolle, angepasst an die Hill-Funktion. Als Expressionmarker wurde die Fluoreszenz des *in vitro* exprimierten GFPs genutzt. D) Chemische Strukturen der Kontrollverbindungen Chloramphenicol **10** und Kirromycin.

Verbindung	Inhibition $IC_{50}/\mu\text{M}$	Affinität K_{app}/nM
1	$0,69 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,02$
2	n.b.	$0,11 \pm 0,01$
3	$1,69 \pm 0,12$	$1,46 \pm 0,11$
4	$1,54 \pm 0,06$	113 ± 13
8	$7,02 \pm 1,00$	182 ± 10
9	$31,7 \pm 4,50$	1040 ± 125
10	$3,00 \pm 0,50$	-
11	$0,23 \pm 0,11$	-

Tabelle 3.1: IC_{50} -Werte der Translationsinhibition, sowie der Thiopeptid-Zielstrukturaffinitäten aus 3.4.3.

Hierzu wurden separate *in vitro* Transkriptionsreaktionen des *E. coli* 23S rRNA Wildtyp-Fragments (vgl. Kapitel 2.12.1.1 + 3.2.1) in Anwesenheit hoher Konzentrationen (20 μM) der Zielverbindungen durchgeführt. Für die sechs getesteten Thiopeptidnaturstoffe konnte keine Änderung der Bandenintensität (Abb. 3.20 B, Pfeil) und dementsprechend keine Inhibition der T7-RNA-Polymerase detektiert werden.

Alle getesteten Thiopeptide inhibierten das *in vitro* Translationssystem im niederen mikromolaren und nanomolaren Bereich (Tabelle 3.1). Thiostrepton **1**, der stärkste thiopeptidische Inhibitor, zeigt IC_{50} -Wert von 0,7 μM , welcher im Einklang mit den Literaturdaten für ein vergleichbares Mittel- bis Hochdurchsatzsystem basierend auf *E. coli* Zelllysat (0,1-0,65 μM)^[36] sowie eines vollständig rekonstituiertes *E. coli* Expressionssystem (0,6 μM)^[37] war. Für **2** konnte keine Inhibition gemessen werden, da die Verbindung bei den analysierten Wellenlängen (Anregung 395 nm, Emission 504 nm) eine Eigenfluoreszenz aufwies.^[38] Die Monozyklen **3** und **4** zeigten vergleichbare IC_{50} -Werte < 2 μM , (Lit. **3**: 0,3 μM)^[36a] gefolgt von **8** mit einem Wert von 7 μM . Die geringste inhibitorische Aktivität zeigte **9** mit einem IC_{50} von 32 μM . Zur Kontrolle der Validität der über den *in vitro* Assay bestimmten Daten, wurden die bekannten Proteinbiosyntheseinhibitoren Chloramphenicol **10** und Kirromycin^[39] **11** als Referenzverbindung verwendet (Abb. 3.20 D). Für **10** und **11** konnten IC_{50} -Werte von 3 μM (Lit. IC_{50} : 1,5-5 μM)^[40] bzw. 0,23 μM (Lit. IC_{50} : 0,13-0,3 μM)^[36b, 40a] bestimmt werden. Auffällig war in diesem Zusammenhang, dass die Reihenfolge der *in vitro* Aktivität der Thiopeptidnaturstoffe mit der Reihenfolge der entsprechenden

Zielstrukturaffinitäten korrelierte. Die Affinitätsspanne erstreckte sich über drei Größenordnungen (pikomolar bis mikromolar), wohingegen die *in vitro* Inhibitionsspanne nur eine Größenordnung (mikromolar) umfasste.

3.5 Diskussion

Das im Rahmen dieser Studien beschriebene „Gelshift“-System identifizierte deutliche Unterschiede zwischen den 23S rRNA Affinitäten der L11-Proteine des *gram negativen* Darmbakteriums *Escherichia coli* (*EcoL11*) und des hyperthermophilen Bakteriums *Thermus thermophilus* (*TthL11*). Entsprechend einer „natürlichen“ erhöhten ribosomalen RNA-Protein-Komplexstabilität,^[18] konnten ca. 100-200× höhere Affinitäten von *TthL11* an die 23S rRNA detektiert werden als bei *EcoL11*. Darüberhinaus war die Bindung von *TthL11* an die RNA auch bei Raumtemperatur stabil. Vergleichbare Unterschiede der L11-RNA-Affinitäten wurden beim Vergleich des *E. coli* Proteins mit L11 aus dem thermophilen Bakterium *Bacillus stearothermophilus* beschrieben.^[6b, 7] *E. coli* L11 zeigte hier eine ca. 100× schwächere Affinität an die 23S rRNA als das Homolog aus *B. stearothermophilus*. Systematische Studien von Homologen des ribosomalen Proteins S8, wie auch des L7/L12-Stiels aus meso-, thermo- und hyperthermophilen Prokaryoten zeigten auch ca. 100-fache Unterschiede in ihrer rRNA Affinität, welche mit der jeweiligen Wachstumstemperatur des Organismus korrelierten.^[18, 41] Die genaue molekulare Ursache für die erhöhten rRNA-Affinitäten ribosomaler Proteine aus (hyper-)thermophilen Prokaryoten ist jedoch unbekannt. Der Sequenzvergleich des *E. coli* L11-Proteins mit denen aus den thermophilen Bakterien *T. thermophilus*, *Deinococcus radiodurans* und *Thermotoga maritima* (Abbildung 3.21) zeigt in diesem Zusammenhang das der mit der RNA interagierende C-Terminus der Proteine, im Vergleich zum N-Terminus, nur ein geringes Maß an Homologie aufweist. Hierbei zeigt der Vergleich der C-Termini der thermophilen Proteine jedoch eine höhere Ähnlichkeit als der Vergleich dieser mit dem *EcoL11*. Auffällig ist die Abwesenheit der für die thermophilen Proteine konservierten Aminosäuren K109, M112, P113, L115 und vor allem von N116 (*Tth*-Nummerierung) im *E. coli* Protein. Diese Aminosäure (N116) ist der Kristallstruktur des *T. maritima* L11-RNA-Komplexes in eine Vielzahl von H-Brücken involviert und trägt so möglicherweise signifikant zur RNA-Affinität bei.^[10] Der Einfluss der C-terminalen Verlängerung im Fall von *TthL11* und *DraL11* kann nicht abgeschätzt werden, da sich dieser in den verfügbaren Kristallstrukturdaten des *DraL11*-RNA-Komplexes weit entfernt von der RNA befindet.^[3]

Die Anwesenheit von weiteren ribosomalen Proteinen, welche in derselben Binderegion wie auch L11 binden (L10, L7/L12-Stiel), steigert die Affinität von L11 bei mesophilen Bakterien jedoch kooperativ.^[42] Kooperativität spielt im Zusammenhang des Zusammenbaus makromolekularer Komplexe^[43] z.B. bei der prokaryotischen Ribosomenbiogenese, generell eine Schlüsselrolle. So konnte z.B. für die ribosomalen 30S Untereinheit gezeigt werden, dass sich diese *in vitro* hierarchisch und kooperativ selbst zusammensetzt.^[43-44] Auch die Thiopeptid-Zielstruktur-Interaktion hat einen stark kooperativen Charakter. So konnte bereits in einer Vielzahl von Studien dokumentiert werden, dass die Anwesenheit des L11-Proteins bzw. **1**, insbesondere des N-Terminus, die Affinität von **1** bzw. L11 an die rRNA kooperativ verstärkt.^[6a, 6b, 7, 31, 33, 45] Interessanterweise und im Unterschied zu allen bisherigen Studien, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit, sowohl im „Gelshift“-System, im Fluoreszenzanisotropie-System wie auch CD-spektroskopisch trotz ausreichend hoher Mg²⁺-Konzentrationen (5-10 mM), keine Bindung von Thiopeptiden an die „nackte“ RNA wie auch RNA-freies L11-Protein detektiert werden.

```

Tth -MKKVVAVVKLQLPAGKATPAPPVGPALGQHGANIMEFVKAFNAATANMGD-AIVPVEIT 58
Dra -MKKVAGIVVKLQLPAGKATPAPPVGPALGQYGANIMEFTKAFNAQTADKGD-AIIPVEIT 58
Tma MAKKVAAQIKLQLPAGKATPAPPVGPALGQHGVNIMEFCKRFNAETADKAG-MILPVVIT 59
Eco MAKKVQAYVKLQVAAGMANPSPVGPALGQQGVNIMEFCKAFNAKTDSIEKGLPIPVVIT 60
    *** . :***: .** *.:***** * .***** * *** * . :** **
Tth IYADRSFTFVTKTPPASYLIRKAAGLEKGAHKPGREKVGRITWEQVLEIAKQKMPDLNNT 118
Dra IYADRSFTFITKTPPMSYLIRKAAGIGKGSSTPNKAKVGLNWDQVLEIAKTKMPDLNAG 118
Tma VYEDKSFTFI IKTTPASFLLKKAAGIEKGSSEPKRKIVGVTRKQIEEIAKTKMPDLNAN 119
Eco VYADRSFTFVTKTPPAVLLKKAAGIKSGSGKPNKDKVVKISRAQLQEIAQTKAADMTGA 120
    :* *:*****: **** : *::****: .*: * : **::. *: ***: * .*: .
Tth DLEAAARMIAGSARSMGVEVVGAPVVKDA 147
Dra SVEAAANTVAGTARSMGVTVEGGPNA--- 144
Tma SLEAAMKIIIEGTAKSMGIEVVD----- 141
Eco DIEAMTRSIIEGTARSMGLVED----- 141
    .:** . : *:*****:

```

Abbildung 3.21: Sequenzvergleich der L11 Proteine aus *Thermus thermophilus* (*Tth*), *Deinococcus radiodurans* (*Dra*), *Thermotoga maritima* (*Tma*) und *Escherichia coli* (*Eco*). Hochkonservierte Aminosäuren sind durch einen Stern markiert. Markante, von der Sequenz der thermophilen L11-Proteine abweichende, Aminosäuren in der *E. coli* Sequenz sind rot hervorgehoben.

Es kann hierbei jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, dass Thiopeptide eine mikromolare Restaffinität an die RNA besitzen.^[6b, 7, 31] In Anbetracht der relativ schlechten

Löslichkeit von Thiopeptiden in wässrigen Medien (niedriger mikromolare Bereich)^[19] sowie der hohen Thiopeptidtoleranz von L11-defizienten Prokaryoten,^[30, 46] ist eine physiologische Relevanz dieser Interaktion jedoch unwahrscheinlich (siehe hierzu auch Kapitel 5). Eine hochaffine Bindung von Thiopeptiden an die RNA, wurde jedoch in Anwesenheit des L11-Proteins beobachtet. Die Kooperativität der Interaktion von RNA, Protein und Thiopeptid, zeigte sich besonders stark bei der Titration des RNA-Wildtyps mit *EcoL11* im „Gelshift“-Experiment. Hier konnte bei sehr niedrigen RNA-Konzentrationen (nM) nur in Anwesenheit von **1** oder **2** eine „Gelshift“-Formierung beobachtet werden. Dieser kooperative Effekt konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch zu einer Quantifizierung der Zielstrukturaffinität von **1** und **2** im niederen nanomolaren Bereich genutzt werden.

Trotz vielseitiger Studien ist bis heute unverstanden, ob die Bindung von **1** an den L11-RNA-Komplex, mit Konformationsänderungen auf RNA- und/oder Proteinseite einhergeht. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten CD-spektroskopischen Studien lieferten, unter den verwendeten Bedingungen, keine Hinweise über eine thiopeptidinduzierte globale Konformationsänderung der RNA allein. Die Resultate schlossen jedoch minimale thiopeptidinduzierte Strukturänderungen auf Nukleobasenebene nicht aus, da diese CD-spektroskopisch nicht erfassbar sind. Tatsächlich wurden Indizien für solche minimalen Strukturänderungen im Rahmen von „RNA footprinting“-Studien der 23S rRNA-Thiostrepton-Interaktion gefunden. Diese erstrecken sich interessanterweise ausschließlich auf RNA „stem-loop“-Bereiche, welche sich in der Nähe der postulierten Thiopeptidbindestelle befinden.^[22] Auch das freie L11-Protein zeigte keine, durch die Zugabe von **1** induzierbaren Konformationsänderungen. Interessanterweise, zeigten Komplexe von Wildtyp-RNA und *TthL11* in Anwesenheit von **1** charakteristische und konzentrationsabhängige Änderung des ihres CD-Spektrums, ebenfalls wieder ein Indiz für die hohe Kooperativität der Interaktion (*vide supra*). Diese Strukturänderungen gehen möglicherweise mit einer deutlichen Stabilisierung des ternären Komplexes im Vergleich zum RNA-Proteinkomplex einher. Indizien hierfür lieferten bereits Studien von Xing *et al.*^[31] in welchen eine 100-200× höhere thermale Stabilität des ternären Komplexes im Vergleich zu RNA-Proteinkomplex dokumentiert wurde. NMR-Studien der Konformationen von L11 im Komplex mit der 23S rRNA bzw. im Komplex mit RNA und **1** zeigten darüberhinaus eine Reorientierung des Protein N-Terminus nach der Thiopeptidbindung an den Protein-RNA-Komplex. Der N-Terminus wird hierdurch näher an die RNA gebracht und verändert oder stabilisiert so

möglichweise zusätzlich deren Konformation.^[23] Es jedoch ist anzumerken, dass diese NMR-Studien in einem Puffersystem ohne Mg^{2+} durchgeführt wurden, da Mg^{2+} einen negativen Effekt auf die Spektrenqualität aufwies. Zusätzlich wurden ausschließlich Strukturänderungen des L11-Proteins analysiert^[23] Mg^{2+} spielt eine generell wichtige Rolle für die Faltung und Stabilisierung von RNA-Strukturen^[16] und somit auch entscheidende Rolle für die Stabilität des ternären Komplexes.^[31] Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wiesen darauf hin, dass die für die hochaffine Thiopeptidinteraktion benötigte Tertiärstruktur des rRNA-Fragments im L11-RNA-Komplex nur in Anwesenheit ausreichender Konzentration (5-10 mM) dieses divalenten Kations ausgebildet bzw. stabilisiert werden konnte. Es wurde in diesem Zusammenhang mehrfach postuliert, dass hohe Konzentrationen monovalenter Kationen (K^+) ebenfalls dazu in der Lage sind diese Tertiärstruktur in Abwesenheit von Mg^{2+} zu stabilisieren.^[21, 23, 33] Bindungsexperimente mit der Thiostreptonsonde **6** unter Mg^{2+} -freien Bedingungen (den Bedingungen der NMR-Studie^[23] entsprechend), zeigten jedoch eine 100-fach schwächere Bindung der Sonde. Die unter diesen Bedingungen eingenommene Konformation der RNA, oder möglicherweise auch der Bindemodus des Thiopeptids, scheinen unter diesen Bedingungen demnach nicht „natürlich“ und für eine effiziente Thiopeptidbindung nur sub-optimal zu sein. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit präsentierten CD-Titrations des L11-RNA-Komplexes mit **1**, wurden generell in Anwesenheit von 10 mM $MgCl_2$ durchgeführt. Die Änderungen der Struktur von L11 und auch RNA wurden jedoch auch hier detektiert. Die Betrachtung RNA-Protein-CD-Summenspektrums erlaubt jedoch keine genaue Zuordnung möglicher Konformationsänderungen. Der Vergleich der Kristallstrukturdaten des isolierten L11-23S rRNA-Komplexes^[10] und der Thiopeptid-gebundenen Version aus der Kristallstruktur der ribosomalen 50S Untereinheit im Komplex mit **1** oder **2**,^[3] zeigt wiederum keine großflächigen, Thiopeptid-induzierten Konformationsänderungen von L11 oder RNA (Abbildung 3.22). Ein Nachteil der Kristallstruktur des ternären Komplexes ist jedoch, dass es sich um „Soaking“-Komplexe handelt, bei denen der Thiopeptidligand nachträglich in Vor-Kristalle der 50S Untereinheit eingebracht wurde.^[3] Bindungsinduzierte Konformationsänderungen, wie im NMR-Experiment angedeutet,^[23] sind so nicht mehr möglich. Ein genauerer Einblick in mögliche Thiopeptid-induzierte Konformationsänderungen des ternären Komplexes ist möglicherweise über eine Ko-Kristallisation des ternären Komplexes oder über geeignete Methoden in Lösung, wie z.B. Affinitätsmarkierung,

erreichbar. Diese Aspekte sind u.a. das Thema des 6. Kapitels der vorliegenden Arbeit und werden in diesem Zusammenhang tiefergehend analysiert und diskutiert.

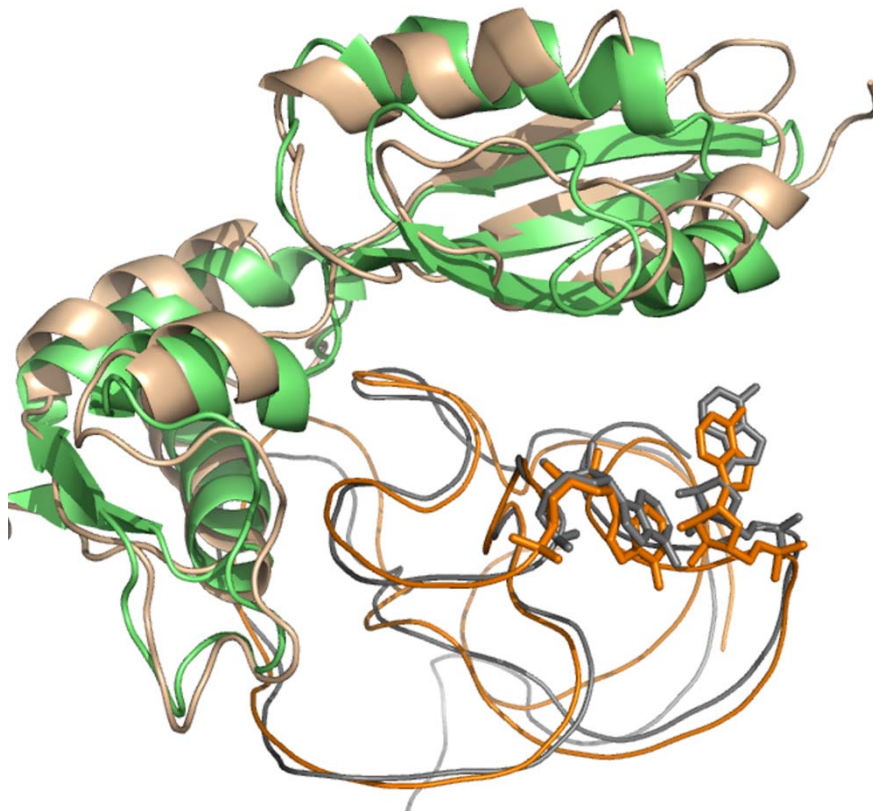


Abbildung 3.22: Überlagerung der Kristallstrukturdaten des isolierten L11-23S rRNA-Komplexes (L11: hellbraun; RNA: grau; PDB: 1mms)^[10] und des L11-23S rRNA-Komplexes aus der ribosomalen 50S Untereinheit im Komplex mit **1** (L11: grün; RNA: orange; PDB: 3cf5).^[3] Die Nucleobasen A1067 (l) und A1095 (r) sind hervorgehoben.

Die fluoreszenten Thiostreptonsonden **5+6** ^[19, 30] erwiesen sich als wertvolle Werkzeugverbindungen für die Analyse der Thiopeptid-RNA-L11-Interaktion. Neben der Detektion ihrer Bindung an RNA-Protein-Komplexe und intakter 70S Ribosomen, erlaubten sie eine hochsensitive und quantitative Bestimmung der Komplex-Affinitäten verschiedener Thiopeptidnaturstoffe auf Basis eines Fluoreszenzanisotropie-Verdrängungsassays im Mitteldurchsatzformat (384 Loch-Platten). Die Sonden zeigten subnanomolare (**5**: 0,33 nM; **6**: 0,14 nM) Affinitäten an den 23S rRNA-L11-Komplex, eine bemerkenswert hohe Zielstrukturaffinität für einen RNA-Liganden. Für den Naturstoff Thiostrepton **1** konnte über beide Sonden eine Komplexaffinität von 0,2 nM bestimmt werden. Dieser Wert konkretisiert frühere Abschätzungen.^[4-7] Die geringe Abweichung der Sondenaffinitäten von der Affinität

des korrespondierenden Naturstoffs Thiostrepton verdeutlichte, dass die Modifizierung des Thiostreptongrundgerüst am Dehydroaminosäure-Schwanz die Zielstrukturaffinität nicht wesentlich beeinflusst und zusätzlich, dass der Molekülschwanz keine Bedeutung für die Interaktion mit der Zielstruktur besitzt. Auch die Linkerlänge hatte einen nur unwesentlichen Einfluss auf die Zielstrukturaffinität, was einen gleichartigen Bindemodus beider Sonden und **1** suggeriert. Weitere Vertreter der Thiopeptidfamilie zeigten ein breit gefächertes Affinitätsspektrum an den RNA-L11 Komplex welches sich vom niedrigen mikromolaren (**9**) bis niedrigen pikomolaren Bereich (**2**) erstreckte. Auffällig war in diesem Zusammenhang das nur die Thiopeptid-Bizyklen **1-2** die subnanomolare Zielstrukturaffinität erreichten. Die molekularen Ursachen dieser drastischen Affinitätsunterschiede der Thiopeptidnaturstoffe wurden im Rahmen dieser Arbeit nochmals gesondert untersucht und werden in Kapitel 5 dargelegt und diskutiert. Die Analyse der Inhibierung der prokaryotischen Translationsmaschinerie durch die Thiopeptidnaturstoffe, zeigte eine Aktivitätsreihenfolge der einzelnen Verbindungen, welche in etwa auch mit der Reihenfolge ihrer Zielstrukturaffinitäten korrelierte. Jedoch waren die im Fall der Affinitäten beobachteten, drastischen Unterschiede zwischen den Naturstoffen, bei der Translationsinhibition deutlich weniger stark ausgeprägt. Alle Verbindungen inhibierten das System im niederen mikromolaren Bereich. Eine Erklärung für diese Resultate wäre, dass die Aktivität einiger dieser Verbindungen (z.B. **4, 8 & 9**) durch unterschiedliche Bindungsmodi an den 23S rRNA-L11-Komplex begründet ist (siehe hierzu auch Kapitel 5 + 6). Viel grundlegender ist jedoch, dass die Konzentration der Ribosomen im Translationssystem mikromolar ist. Eine vollständige Inhibition der Translation sollte demnach bei hochaffinen Liganden bei einer vollständigen Sättigung d.h. einer ~1:1 Stöchiometrie von Ribosom und Inhibitor *ergo* einer mikromolaren Konzentration auftreten. Selbst das wenig-affinste Thiopeptid Promothiocin B **9** zeigt eine Zielstruktur-Affinität von 1 μ M. Bei der eingesetzten mikromolaren Ribosomen-Konzentration, sollte somit auch für diese Verbindung eine Absättigung der Ribosomen im niederen mikromolaren Bereich zu erwarten sein. Auch eine Interaktion der stark lipophilen Thiopeptide mit weiteren Ribosomen-Bestandteilen oder ribosomalen Faktoren ist denkbar. Bei der Betrachtung der Strukturen von **4** und **8** fällt zusätzlich auf, dass diese strukturell sehr ähnlich zu GE2270A sind.^[1a] Dieses Thiopeptid bindet im Unterschied zu dem Großteil der Thiopeptidantibiotika direkt an den Elongationsfaktor EF-Tu und blockiert so die Bindung

der der tRNA an den Faktor.^[47] Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die *in vitro* Aktivität von **4** und **8** zum Teil auch durch eine Bindung an EF-Tu bedingt ist.

Thiopeptide interferieren mit der Aktivität ribosomaler GTPasen und hier vor allem mit dem Elongationsfaktor EF-G. Auch dieser Faktor liegt in der bakteriellen Zelle als auch im *in vitro* Translationssystem in mikromolaren Konzentrationen vor. Rodnina *et al.* konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass bei einem stöchiometrischen Verhältnis von EF-G und Ribosom im mikromolaren Bereich, **1** zwar in der Lage ist die Elongation sehr stark zu verlangsamen (Translokation, P_i-Freisetzung sowie EF-G-Freisetzung), jedoch nicht vollständig zu arretieren.^[2, 48] In der Tat ist die ribosomale Elongation, wenn auch sehr langsam, sogar ohne ribosomale Faktoren möglich.^[49] Für den lebenden Organismus bedeutet diese Thiopeptid-induzierte Verlangsamung, dass essentielle Proteine nicht in Kürze und angepasst an die Lebensbedingungen, produziert werden können. Die Folge ist ein stark verlangsamtes Wachstum des Organismus bei niedrigen Konzentrationen hochaffiner Verbindungen (bakteriostatische Wirkung), sowie später bzw. bei höheren Wirkstoffkonzentrationen, auch ein Absterben des Organismus (bakterizide Wirkung).^[50] Die zellfreie *in vitro* Translation ist im Vergleich zur *in vivo* Situation generell 100-1000-fach langsamer. Eine weitere Verlangsamung der Translationsmaschinerie durch die Bindung von **1** hat unter diesen Umständen möglicherweise nur einen untergeordneten Einfluss auf die ribosomale Gesamtaktivität, wenn **1** einen ribosomalen Prozess verlangsamt, der nicht geschwindigkeitsbestimmend ist. Auch dieser Sachverhalt könnte die „nur“ mikromolare inhibitorische Aktivität von **1**, trotz pikomolarer Zielstruktur-Affinitäten, im zellfreien Translationssystem erklären

Die hier belegte extrem hohe Affinität einiger Thiopeptide an die ribosomale Zielstruktur ruft die Frage nach den molekularen Ursachen hervor. Wertvolle Hinweise zur Beantwortung dieser Frage lieferten im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Studien mit semisynthetischen Thiopeptidderivaten, gezielte Mutantenstudien sowie biochemische/strukturelle Studien, welche in den Kapiteln 4-6 dargestellt und diskutiert werden.

3.6 Referenzen

- [1] a) M. C. Bagley, J. W. Dale, E. A. Merritt, X. Xiong, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 685-714; b) R. A. Hughes, C. J. Moody, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8076-8101; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 7930-7954.
- [2] M. V. Rodnina, A. Savelsbergh, N. B. Matassova, V. I. Katunin, Y. P. Semenov, W. Wintermeyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1999**, *96*, 9586-9590.
- [3] J. M. Harms, D. N. Wilson, F. Schluenzen, S. R. Connell, T. Stachelhaus, Z. Zaborowska, C. M. Spahn, P. Fucini, *Mol. Cell.* **2008**, *30*, 26-38.
- [4] S. Pestka, D. Weiss, R. Vince, *Anal. Biochem.* **1976**, *71*, 137-142.
- [5] E. Cundliffe, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, *44*, 912-917.
- [6] a) J. Thompson, E. Cundliffe, M. Stark, *Eur. J. Biochem.* **1979**, *98*, 261-265; b) P. C. Ryan, M. Lu, D. E. Draper, *J. Mol. Biol.* **1991**, *221*, 1257-1268; c) D. E. Draper, Y. Xing, L. G. Laing, *J. Mol. Biol.* **1995**, *249*, 231-238.
- [7] S. L. Bausch, E. Poliakova, D. E. Draper, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 29956-29963.
- [8] F. J. Schmidt, J. Thompson, K. Lee, J. Dijk, E. Cundliffe, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 12301-12305.
- [9] J. Thompson, E. Cundliffe, *Biochimie* **1991**, *73*, 1131-1135.
- [10] B. T. Wimberly, R. Guymon, J. P. McCutcheon, S. W. White, V. Ramakrishnan, *Cell* **1999**, *97*, 491-502.
- [11] a) B. Weisblum, V. Demohn, *J. Bacteriol.* **1970**, *101*, 1073-1075; b) B. Weisblum, V. Demohn, *FEBS Lett.* **1970**, *11*, 149-152.
- [12] A. H. Delcour, *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1794*, 808-816.
- [13] M. J. Stark, E. Cundliffe, J. Dijk, G. Stoffler, *Mol. Gen. Genet.* **1980**, *180*, 11-15.
- [14] B. A. Maguire, R. A. Zimmermann, *Cell* **2001**, *104*, 813-816.
- [15] M. Gaudreault, M. E. Gingras, M. Lessard, S. Leclerc, S. L. Guerin, *Methods Mol. Biol.* **2009**, *543*, 15-35.
- [16] a) D. E. Draper, D. Grilley, A. M. Soto, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 221-243; b) D. E. Draper, *Biophys. J.* **2008**, *95*, 5489-5495.
- [17] R. Schroeder, R. Grossberger, A. Pichler, C. Waldsich, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 296-300.
- [18] D. Shcherbakov, M. Dontsova, M. Tribus, M. Garber, W. Piendl, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5800-5814.
- [19] S. Schoof, S. Baumann, B. Ellinger, H. D. Arndt, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 242-245.
- [20] G. D. Fasman, *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules.*, Plenum Press New York, **1996**.
- [21] S. Ilin, A. Hoskins, O. Ohlenschlager, H. R. Jonker, H. Schwalbe, J. Wöhnert, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1611-1618.
- [22] W. S. Bowen, N. Van Dyke, E. J. Murgola, J. S. Lodmell, W. E. Hill, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 2934-2943.
- [23] H. R. Jonker, S. Ilin, S. K. Grimm, J. Wöhnert, H. Schwalbe, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 441-454.
- [24] a) L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142-155; b) M. Hof, R. Hutterer, V. Fidler, *Fluorescence spectroscopy in biology : advanced methods and their applications to membranes, proteins, DNA, and cells*, Springer, Berlin ; New York, **2005**.
- [25] a) J. Wang, J. Xie, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8738-8739; b) L. Wang, J. Xie, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2006**, *35*, 225-249; c) A. R. Katritzky, T. Narindoshvili, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 627-634.
- [26] D. C. Ward, E. Reich, L. Stryer, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 1228-1237.
- [27] C. Z. Hotz, *Methods Mol. Biol.* **2005**, *303*, 1-17.
- [28] a) O. Shimomura, *J. Microsc.* **2005**, *217*, 1-15; b) M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher, *Science* **1994**, *263*, 802-805.
- [29] S. Schoof, Dissertation, TU Dortmund (Dortmund), **2010**.

- [30] S. Baumann, S. Schoof, M. Bolten, C. Haering, M. Tagaki, K. Shin-Ya, H. D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6973-6981.
- [31] Y. Xing, D. E. Draper, *Biochemistry* **1996**, *35*, 1581-1588.
- [32] a) J. H. Zhang, T. D. Chung, K. R. Oldenburg, *J. Biomol. Screen.* **1999**, *4*, 67-73; b) Y. Sui, Z. Wu, *J. Biomol. Screen.* **2007**, *12*, 229-234.
- [33] L. B. Blyn, L. M. Risen, R. H. Griffey, D. E. Draper, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 1778-1784.
- [34] B. A. Maguire, L. M. Wondrack, L. G. Contillo, Z. Xu, *RNA* **2008**, *14*, 188-195.
- [35] Y. Shimizu, A. Inoue, Y. Tomari, T. Suzuki, T. Yokogawa, K. Nishikawa, T. Ueda, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 751-755.
- [36] a) G. Lentzen, R. Klinck, N. Matassova, F. Aboul-ela, A. I. Murchie, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 769-778; b) I. Kariv, H. Cao, P. D. Marvil, E. V. Bobkova, Y. E. Bukhtiyarov, Y. P. Yan, U. Patel, L. Coudurier, T. D. Chung, K. R. Oldenburg, *J. Biomol. Screen.* **2001**, *6*, 233-243.
- [37] L. Zhang, N. C. Ging, T. Komoda, T. Hanada, T. Suzuki, K. Watanabe, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 6423-6427.
- [38] F. Benazet, M. Cartier, J. Florent, C. Godard, G. Jung, J. Lunel, D. Mancy, C. Pascal, J. Renaut, P. Tarridec, J. Theilleux, R. Tissier, M. Dubost, L. Ninet, *Experientia* **1980**, *36*, 414-416.
- [39] H. Wolf, G. Chinali, A. Parmeggiani, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1974**, *71*, 4910-4914.
- [40] a) Y. Zhou, Z. Sun, J. M. Froelich, T. Hermann, D. Wall, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5451-5456; b) R. W. Murray, E. P. Melchior, J. C. Hagadorn, K. R. Marotti, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 1900-1904.
- [41] T. Gruber, C. Kohrer, B. Lung, D. Shcherbakov, W. Piendl, *FEBS Lett.* **2003**, *549*, 123-128.
- [42] G. Rosendahl, S. Douthwaite, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 2396-2403.
- [43] J. R. Williamson, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 458-465.
- [44] a) W. A. Held, B. Ballou, S. Mizushima, M. Nomura, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 3103-3111; b) T. Powers, G. Daubresse, H. F. Noller, *J. Mol. Biol.* **1993**, *232*, 362-374; c) M. W. Talkington, G. Siuzdak, J. R. Williamson, *Nature* **2005**, *438*, 628-632; d) M. I. Recht, J. R. Williamson, *J. Mol. Biol.* **2004**, *344*, 395-407.
- [45] M. J. Rogers, Y. V. Bukhman, T. F. McCutchan, D. E. Draper, *RNA* **1997**, *3*, 815-820.
- [46] S. Zhang, J. M. Scott, W. G. Haldenwang, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 2316-2321.
- [47] A. Parmeggiani, I. M. Krab, S. Okamura, R. C. Nielsen, J. Nyborg, P. Nissen, *Biochemistry* **2006**, *45*, 6846-6857.
- [48] H. Stark, M. V. Rodnina, H. J. Wieden, M. van Heel, W. Wintermeyer, *Cell* **2000**, *100*, 301-309.
- [49] P. Gonzalo, J. P. Reboud, *Biol. Cell.* **2003**, *95*, 179-193.
- [50] D. N. Wilson, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *44*, 393-433.

Kapitel 4

Bioanalytische Studien semi- und totalsynthetischer Thiopeptidderivate

Teile dieses Kapitels wurden bereits publiziert:

1. S. Schoof, S. Baumann, B. Ellinger, H. D. Arndt, *ChemBiochem* **2009**, *10*, 242.
2. H. -D. Arndt, S. Schoof, S. Baumann, B. Ellinger, *Derivatives of Thiostrepton* (TU Dortmund) *PCT/EP2009/001948*
3. H. R. A. Jonker, S. Baumann, A. Wolf, S. Schoof, F. Hiller, K. W. Schulte, K. N. Kirschner, H. Schwalbe, H. -D. Arndt, **2010**, *Manuskript in Begutachtung*

4.1 Einleitung

Naturstoffe spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung neuer Therapeutika. Die Herstellung von Molekülen für biologische bzw. pharmazeutische Fragestellungen verlangt jedoch oft die Entwicklung und Anwendung neuer Synthesekonzepte. Für die Synthese großer, komplexer Moleküle können in diesem Zusammenhang sowohl biologische als auch chemische Methoden genutzt werden. Trotz ihrer bemerkenswerten antibakteriellen *in vitro* Wirksamkeit,^[1] existiert, neben der Anwendung von Thiopeptidantibiotika in der Tiermast und Veterinärmedizin, noch keine Humanapplikation. Der primäre Grund hierfür ist das unvorteilhafte pharmakologische Profil dieser Naturstoffe, nämlich die schlechte Wasserlöslichkeit und Bioverfügbarkeit, sowie das beträchtliche Molekulargewicht (>1 kDa). Darüberhinaus ist das Pharmakophor d.h. die für die biologische Wirkung dieser Substanzen verantwortlichen Molekül(struktur-)eigenschaften nicht bekannt.^[2] Eine Option zur Bewältigung dieser Nachteile ist die gezielte Synthese von Thiopeptidanaloga mit verbesserten physikochemischen Eigenschaften durch die Manipulation der Biosynthese,^[3] Semisynthese^[4] bzw. chemische Totalsynthese.^[5] Die Synthese von Analoga ermöglicht darüberhinaus die Identifikation und das Studium der, für die Zielstruktur-Interaktion wichtigen, Molekülbausteine d.h. die Analyse der so genannten Struktur-Aktivität-Beziehung (*Structure-Activity-Relationship, SAR*). Das „Biosynthetic Engineering“ stellt eine elegante Methode zur Modifikation von Naturstoffen dar, da es Biosynthesemaschinerie selbst zur Manipulation der Naturstoffe nutzt. Hierbei werden die in die Biosynthese involvierten Enzyme durch *in vitro* Mutagenese optimiert und damit vorhersehbare Modifikationen des Naturstoffs ermöglicht, z.B. die Einführung chemisch-reaktiver Gruppen für semisynthetische Modifikationen. Die Grundvoraussetzung für diese Methode ist jedoch die Kenntnis der vollständigen Biosynthesemaschinerie. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war der Biosynthesemechanismus von Thiopeptiden nicht bekannt. Erst Anfang 2009 wurden die ersten Thiopeptid-Biosynthesesysteme identifiziert und mittlerweile zum Teil auch schon erfolgreich modifiziert. Interessanterweise werden Thiopeptide ausgehend von ribosomal synthetisierten Präpeptiden hergestellt, welche posttranslational trunziert und modifiziert werden.^[4c, 4d, 6]

Das natürliche Thiopeptidgrundgerüst selbst besitzt bereits eine Vielzahl chemisch reaktiver bzw. modifizierbarer Gruppen die als Angriffspunkt für die chemische Semisynthese genutzt werden können.^[4h, 7] Die Semisynthese setzt jedoch gleichzeitig auch voraus, dass der

Naturstoff in großen Mengen verfügbar sein muss. Das durch Fermentation in großen Mengen produzierbare und kommerziell erhältliche Thiostrepton **1** stellt in diesem Zusammenhang einen besonders attraktiven Ausgangspunkt dar.^[8] Im Rahmen der Dissertation von Dipl. Biochem. Sebastian Schoof^[9] wurde Thiostrepton für die Semisyntese von Analoga nutzbar gemacht. Eine Übersicht der Modifizierungsmöglichkeiten ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Die biologische Analyse der hierdurch hergestellten Semisyntheseprodukte ist das Thema dieses Kapitels. Neben der Bereitstellung physikochemisch optimierter Verbindungen, lieferte die Semisyntese wertvolle Werkzeugverbindungen für das grundlegende chemisch-biologische Studium der Wirkungsweise von Thiopeptidantibiotika z.B. die fluoreszenten Thiostreptonsonden **5+6** (Kapitel 3-5).^[1c, 10]

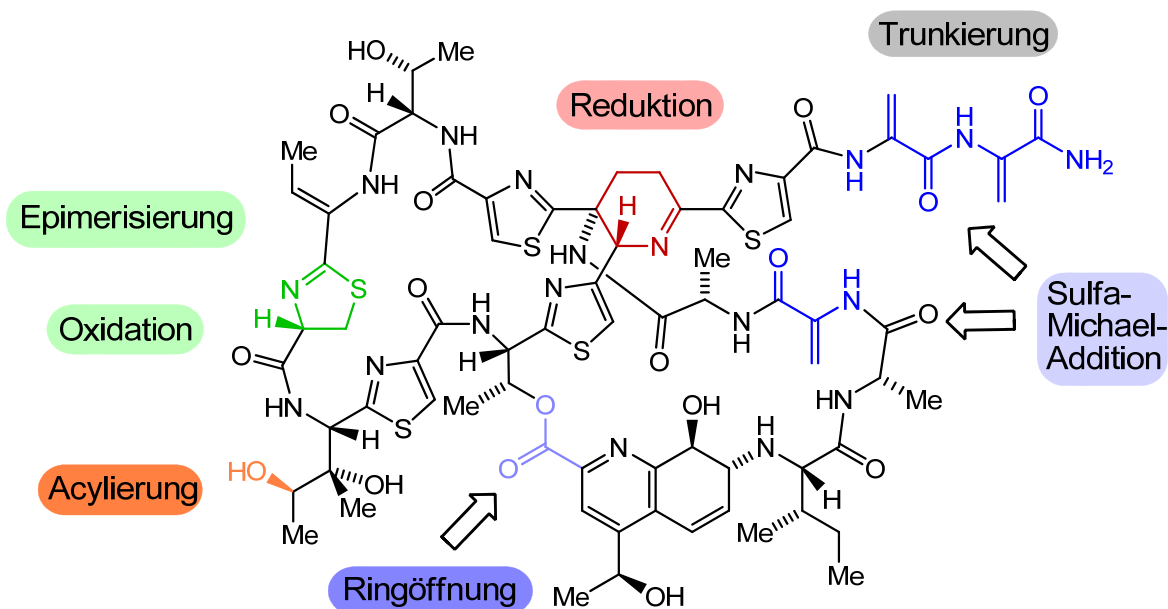


Abbildung 4.1: Übersicht semisyntetisch-modifizierbarer Gruppen des Thiopeptidnaturstoffs Thiostrepton. Die dargestellten Transformationen wurden semisyntetisch erzeugt und biologisch charakterisiert.^[1c, 10a, 11]

Die chemische Totalsynthese stellt die fundamentalste und gleichzeitig auch aufwendigste Methode zur chemischen Modifizierung dar, da der Naturstoff von Grund auf neu synthetisiert wird.^[5] Vor allem in chemischer Hinsicht ist die Totalsynthese höchst attraktiv, da sie eine Triebkraft zur Entwicklung neuer und leistungsfähiger chemischer Synthesemethoden darstellt. Chemisch-biologisch erlaubt die Totalsynthese eine Diversifizierung des interessierenden Moleküls an potentiell jeder gewünschten Position und

darüberhinaus die Herstellung von Molekülfragmenten sowie der Analyse ihrer biologischen Grundaktivität, die im Fall des „Biosynthetic Engineering“ sowie der Semisynthese nicht, oder nur schwer, möglich ist. Ein physikochemischer Nachteil von Thiopeptidantibiotika ist deren relativ großes Molekulargewicht >1 kDa, sowie die fehlende Kenntnis des Pharmakophors.^[1a] Ein totalsynthetischer Ansatz kann in diesem Zusammenhang wertvolle Information bezüglich des Thiopeptid-Pharmakophors liefern und so möglicherweise Wege zur Entwicklung potenter und kleinerer Liganden für die ribosomale Zielstruktur aufzeigen. Im Arbeitskreis von Dr. Hans-Dieter Arndt wurde im Rahmen der Dissertationen von Dr. Matthias Riedrich^[12] und Dr. Jin-Yong Lu^[13] die Totalsynthese des Thiopeptidnaturstoffs Nosiheptid **2** bearbeitet.^[14] Die biologische Aktivität einiger Fragmente wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft.

4.2 Semisynthetische Thiostrepton-Derivate

4.2.1 Verkürzung und Thiol-Michael-Monoaddukte im azyklischen Bereich

Ein Charakteristikum der Thiopeptidnaturstoffe ist das Vorhandensein einer oder mehrerer Dehydroaminosäuren im Molekülgrundgerüst.^[1a] Thiostrepton **1** zeigt hier vier Dehydroaminosäuren, nämlich zwei Dehydroalanin-Einheiten (DHA1+2) im azyklischen Molekülschwanz, eine Dehydrobutyrin-Einheit im ersten Makrozyklus (A-Ring) sowie ein weiteres Dehydroalanin im zweiten Makrozyklus (B-Ring, DHA3, Abbildung 4.2). Die Dehydroalanin-Einheiten konnten im Rahmen der Dissertation von Dipl. Biochem. Sebastian Schoof für semisynthetische Modifizierungen durch Thiol-Michael-Additionen genutzt werden.^[1c, 15] Hierbei wurden vor allem die zwei Dehydroalanin-Einheiten im azyklischen Molekülschwanz als hochreaktiv identifiziert.^[9] Zur Erhöhung der Regioselektivität der Reaktion wurden diese Dehydroalanine stufenweise entfernt und lieferten so die Derivate **12** und **13**.^[1c, 4g, 16] Ausgehend von **12** konnten so beliebige Thiole selektiv an das verbleibende Dehydroalanin des Molekülschwanzes (**14-19**, Abbildung 4.3)^[1c] addiert werden. Wichtige Produkte dieser Strategie waren u.a. auch die fluoreszenten Thiostreptonsonden **5+6**, welche die Entwicklung des in Kapitel 3.4 beschriebenen Thiopeptidaffinitätsassays ermöglichten.^[1c] Die Zielstrukturaffinitäten der Sonden **5+6** im Vergleich zur Affinität von unmodifiziertem Thiostrepton **1** (vgl. Kapitel 3.4) zeigten bereits, dass eine Modifikation am Molekülschwanz keinen signifikanten Einfluss auf die Affinität ausübte.

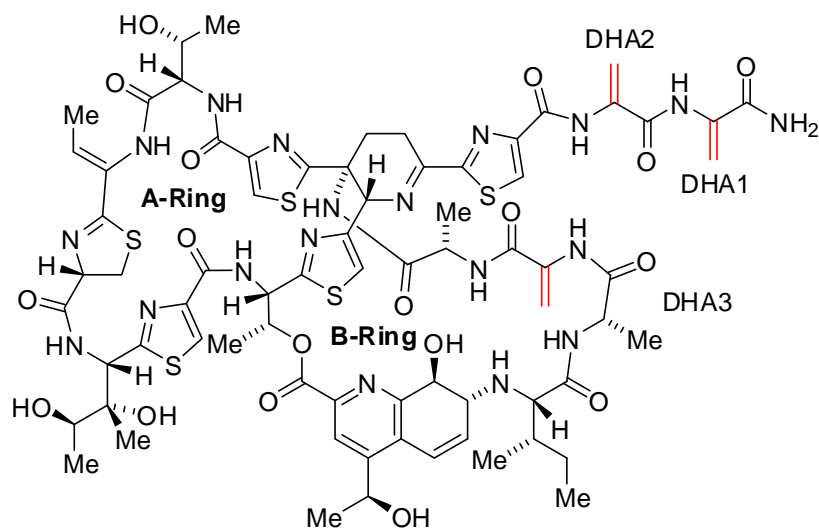
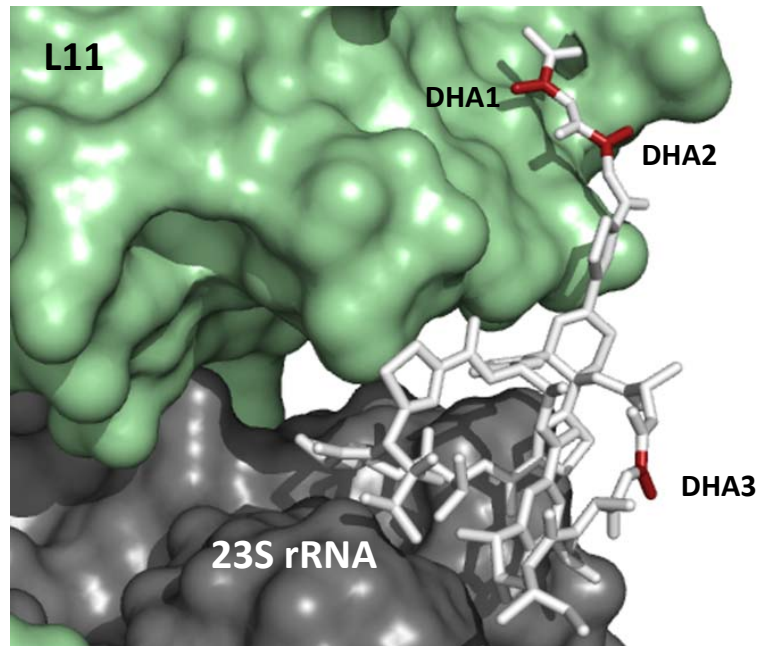


Abbildung 4.2: Übersicht der Dehydroalanineinheiten (rot) im Thiostrepton-Grundgerüst, visualisiert auf Basis der Kristallstruktur von Thiostrepton im Komplex mit der ribosomalen 50S Untereinheit (PDB 3cf5)^[17] Wichtige Gruppen sind markiert.

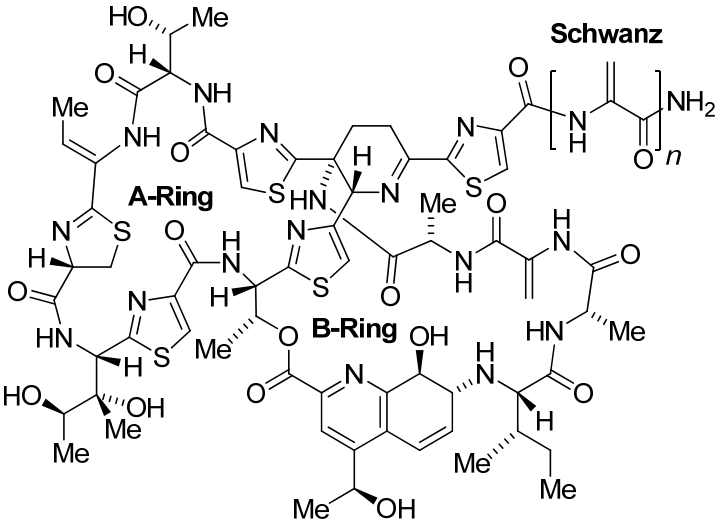
Dieselben Resultate konnten auch für die verkürzten Derivate **12+13** beobachtet werden (Tabelle 3.1). Selbst die vollständige Entfernung der Dehydroalanin-Einheiten des Molekülschwanzes, hatte keinen nennenswerten Einfluss auf die Zielstrukturaffinität (0,20 → 0,32 nM). Der Dehydroaminosäure Einheiten des Molekülschwanzes sind demnach nicht wesentlich an der Zielstrukturinteraktion beteiligt. Die Addition hydrophiler/moderat polarer ungeladener Gruppen (**14+16**) bzw. geladener Gruppen wie (**17+18**, jeweils

diastereomerische Mischungen) an **12** hatte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Affinität der Verbindungen an die isolierten 23S rRNA-L11-Komplexe. Auffällig war in diesem Zusammenhang das negative geladene Propionsäureaddukt **19**, welches eine ca. 75-fach niedrigere Affinität an die Zielstruktur aufwies. Die Addition von lipophilen Oktylketten (**15a+b**, Diastereomere chromatographisch trennbar)^[1c, 9] an **12** hatte ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Bindung und verursachte einen ca. 20-fachen Affinitätsverlust. Die Stereochemie dieser Addukte (**15a+b**) schien jedoch keinen starken Einfluss auf die Affinität zu haben. Neben den Affinitätsanalysen wurde die antibiotische Aktivität der semisynthetischen Thiostreptonderivate in Wachstumsinhibitionsstudien mit dem methicillin-sensitiven und methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MSSA und MRSA) untersucht. Zum Vergleich wurde in diesem Zusammenhang auch die Aktivität verschiedener Thiopeptidnaturstoffe (Abb. 3.18) überprüft.

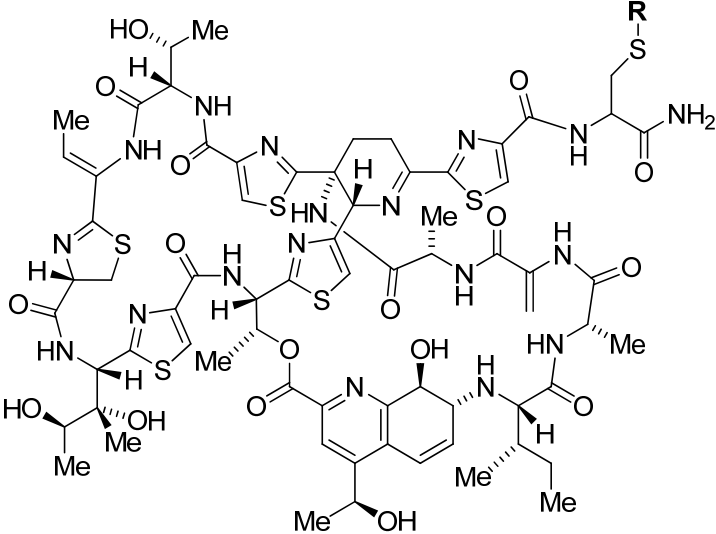
A) Naturstoffe:

Für die Thiopeptidnaturstoffe Thiostrepton **1** und Nosiheptid **2** und Micrococcin **3** unterschieden sich die antimikrobielle Wirksamkeiten *in vitro* zwar von den biophysikalischen Bindedaten, reflektierten jedoch den generellen Trend der Aktivität von **1-3** (vgl. hierzu auch Abb. 3.20). Vor allem die *in vitro* Aktivität von Nosiheptid gegen MRSA war bemerkenswert (sub-nanomolar!). Promocin **4** zeigte eine ca. 100-fach niedrigere Affinität an den RNA-L11-Komplex als Micrococcin **3**. Interessanterweise war **4** in den Wachstumsinhibitionsstudien, wie auch in *in vitro* Translationsinhibitionsstudien (Kapitel 3.4.3) minimal aktiver als **3**. Ein Grund für die Abweichung von Bindedaten und *in vitro* antibiotischer Aktivität für **4** könnte in dessen molekularer Struktur liegen. Der Makrozyklus (A-Ring) von **4** (35 Atome) ist deutlich größer als der von **3** (26 Atome) und erinnert strukturell sehr stark an GE2270 und dessen Derivate, ebenfalls Mitglieder der Thiopeptidfamilie.^[1a] Diese Moleküle binden im Unterschied zu anderen Mitgliedern der Thiopeptidfamilie nicht an den 23S rRNA-L11-Komplex, sondern an die GTP-gebundene Form des Elongationsfaktors Tu (EF-Tu) und inhibieren so die Proteinbiosynthese.^[18] Eine zusätzliche Affinität von **4** an EF-Tu könnte demnach ein plausibler Grund für dessen hohe Aktivität in den bakteriellen Wachstumsinhibitionsstudien sein. Dasselbe gilt für das strukturverwandte Thiotipin **8** (vgl. Abb. 3.18-20). Ein direkter Nachweis der Bindung von **4+8** an EF-Tu wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen. Der Wirkungsmechanismus von Promothiocin B **9** wird in Kapitel 5 dargestellt und diskutiert.

A)



1: $n=2$ 12: $n=1$ 13: $n=0$



- 14: R =
- 15: R =
- 16: R =
- 17: R =
- 18: R =
- 19: R =

B)

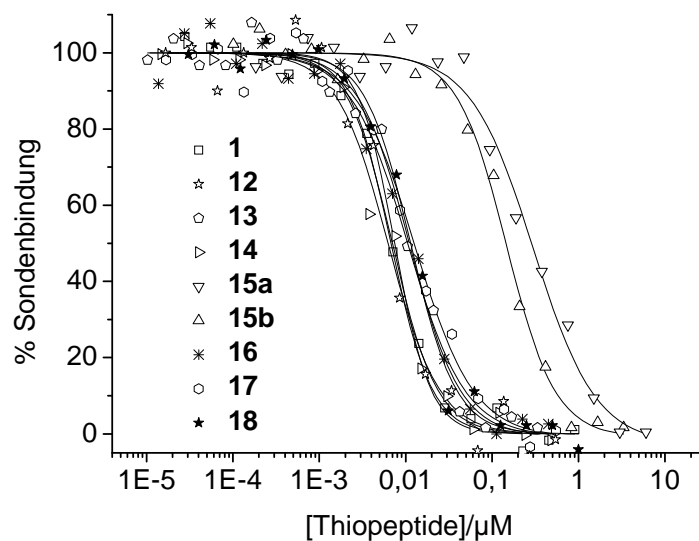


Abbildung 4.3: A) Chemische Strukturen von Thiostrepton **1** sowie der semisynthetischen Derivate **12-19**. B) Verdrängungstitrationen der fluoreszenten Sonde **6** mit verschiedenen semisynthetischen Thiostreptonderivaten **12-19**. Hierzu wurden stöchiometrische Mengen der Sonde und des 23S rRNA Wildtypfragments (5 nM) mit einem Überschuss von *Thermus thermophilus* L11 Wildtyp (0,6 µM) komplexiert und mit variierenden Mengen der semisynthetischen Liganden **12-19** titriert (angepasst an die Hill-Funktion).

Nr.	K_{app}/nM	MIC/µM MRSA	MIC/µM MSSA	L/µM (H ₂ O)
1	0,20 ± 0,05	0,0065	0,013	1
2	0,11 ± 0,01	0,00063	0,00063	n.b.
3	1,73 ± 0,90	0,34	0,42	n.b.
4	113 ± 13	0,25	n.b.	n.b.
8	182 ± 10	>0,5	n.b.	n.b.
9	1040 ± 125	>0,5	n.b.	n.b.
12	0,19 ± 0,01	0,063	0,063	4,8
13	0,32 ± 0,05	0,013	0,013	1,6
14	0,22 ± 0,06	2,00	2,00	110
15a	3,59 ± 1,20	0,30	0,30	1
15b	5,41 ± 2,03	3,2	3,2	1
16	0,32 ± 0,08	0,67	0,41	n.b.
17	0,32 ± 0,04	3,2	1,6	n.b.
18	0,44 ± 0,11	0,37	0,37	16,8
19	14,9 ± 2,23	n.b.	n.b.	89

Tabelle 4.1: Dissoziationskonstanten der Bindung der semisynthetischen Liganden (schwarz, in TFE) oder Naturstoffen **1-4**, **8+9** (grau, in TFE, Kapitel 3) an den isolierten ribosomalen Komplex, im Vergleich zur minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) der Derivate für den methicillin-resistenten (MRSA) bzw. methicillin-sensitiven (MSSA) *Staphylococcus aureus* (MIC-Daten: B. Ellinger, TU Dortmund), sowie der Löslichkeiten (L) der Verbindungen in H₂O (Sebastian Schoof).^[1c, 10b, 11a] (n.b.: nicht bestimmt)

B) Semisynthetische Thiostreptonderivate:

Die verkürzten Thiostreptonderivate **12+13** verhielten sich im Wachstumsinhibitionstest analog zum Naturstoff **1**, in Einklang mit den biophysikalischen Bindedaten. Die Entfernung des azyklischen Molekülschwanzes erhöhte die Löslichkeit der Verbindung jedoch bereits ca. 5-fach. Die Addition einer hydrophilen Thioglucosegruppe (**14**) erhöhte die Löslichkeit der Verbindung im Vergleich zum Naturstoff zwar ca. 100-fach, führte jedoch gleichzeitig zu ca. 300-fach schlechteren MIC-Werte ohne Einfluss auf die Zielstrukturaffinität zu haben. Dieser starke *in vitro* Aktivitätsverlust ist wahrscheinlich auf die Verringerung der Zellaufnahme der Verbindung zu begründen. Die Addition lipophiler Oktylketten (**15a+b**) führte, trotz der reduzierten Affinitäten, nicht zu einer weiteren Reduktion der antibiotischen Aktivität. Die Stereochemie von **15** spielte im Wachstumstest eine wesentliche Rolle. Die beiden Diastereomere **15a+b** unterschieden sich ca. 10-fach in ihrer Aktivität. Ein kationischer Anhang, wie im Fall von **18** erschien im Zusammenhang von Aktivität und Löslichkeit hilfreich, die beobachteten Effekte (vgl. **16**, **17**, **19**) waren jedoch nicht sehr stark. Die negative Ladung im Fall von **17** zeigte ähnlich nachteilige Effekte wie im Fall der Thioglucose **14**, d.h. gute Löslichkeiten in Kombination mit einer deutlich verschlechterten antibakteriellen Aktivität *in vitro*.

4.2.2 Thiol-Michael-Bisaddukte und B-Ring Thiol-Michael-Monoaddukte

Neben den Monoadditionen an den azyklischen Molekülschwanz (DHA2), waren ausgehend vom Naturstoff **1** Thiol-Michael-Bis-Additionen an den Molekülschwanz (DHA1+2), ausgehend von **12** Thiol-Michael-Bis-Additionen an Molekülschwanz und B-Ring (DHA2+3), sowie ausgehend von **13**, selektive Additionen an den B-Ring (DHA3) möglich (Abbildung 4.4).^[9, 11a] Die Thiol-Bisadditionen von N-Acetyl-Cysteinmethylester (**20**) bzw. Cystein (**21**) an DHA1+2 hatten analog zu den Monoaddukten (Abbildung. 4.2; Tabelle 4.2) keinen signifikanten Einfluss auf die Zielstrukturaffinität. Bisadditionen von N-Acetyl-

Cysteinmethylester an den DHA3 in Kombination mit Thioglukose an DHA2 (**22**) wurden ebenfalls ohne signifikante Einbuße der Affinität toleriert. Interessanterweise führte der Austausch des N-Acetyl-Cysteinmethylesters durch Thioglukose (**23**) zu einer 14-fachen Verschlechterung der Affinität. Monoadditionen an DHA3 von **13** wurden generell wenig toleriert. Hierbei hatte der moderat polare N-Acetyl-Cysteinmethylesters im Fall von **24** den geringsten Einfluss. Die anionische Propionsäure-Einheit (**25**) sowie die lipophile Oktyl-Einheit führten hier zu bemerkenswerten 50 bzw. 120-fachen Verschlechterungen der Zielstrukturaffinität. Der B-Ring von **1** ist laut der Kristallstrukturdaten von Harms et al.^[17] dem Lösungsmittel zugewandt, wobei DHA3 der RNA relativ nahe kommt (Abbildung 4.2). Die Verschlechterung der Zielstrukturaffinität könnte im Fall von **25** möglicherweise durch Abstoßungseffekte bedingt durch die negative Ladung von Ligand und RNA zu begründen sein. Im Fall von **26** handelt es sich vermutlich eher um eine sterische Hinderung der Bindung durch die relativ große Oktyl-Einheit oder ungünstige Solvatation.

Für die allgemeine Struktur-Aktivitäts-Beziehung für Thiostrepton **1** kann zusammengefasst werden, dass Modifikationen in Form von Thiol-Michael-Additionen am Molekül-schwanz unabhängig von der Größe der addierten Einheit toleriert werden und dieser Molekülteil demnach für die Bindung keine wesentliche Rolle spielt. Modifikationen des B-Rings, obwohl anscheinend zum Lösungsmittel ausgerichtet, werden generell weniger toleriert. Negativ geladene sowie große Gruppen führen hier zu drastischen Einbußen der Zielstrukturaffinität.

Thiopeptid	K_{app}/nM	Thiopeptid	K_{app}/nM
20	$0,25 \pm 0,11$	24	$3,38 \pm 2,00$
21	$0,23 \pm 0,15$	25	$10,6 \pm 6,10$
22	$0,30 \pm 0,11$	26	$24,7 \pm 2,86$
23	$2,81 \pm 1,01$	-	-

Tabelle 3.2: Dissoziationskonstanten der Bindung der semisynthetischen Liganden. Zur Bestimmung wurden stöchiometrische Mengen der Sonde **6** und des 23S rRNA Wildtypfragments (5 nM) mit einem Überschuss von *Thermus thermophilus* L11 Wildtyp (0,6 μ M) komplexiert und mit variierenden Mengen der semisynthetischen Liganden **20-26** titriert (Daten nicht gezeigt).

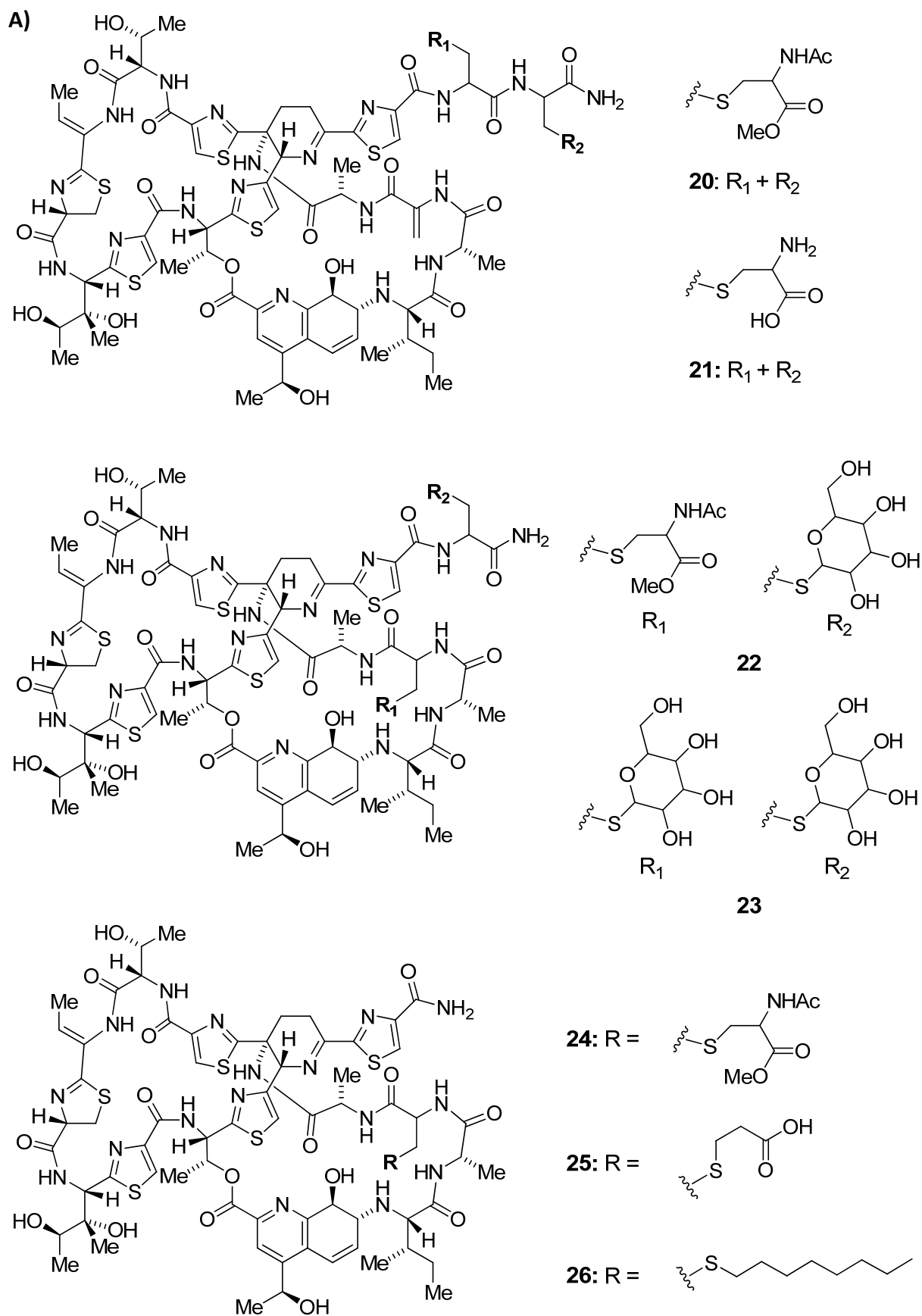


Abbildung 4.4: A) Chemische Strukturen der semisynthetischen Thioestreptonderivate **20-26**.^[9]

4.2.3 Manipulation des Thiostrepton-Grundgerüsts

Ein Charakteristikum aller Thiopeptidantibiotika ist der Besitz einer zentralen heterozyklischen Domäne, welche in unterschiedlichen Oxidationsstufen vorgefunden werden. Anhand dieses Rings klassifizierten Bagley *et al.* die Thiopeptide in fünf Subfamilien A-E (Piperidin, Dehydropiperidin, Dihydroimidazopiperidin, trisubstituiertes Pyridin, Hydroxypyridin).^[1a] Thiostrepton wird in diesem Zusammenhang bedingt durch den Besitz eines zentralen Dehydropiperidin-Kerns in die Subfamilie B eingeordnet. Eine Gemeinsamkeit der Thiopeptidsubfamilien A-C ist der Besitz einer Thiazolin-Einheit im A-Ring, welcher im Fall der Subfamilien D (Micrococцин **3**) und E (Nosiheptid **2**) oxidiert zum Thiazol vorliegt.^[1a] Die Thiazolin-Einheit von Thiostrepton ist D-konfiguriert, ein bemerkenswerte Befund angesichts der Tatsache, dass Thiopeptide ribosomal und demnach ausgehend von L-Aminosäuren synthetisiert werden.^[4c, 4d, 6a, 6c-f] Im Rahmen der Thiostrepton-Trunkierungsreaktionen (**1** → **12**, Abbildung 4.1)^[9] wurde von Dipl. Biochem. Sebastian Schoof, neben dem D-Cys-Epimer, auch die Existenz des L-Cys-Epimers nachgewiesen, welches präparativ isoliert werden konnte.^[19] Die unterschiedlichen chromatographischen Eigenschaften der D- und L-Isomere wiesen hierbei zusätzlich auf unterschiedliche Gesamtstrukturen der Moleküle hin.^[19] Agardiffusionstests der beiden Verbindungen im Vergleich zeigten, dass das natürliche D-Isomer (**12**) eine deutlich höhere antibakterielle Aktivität besaß als das L-Isomer (**28**) (Abbildung 4.5).

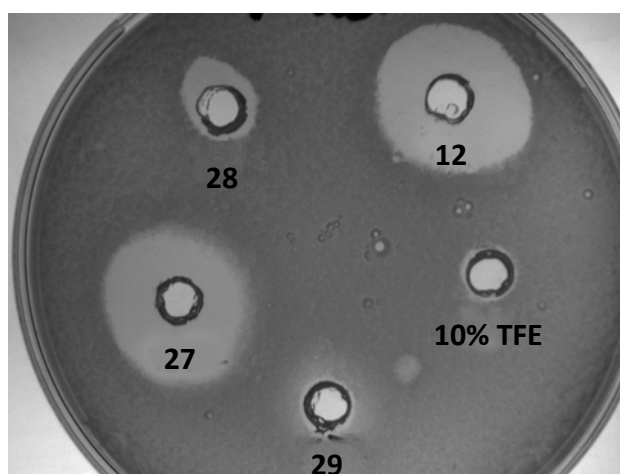


Abbildung 4.5: Agardiffusionstest von **12** und **27-29** auf LB-Agarplatten mit dem *Bacillus subtilis* Wildtyp. In die eingestanzten Löcher wurde 100 µl einer 25 µM Lösung der jeweiligen Verbindung in 10% TFE gegeben. Als Kontrolle wurde das Lösungsmittel ohne Thiopeptid verwendet.

Die Analyse der Affinität der beiden Konformere an isolierte 23S rRNA-L11 Komplexe mittels Fluoreszenzanisotropie-Bindungsstudien bestätigten diesen qualitativen Befund. Die Affinität des L-Isomers **28**, war ca. 30-fach schwächer als die des D-Isomers **12** (Abbildung 4.7). Das ebenfalls semisynthetisch erzeugte oxidierte Derivat **27**^[9] zeigte hingegen keine signifikant Veränderung der Bindeaffinität (0,23 nM) und einen mit **12** vergleichbaren Hemmhof im Agardiffusionstest (Abbildung 4.5). Analysen der Aktivität von **27+28** im *in vitro* Translationsinhibitionssystem (vgl.2.12.2) zeigten überraschenderweise, dass **28** trotz der reduzierten Affinität in den Gleichgewichtbindungsstudien, im *in vitro* Translationsinhibitionssystem eine zu **12** und **27** vergleichbare Aktivität aufwies (Abbildung 4.8 C). HPLC-Analysen zeigten dann, dass eine Epimerisierung von **28** → **12** im Translationsmix auftrat (Daten nicht gezeigt). Die Beobachtung dieser Epimerisierung von **28** in wässrig-physiologischen Testsystemen (bakterielle Zelllysate) sowie organischen Lösungsmitteln im Rahmen analytischer Studien^[19] ließ darüberhinaus den Schluss zu, dass das D-Isomer thermodynamisch bevorzugt ist. Möglicherweise findet diese thermodynamisch getriebene Epimerisierung auch während der Biosynthese statt.^[4d, 6a-g] Dieselben Studien zeigten auch die Wichtigkeit des Thiostrepton B-Rings (Abbildung 4.7) für die Epimerisierung.^[19] Der Besitz eines von dem zentralen Dehydropiperidin-Kern ausgehenden, über 8-Hydroxyquinaldinsäure verknüpften Makrolactons (Abbildung 4.7, B-Ring), ist typisch für Thiostrepton **1** sowie die weiteren Mitglieder der Subfamilien A-C der Thiopeptidfamilie.^[1a] Die genaue Bedeutung dieser Struktur war jedoch unklar. Um seine Bedeutung zu überprüfen wurde durch eine Umesterung des Makrolactons, eine selektive Öffnung des B-Rings von **1** erreicht (Sebastian Schoof) und lieferte so die Verbindung **29**.^[9, 19] In der Tat zeigte **29** im Vergleich zum Naturstoff **1** in Bindungsanalysen eine ca. 3000-fach reduzierte Affinität an 23S rRNA-L11-Komplexe. Im Agardiffusionstest induzierte **29** darüberhinaus keinen Hemmhof (Abbildung 4.5). Die Aktivität im *in vitro* Translationsinhibitionssystem war deutlich schwächer als die des Naturstoffs **1** selbst (Abbildung 4.8 C). Dies zeigt eindeutig den großen Einfluss des B-Rings auf die Aktivität, obwohl dieser in Strukturuntersuchungen keine Wechselwirkung mit der Zielstruktur zeigt.^[17] Offensichtlich trägt er zur konformationellen Präorganisation entscheidend bei. Darüberhinaus liegt die C8-Hydroxylgruppe der 8-Hydroxyquinaldinsäure des B-Rings von **1** in der Kristallstruktur (3,3 Å) des Thiostrepton-Ribosomenkomplexes^[17] in H-Brücken-Nähe zu N1 von A1067 der 23S rRNA (Abbildung 5.11). Möglicherweise leistet der B-Ring von **1** so auch einen enthalpischen Beitrag zur Gesamtaffinität.

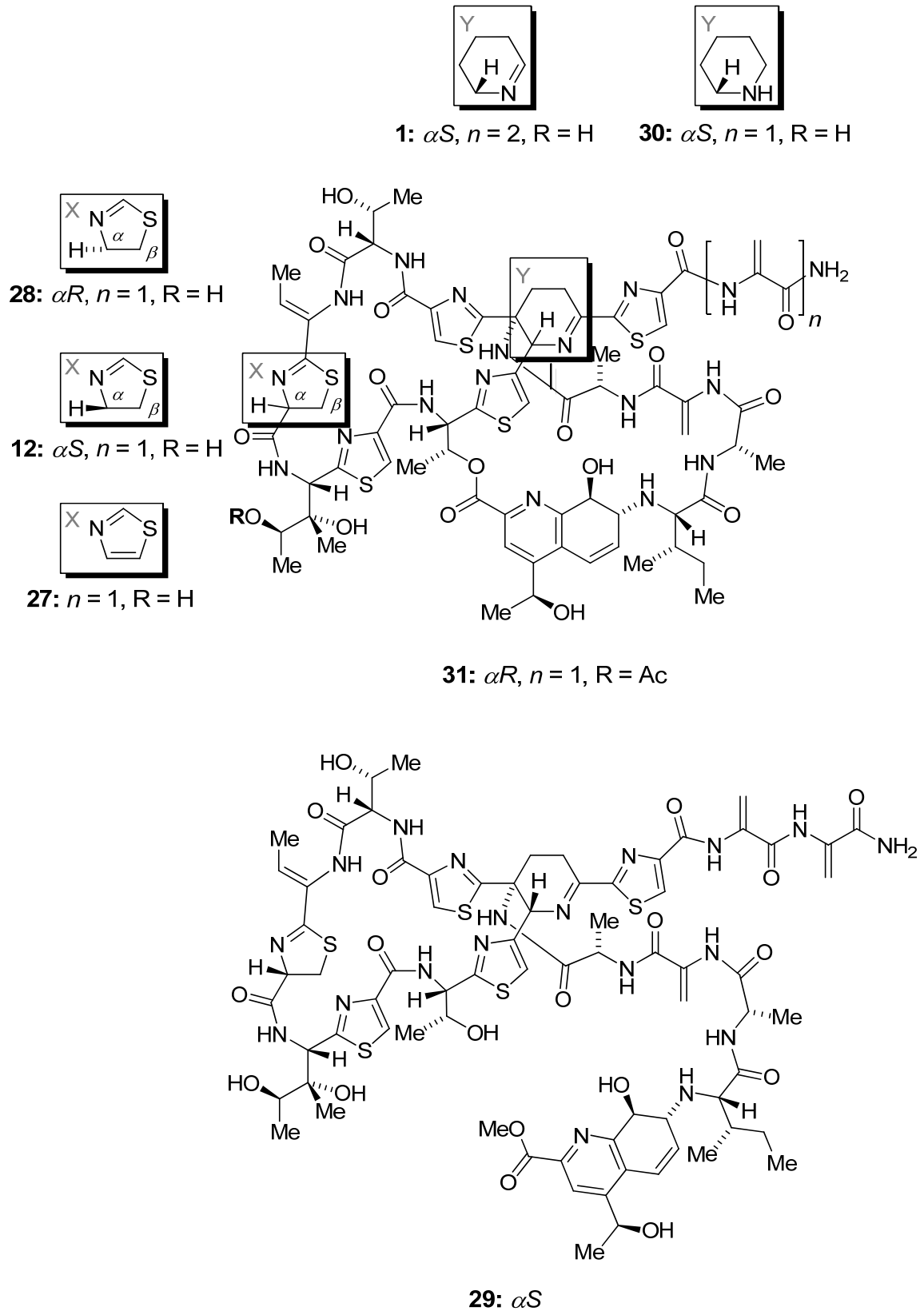


Abbildung 4.6: Chemische Strukturen der semisynthetischen Thiostreptonderivate **12** sowie **27-31**.

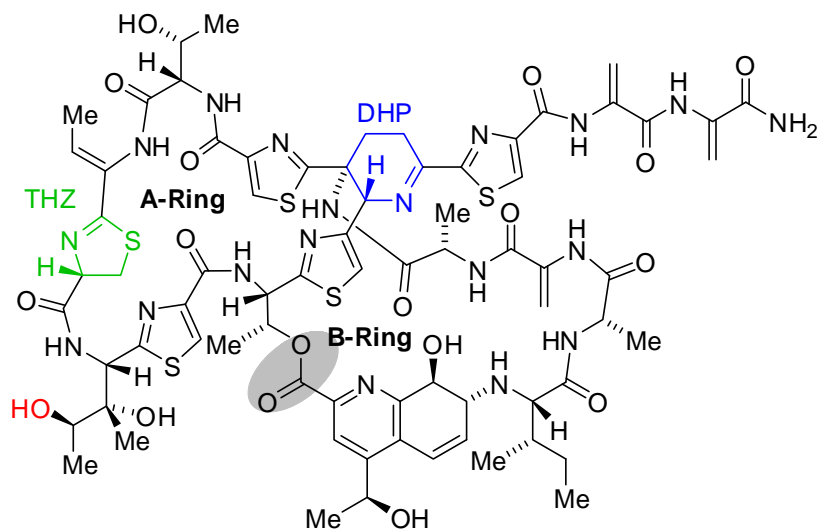
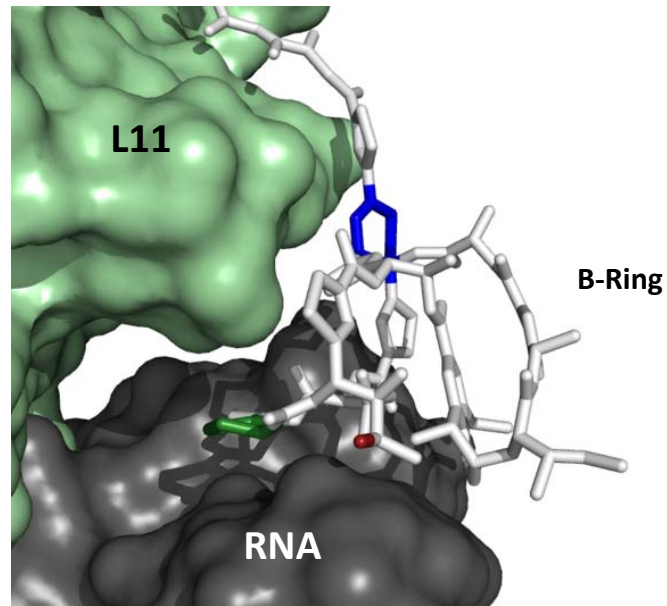


Abbildung 4.7: Darstellung der Lage der Thiazolin-Einheit (THZ, grün), des Dehydropiperidin-Kerns (DHP, blau), der acetylierbaren Hydroxylfunktion (rot) sowie der B-Ring Ester-Funktion (grau unterlegt) im Thioestrepton-Grundgerüst, visualisiert auf Basis der Kristallstruktur von Thioestrepton im Komplex mit der ribosomalen 50S Untereinheit (PDB 3cf5)^[17] Wichtige Gruppen sind markiert.

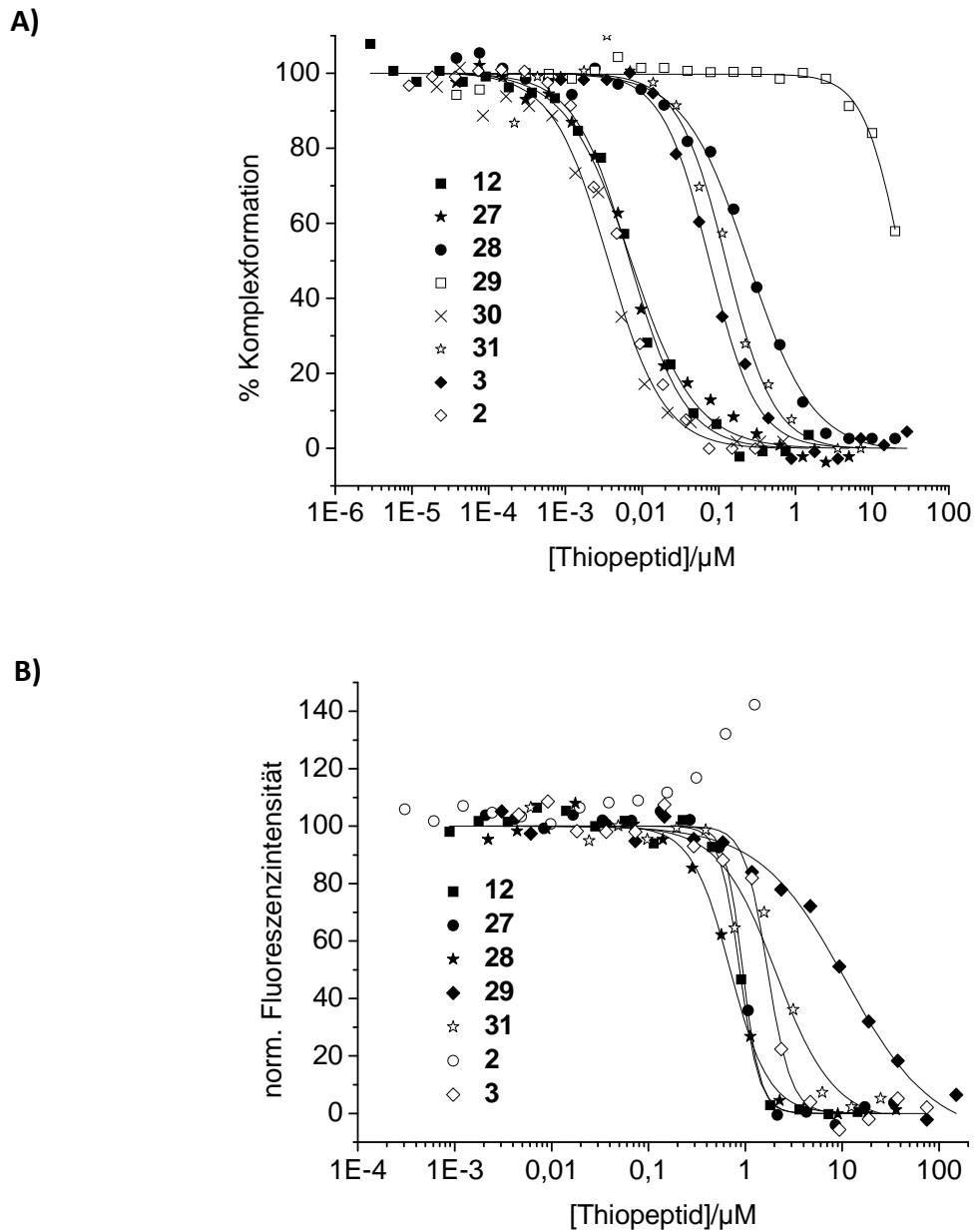


Abbildung 4.8: A) Verdrängungstitrationen der fluoreszenten Sonde **6** mit verschiedenen semisynthetischen Thiostreptonderivaten **12**, **27-31**. Hierzu wurden stöchiometrische Mengen der Sonde und des 23S rRNA Wildtypfragments (5 nM) mit einem Überschuss von *Thermus thermophilus* L11 Wildtyp (0,6 μM) komplexiert und mit variierenden Mengen der semisynthetischen Liganden titriert (angepasst an die Hill-Funktion) Die Naturstoffe **1-3** dienen als Kontrolle und Vergleich. B) *In vitro* Translationsinhibitionsexperimente der semisynthetischen Thiostreptonderivate **12** sowie **27-31**.

Thiopeptid	K_{app}/nM	IC ₅₀ Translationsinhibition in μM
1	0,20 ± 0,05	0,69 ± 0,03
12	0,20 ± 0,05	0,80 ± 0,18
27	0,23 ± 0,14	0,88 ± 0,06
28	5,6 ± 1,1	0,63 ± 0,08
29	670 ± 46	8,01 ± 2,80
30	0,10 ± 0,05	n.b.
31	1,8 ± 0,21	1,67 ± 2,8
2	0,11 ± 0,01	n.b.
3	1,7 ± 0,9	1,69 ± 0,12

Tabelle 4.3: Dissoziationskonstanten der Bindung der semisynthetischen Thiostrepton-Derivate **12** und **27-31** sowie den Thiopeptidnaturstoffen **1-3** an isolierte 23S rRNA-L11-Komplexe, sowie der IC₅₀-Werte der *in vitro* Translationsinhibition. Thiopeptidnaturstoffe sind grau dargestellt.

Im Sinne einer Wirkstoffanwendung ist der Besitz des chemisch reaktiven Imins im Dehydropiperidin-Kern von **1** ein Nachteil. Die **1** strukturell sehr ähnlichen Thiopeptide besitzen neben Dehydropiperidin-Kernen (Thiopeptin B-Serie) auch vollständig gesättigte Piperidin-Kerne (Thiopeptin A-Serie).^[1a] Die vergleichbare Aktivität aller Thiopeptide in *E. coli* Lysat basierten *in vitro* Translationsinhibitionssystemen weist darauf hin, dass die Oxidationsstufe des Piperidin-Kerns keinen wesentlichen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität hat. Die Reduktion des Dehydropiperidin-Kerns von **12** zum Piperidin lieferte Verbindung **30** (Sebastian Schoof).^[9] Diese hatte interessanterweise sogar eine mit Nosiheptid (**2**) vergleichbare Zielstrukturaffinität von ca. 0,1 nM (Tabelle 4.3).

Weitere mögliche Angriffspunkte für die semisynthetische Modifizierung von Thiostrepton sind dessen Hydroxylgruppen (Abbildung 4.1). Die selektive Mono-Acetylierung von **12** lieferte die Verbindung **31**,^[9] welche eine im Vergleich zu **12** ca. 10-fach niedrigere Affinität an die Zielstruktur aufwies und auch im *in vitro* Translationsinhibitionstest 2 bis 3-fach weniger aktiv war. Die modifizierte Hydroxylgruppe liegt in der Kristallstruktur des Komplexes von Thiostrepton und der ribosomalen 50S Untereinheit, relativ nah an der 23S rRNA. Die Struktur von **1** wurde hierbei jedoch lediglich in eine 3-4 Å aufgelöste Elektronendichte „gedockt“ und stellt somit nur ein Modell für die Wechselwirkung dar.^[17] Das reale Rotamer der Hydroxylgruppe ist unbekannt. Möglicherweise bewirkt eine Acetylierung hier eine sterische Hinderung der Thiopeptid-RNA-Interaktion. Allerdings könnte auch eine H-Brücke unterbunden werden. Um zusätzliche Informationen über die

molekulare Wechselwirkung von **1** mit der ribosomalen Zielstruktur zu erhalten, wurden deshalb im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit verschiedenen Gruppen, NMR-Strukturanalysen semisynthetischer Derivate von **1** durchgeführt und deren Zielstrukturbindung mittels *in silico* „Docking“-Studien analysiert (Kapitel 4.2.4).

4.2.4 NMR-Strukturanalysen und *in silico* „Docking“- semisynthetischer Thiostreptonderivate

Zur Überprüfung des Einflusses der semisynthetischen Modifikationen (Abbildung 4.6-7) auf die Gesamtstruktur von **1**, wurden im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Hendrik R. A. Jonker und Prof. Dr. Harald Schwalbe (J. W. Goethe Universität, Frankfurt) die Lösungsstrukturen des Naturstoffs **1** und der Derivate **27**, **28** + **30** mittels NMR-Spektroskopie analysiert (Homonuclear NOESY und ROESY). Eine Überlagerung der vier NMR-Strukturbestimmungen (jeweils Bündel von 20 Energieminima), sowie der Struktur von **1** aus der Kristallstruktur (PDB 1E9W)^[20] ist in Abbildung 4.9 A dargestellt. Die NMR-Struktur von **1** stimmte hierbei generell sehr gut mit dessen Kristallstruktur überein. Die Struktur des B-Rings sowie des azyklischen Molekülschwanzes der drei Verbindungen (**1**, **27**+**28**) war identisch. Strukturelle Unterschiede traten jedoch im A-Ring der Verbindungen zu Tage. Erwartungsgemäß führte die Oxidation des Thiazolins zum Thiazol (**27**) zu einer Abflachung, welche zu einer minimalen strukturellen Verschiebung der Einheit führt. Das Thiostrepton-Epimer **28** zeigte jedoch stärkere Strukturänderungen. Hierbei war beispielsweise die Thiazolin-Einheit von **27** relativ zu **1** um 2,5-2,9 Å verschoben. Diese deutlichen Strukturänderungen für **28** sollten mit dessen Affinitätsunterschiede zu **1** im Zusammenhang stehen. Das reduzierte Derivat **30** zeigte eine, mit der Lösungsstruktur von **1** identische, Konformation des A- und B-Rings. Die durch die Reduktion bedingte Einführung eines chiralen Zentrums am zentralen Stickstoffheterozyklus in **30**, führte jedoch zu einer deutlich von **1** abweichenden Konformation des Molekülschwanzes (Abbildung 4.9 A).

Zur Analyse des Einflusses der veränderten Strukturen auf deren Interaktion mit der ribosomalen Zielstruktur wurden im Rahmen einer Kooperation mit Dipl. Inf. Antje Wolf und Dr. Karl N. Kirschner (Fraunhofer Institut für wissenschaftliches Rechnen (SCAI), Sankt Augustin) semi-relaxierte „Docking“-Studien (AutoDock 4.2)^[21] der Verbindung **1**, **27**, **28** sowie des reduzierten Thiostrepton-Derivats **30** auf Basis der Kristallstrukturdaten der Thiopeptidbindestelle^[17] durchgeführt (Abbildung 4.9 B).

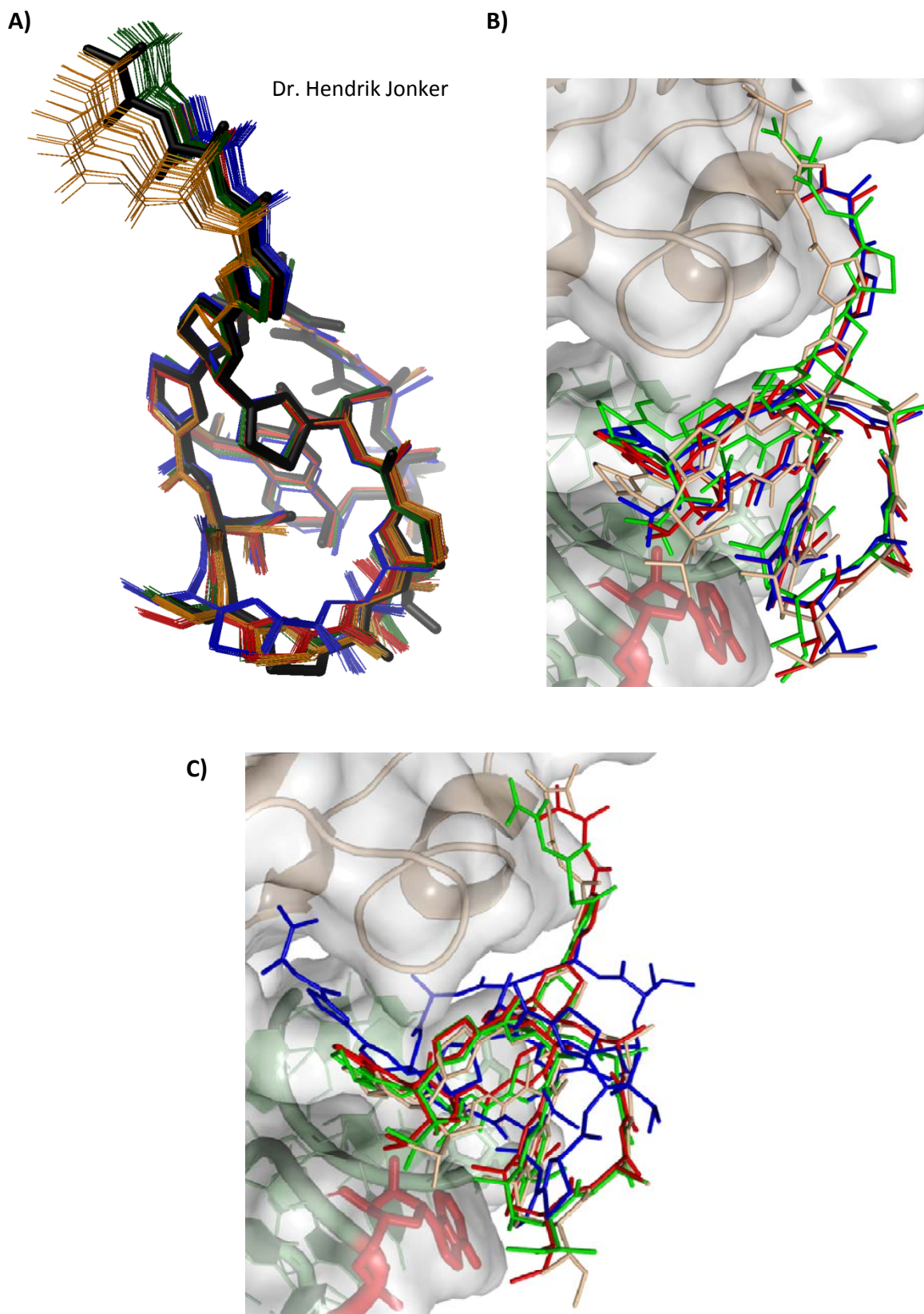


Abbildung 4.9: A) Bündel von je 20 Energieminima der NMR-Strukturen von Thiostrepton (**1**, grün), dem oxidierten Derivat (**27**, rot), dem Thiostrepton-Epimer (**28**, blau) und dem reduzierten Derivat (**30**, orange) überlagert mit der Kristallstruktur von **1** (PDB: 1E9W, schwarz)(Dipl. Chem. F. Hiller, Dr.

H. Jonker). B+C) *In silico* semi-relaxiertes „Docking“ (Dipl. Inf. Antje Wolf, AutoDock 4.2) der Verbindung **1**, **27**, **28** und **30** auf Basis der Kristallstrukturdaten der Thiopeptidbindestelle (PDB: 3cf5).^[17] Die Seitenketten des Liganden sowie die Dehydroalanin-Einheiten wurden während des „Dockings“ flexibel gehalten. **1** (grün), **27** (rot), **28** (blau) **30** (beige). **B**: Bester „Docking-Score“, **C**: Größter „Cluster Score“

Nr.	K_{app}/nM	„Docking Score“	„Cluster Score“
1	0,20 ± 0,05	-8,41*	-8,35*
27	0,23 ± 0,14	-8,54*	-8,54*
28	5,6 ± 1,1	-8,30*	-7,92*
30	0,10 ± 0,05	-9,15 *	-8,71*

Tabelle 4.4: Beste „Docking Scores“ und beste „Cluster Scores“ des semi-relaxierten „Dockings“ der Verbindungen **1**, **27**, **28** und **30** an die ribosomale Zielstruktur.

Für alle vier Verbindungen konnten Bindungsmodi gefunden werden, welche im Einklang mit der Konfiguration im Kristall waren und gleichzeitig unter den besten „Docking Scores“ vertreten waren. Die Betrachtung der Bindemodi der besten Lösungsbündel („Cluster Scores“, Tabelle 4.4) zeigte bemerkenswerterweise, für das Thiostrepton-Epimer (**28**) einen sehr stark abweichenden Bindungsmodus, wobei sich die Bindemodi der drei verbleibenden Moleküle wiederum kaum unterschieden. Sowohl die „Docking Scores“ als auch die „Cluster Scores“ für die getesteten Verbindungen (Tabelle 4.4) waren qualitativ im Einklang mit den experimentell bestimmten Affinitäten an die ribosomale Zielstruktur. Hierbei wurde das Thiostrepton-Epimer (**28**) als schwächster Binder identifiziert. Bemerkenswerterweise wurde für das reduzierte Derivat **30** eine im Vergleich zu **1** erhöhte Zielstrukturaffinität vorhergesagt, welche im Bindungsexperiment belegt werden konnte.

4.2.5 Thiostrepton-Biotin-Addukt

Neben den beiden fluoreszenten Thiostreptonsonden **5+6** erlaubte die selektive Sulfa-Michael-Additionsstrategie die Herstellung eines Thiostrepton-PEG-Biotin-Addukts (**32**, Abbildung 4.10), einer dritten Thiostrepton-basierten Werkzeugverbindung. Biotinylierte Derivate von biologisch aktiven Substanzen werden in Medizinalchemie und der Chemischen Biologie häufig zur Identifikation noch unbekannter Zielstrukturen („Targets“), in affinitätschromatographischen Experimenten verwendet, so genannten „Pull-downs“.^[22]

Biotin bindet hochaffin (ca. 10^{-15} M) an das Hühnereiweißprotein sowie seinen Homologen und Abwandlungen. Streptavidin-funktionalisierte Materialien (z.B. verschiedene Harze) erlauben so die Bereitstellung von irreversiblen, nicht-kovalenten Konjugaten. Das Thiostrepton-Biotin-Addukt **32** sollte in diesem Zusammenhang auf sein Potenzial zur nicht-kovalenten Immobilisierung von bakteriellen 70S Ribosomen untersucht werden, welche z.B. im Rahmen einer Ribosomenaffinitätsreinigung genutzt werden könnte.

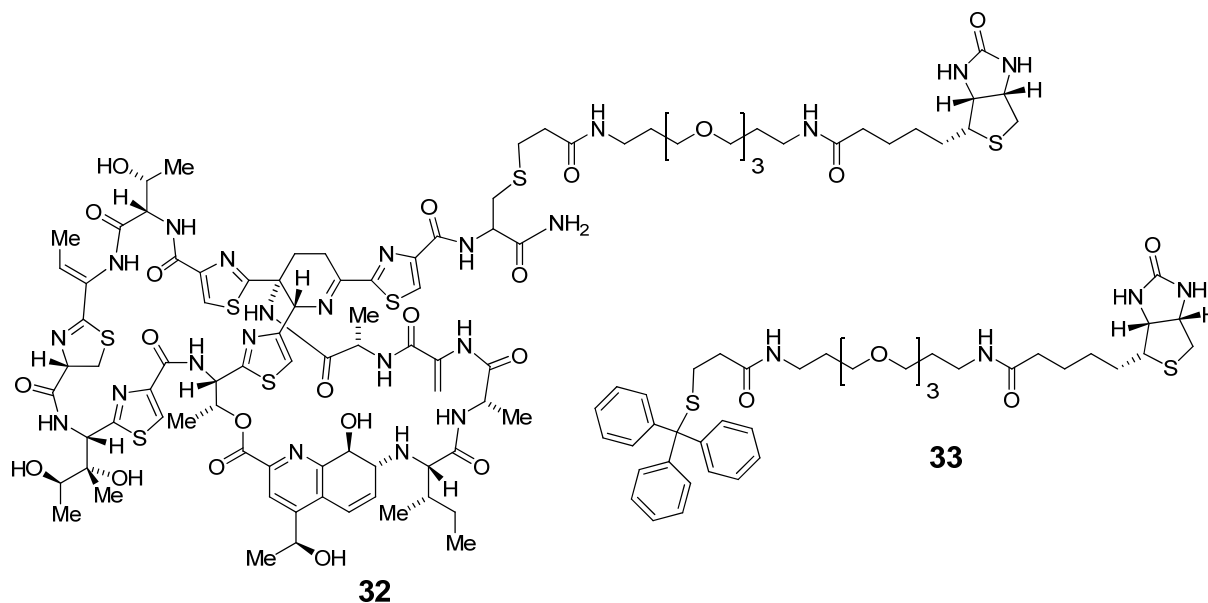


Abbildung 4.10: Chemische Struktur des Thiostrepton-PEG-Biotin-Addukts **32** sowie der PEG-Biotin-Einheit **33**.

Die Analyse der Affinität von **32** an isolierte 23S rRNA-L11-Komplexe in Fluoreszenzanisotropie-Verdrängungstitrationen der fluoreszenten Sonde **6** (vgl. 2.11.2) ergab einen mit dem Naturstoff **1** vergleichbaren K_D -Wert von $0,22 \pm 0,05$ nM. Die PEG-Biotin-Einheit allein (**33**) zeigte keine Bindung (Daten nicht gezeigt). Für die Immobilisierung von **32** wurden unterschiedliche Streptavidin-funktionalisierte „MagneticBead“-Systeme (Dynabeads, Invitrogen) getestet (vgl. 2.12.3). Die paramagnetischen Polymerpartikel („Beads“) wurden hierzu zunächst mit **32** funktionalisiert. Zur Kontrolle der Spezifität von **32** wurde eine tritylierte PEG-Biotin-Linkereinheit ohne Thiostrepton (**33**) als lipophile sphärische Sonde verwendet. Die Analyse der „Pulldown“-Experimente per SDS-PAGE zeigte eine generell relativ umfangreiche unspezifische Proteinbindung der mit der Kontrolle **33** funktionalisierten Beads (Abbildung 4.11.A). Dies ist jedoch für „Pulldown“-Experimente mit biotinylierten Molekülen generell der Fall, da viele Proteine unspezifisch mit Streptavidin

wechselwirken.^[22] Interessanterweise zeigten die Experimente mit dem Thiostrepton-PEG-Biotin-Addukt (**32**) eine Vielzahl von Proteinbanden, welche im Fall der Kontrolle (**33**) nicht auftraten.

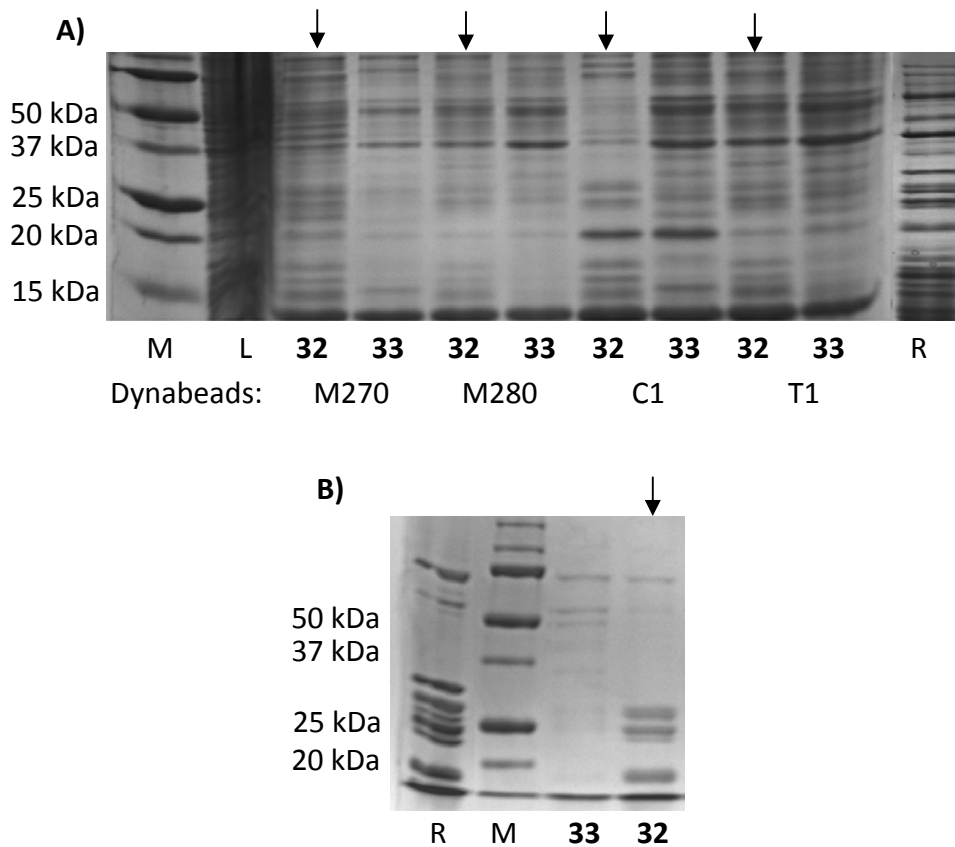


Abbildung 4.11: A) 15%ige SDS-PAGE (Coomassie gefärbt) des Pulldown-Experiments mit **32** unter Verwendung von *E. coli* XL1 blue Lysat. Es wurden hierbei vier unterschiedliche „Bead“-Sorten auf ihre Funktionalität getestet (Dynabeads M270, M280, C1 und T1, Invitrogen). Diese wurden zunächst mit **32** bzw. **33** (Kontrolle) funktionalisiert und im Anschluss mit dem bakteriellen Lysat versetzt. B) 15%ige SDS-PAGE der Verifizierung des „Pulldowns“ mit Dynabeads M270 mit isolierten 70S Ribosomen. M: Marker, R: isolierte *E. coli* Ribosomen.

Der Vergleich dieses zusätzlichen Bandenmuster entspricht hierbei dem Bandenmuster isolierter 70S Ribosomen aus *E. coli*. Am überzeugendsten ist dies im Fall der M270 „Beads“ sichtbar. Zur Verifizierung des Experiments wurden die M270 „Beads“ in „Pulldown“-Experimenten mit bereits isolierten Ribosomen eingesetzt (Abbildung 4.11.B). Diese Experimente bestätigten die Wirksamkeit und Selektivität von **32** für bakterielle 70S Ribosomen. Im Rahmen einer Zielstrukturidentifizierungsstudie wäre das „Pulldown“-Ergebnis ausreichend für die Isolierung und Analyse von Zielstrukturproteinen. Zur gezielten

Isolierung von 70S Ribosomen aus bakteriellen Lysaten im Sinne einer Affinitätsreinigung war das Vorgehen in Anbetracht der Vielzahl unspezifischer Proteinbindungen (trotz stringenter Waschschriffe mit PBS-T), noch nicht selektiv genug. Eine Möglichkeit zur Reduktion unspezifischer Bindung könnte in einer weiteren Optimierung des Streptavidin-Trägerharzes oder einer kovalenten Fixierung von **1** auf dem Trägerharz liegen. Darüberhinaus könnte auch ein Wechsel vom hier genutzten „Batch“-System zu einem Säulenformat hilfreich sein, um die Effizienz der Waschschriffe zu erhöhen. Problematisch in diesem Zusammenhang ist zusätzlich, dass zur Elution der Ribosomen thiopeptidische Liganden genutzt werden müssen. Diese Methodik erlaubt somit nur eine Reinigung von Ribosomen welche jedoch durch die Bindung des Thiopeptidliganden translationsinaktiv sind. Der Austausch charakteristischer Aminosäuren im L11 N-Terminus ermöglicht jedoch die Herstellung von Ribosomen, die trotz eines gebundenen Thiopeptidliganden translationsaktiv sind (siehe hierzu Kapitel 5).^[10b] Solche Ribosomen wären demnach auch nach einer Immobilisierung weiter translationsaktiv. Eine Anwendung für eine solche Methodik wäre z.B. die Herstellung von „Ribosomenmicroarrays“. Derartige „Arrays“ werden bereits zur Analyse ribosomaler Prozesse bis hin zur Einzelmolekülaufösung von sehr großem Interesse.^[23]

Neben seiner antibiotischen Aktivität im bakteriellen System ist für Thiostrepton (**1**) ebenfalls eine Aktivität in Eukaryoten beschrieben. Als potentielle Zielstrukturen kommen in diesem Zusammenhang, die 70S Ribosomen eukaryotischer Organellen prokaryotischen Ursprungs (Mitochondrien, Plastiden, Endosymbiontentheorie)^[24] oder weitere unidentifizierte eukaryotische Zielstrukturen in Frage.^[25] Das eukaryotische 80S Ribosom kann ausgeschlossen werden, da es keine Thiopeptidaffinität besitzt.^[26] Zur Identifizierung der eukaryotischen Zielstruktur wurden „Pulldown“-Experimente mit **32** und Hela-Zelllysaten^[27] durchgeführt (Abbildung 4.12). Es konnte jedoch mit keinem der vier unterschiedlichen Dynabead-Systeme das Auftreten bzw. eine Anreicherung charakteristischer Proteinbanden beobachtet werden. Dafür könnte es verschiedene Gründe geben. Setzt man z.B. mitochondriale Ribosomen als Zielstruktur voraus, ist es möglich, dass diese bedingt durch die Präparationsmethode nur in geringen Konzentrationen vorliegen. Die Zelllyse wurde durch mehrmaliges Aufziehen der Hela-Zellen mittels einer Spritze und einer 26 G-Kanüle erreicht. Diese Methode lässt jedoch Mitochondrien weitgehend intakt.^[28] Im Fall einer noch unidentifizierten zytosolischen Zielstruktur ist es möglich, dass der

Ansatzpunkt der PEG-Biotin-Einheit am azyklischen Molekülschwanz von **1** inhibitorisch für die Bindung ist. In Anbetracht der hohen Spezifität und Affinität der Thiostrepton-Ribosomen-Interaktion ist es relativ unwahrscheinlich, dass eine weitere Zielstruktur mit einem ähnlichen Bindungsmodus gebunden wird. Zudem könnte die absolute Affinität oder das Expressionsniveau in Hela-Zellen zu gering sein.

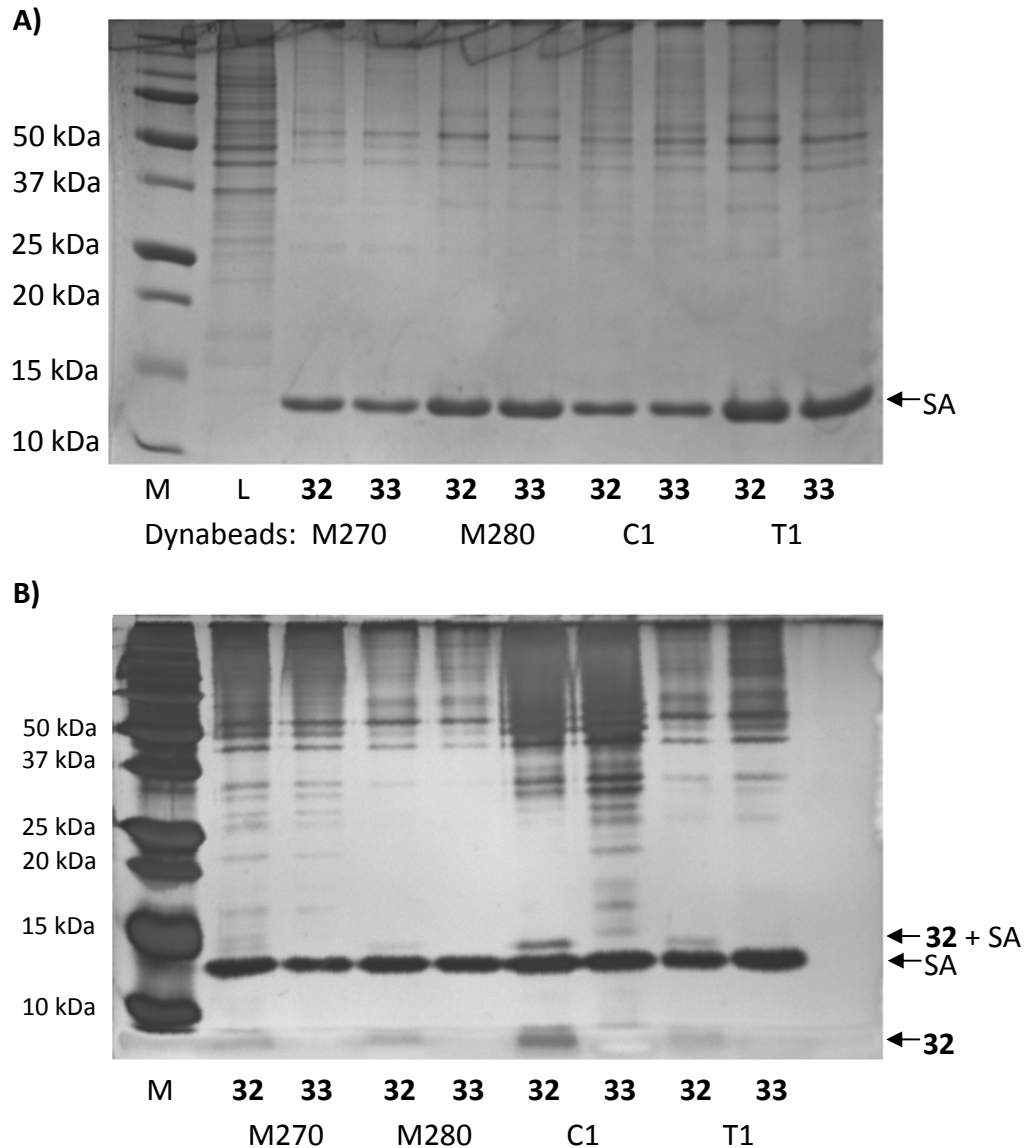
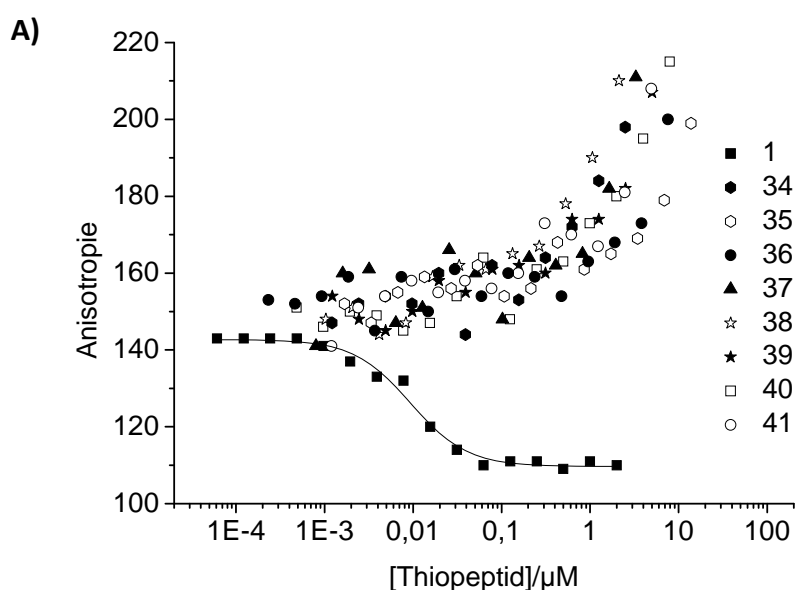


Abbildung 4.12: A) 15%ige SDS-PAGE (Coomassie gefärbt) des Pulldown-Experiments mit **32** unter Verwendung von Hela Lysat. Es wurden hierbei vier unterschiedliche „Bead“-Sorten auf ihre Funktionalität getestet (Dynabeads M270, M280, C1 und T1, Invitrogen). Diese wurden zunächst mit **32** bzw. **33** (Kontrolle) funktionalisiert und im Anschluss mit dem Hela-Lysat versetzt. B) 15%ige SDS-PAGE (Silber gefärbt) des Pulldown-Experiments mit **32** unter Verwendung von Hela Lysat. Diese Färbemethode detektierte neben Proteinen auch **32** selbst. M: Marker, L: Lysat, SA: Streptavidin.

Im Rahmen einer Kooperation mit Dipl. Biochem. Bernhard Ellinger und Dipl. Biochem. Sebastian Schoof konnte die eukaryotische Zielstruktur dennoch identifiziert werden. Es handelt sich hierbei um das 20S Proteasom.^[11c, 29] Die entsprechende Studie ist in Kapitel 7 der vorliegenden Arbeit dargelegt.

4.3 Totalsynthetische Nosiheptid-Derivate

In Anbetracht der hohen Affinität von Thiopeptidantibiotika an die ribosomale Zielstruktur und ihrem recht großen Molekulargewicht von 1-2 kDa^[1a] stellt sich die Frage, welcher Teil der Thiopeptidstruktur den biologisch aktiven Teil d.h. das Pharmakophor, stellt. Nosiheptid (**2**) ist mit einer Zielstrukturaffinität von 0,1 nM und einem MIC-Wert von 0,63 nM gegen MRSA (vgl. Abbildung 4.3),^[1c] einer der bemerkenswertesten Vertreter der Thiopeptidfamilie. Das Molekül war das Ziel einer Totalsynthesestudie im AK Arndt.^[12-13] Zur Identifikation biologisch-aktiver Fragmente von **2** wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit, unterschiedliche Synthesebausteine der Nosiheptid-Totalsynthese in Fluoreszenz-anisotropie-Bindungsstudien an die ribosomale 23S rRNA-L11-Komplexe (vgl. 2.13.2), sowie in *in vitro* Translationsinhibitionsstudien (2.14.2) analysiert. Die analysierten Fragmente ließen sich generell in drei Klassen unterteilen: 1. trisubstituierte Hydroxypyridin-Bausteine (**34-36**), 2. Bausteine mit offenem A-Ring (**37-39**) und 3. Bausteine mit geschlossenem A-Ring (**40-41**).



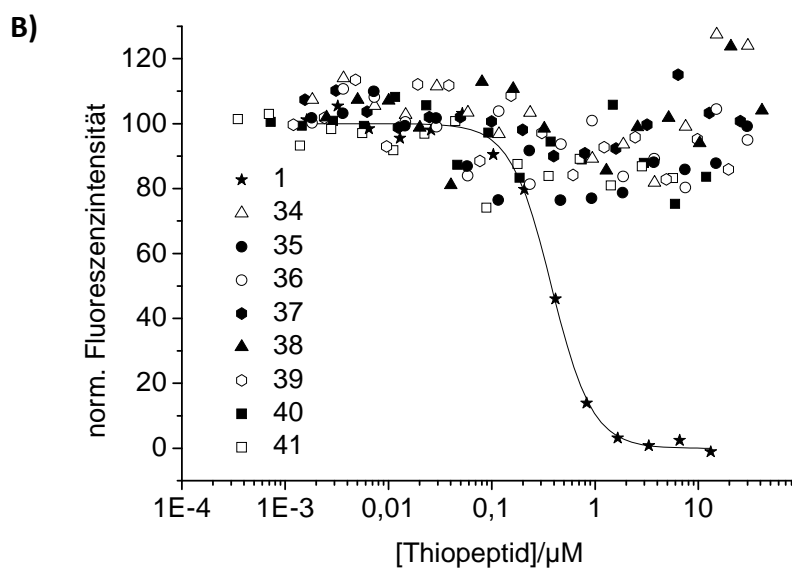


Abbildung 4.13: Fluoreszenzanisotropie-Bindungsstudien (A) und *in vitro* Translationsinhibitionsstudien (B) der totalsynthetischen Nosiheptidfragmente **34-41**.

Thiopeptid	K_D/nM	IC50
		Translationsinhibition in μM
1	$0,20 \pm 0,05$	$0,69 \pm 0,03$
34	-	-
35	-	-
36	-	-
37	-	-
38	-	-
39	-	-
40	-	-
41	-	-

Tabelle 4.5: K_D - und IC_{50} -Werte für die totalsynthetischen Nosiheptidfragmente **34-41**.

Bemerkenswerterweise, zeigte keines der totalsynthetischen Fragmente von **2** eine Bindung an die ribosomalen Komplexe. Die Verbindungen führten vielmehr zu einer Aggregation der fluoreszenten Thiostreptonsonde (**5**), welche sich in einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Anisotropiewerte manifestierte (Abbildung 4.13 A). Die Analyse der Aktivität von **34-41** in *in vitro* Translationsinhibitionsstudien untermauerte diese Resultate. Keine der Verbindung inhibierte die bakterielle Translation.

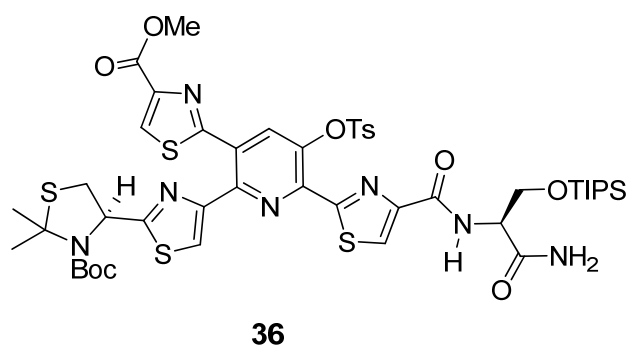
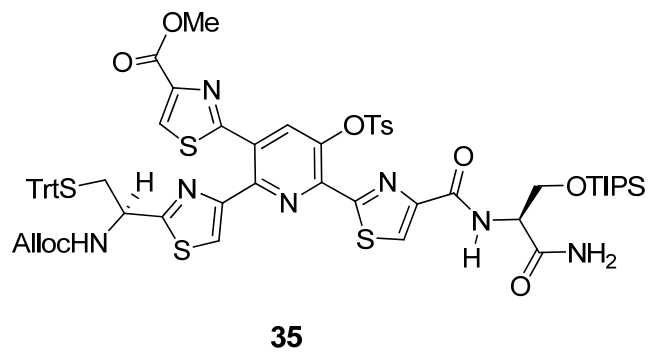
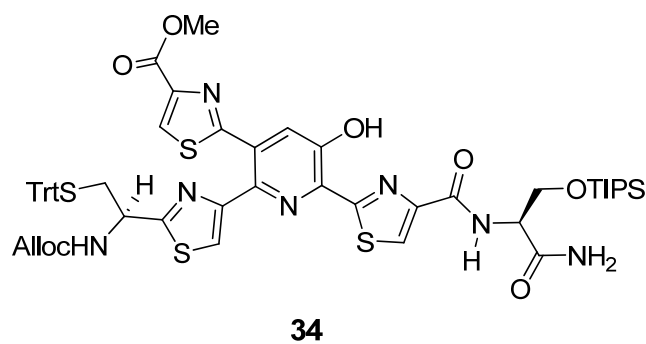
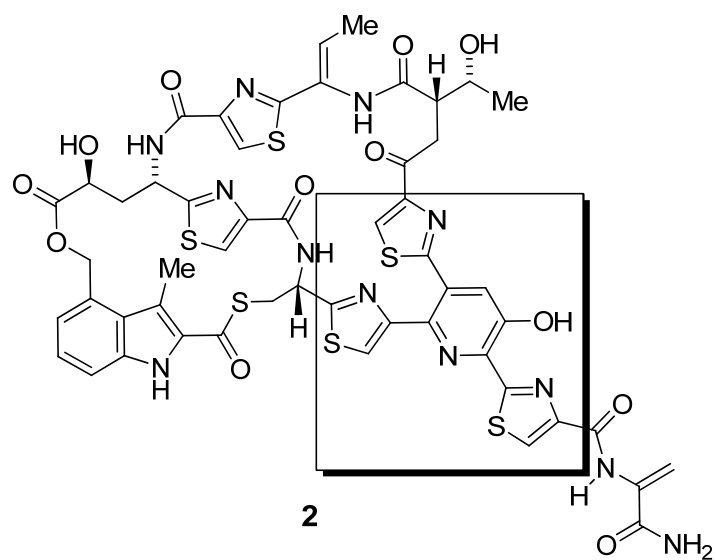


Abbildung 4.14: Chemische Strukturen der totalsynthetischen Nosiheptid-(2)-Fragmente **34-36**.

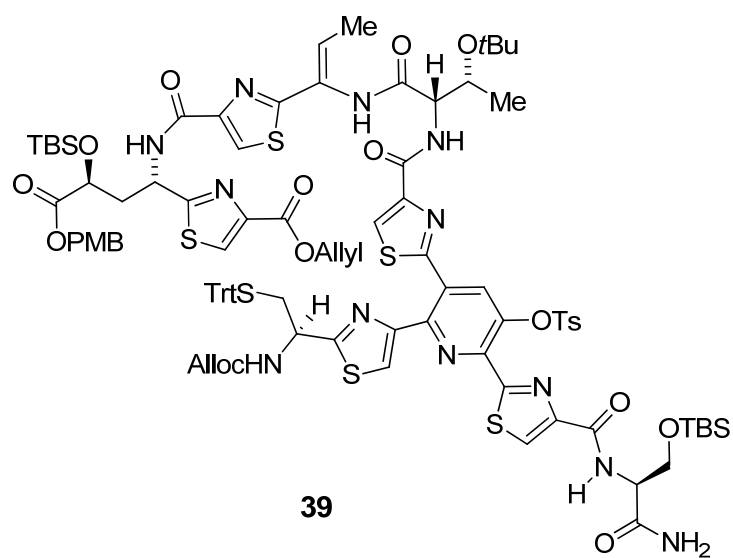
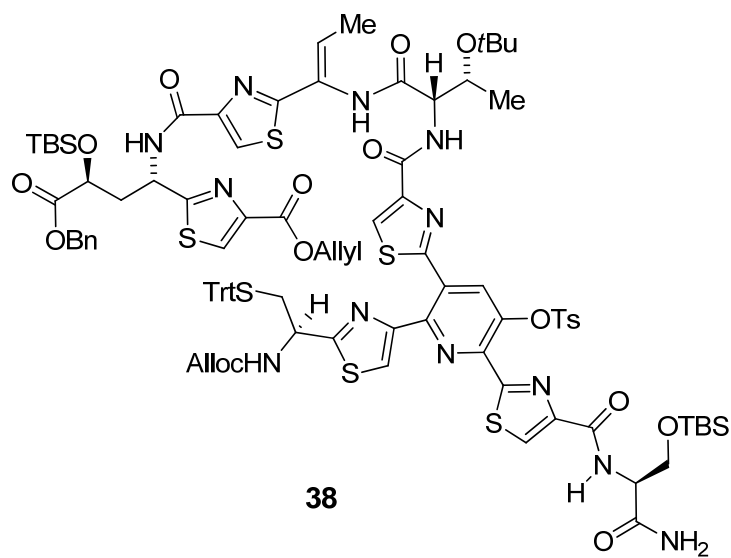
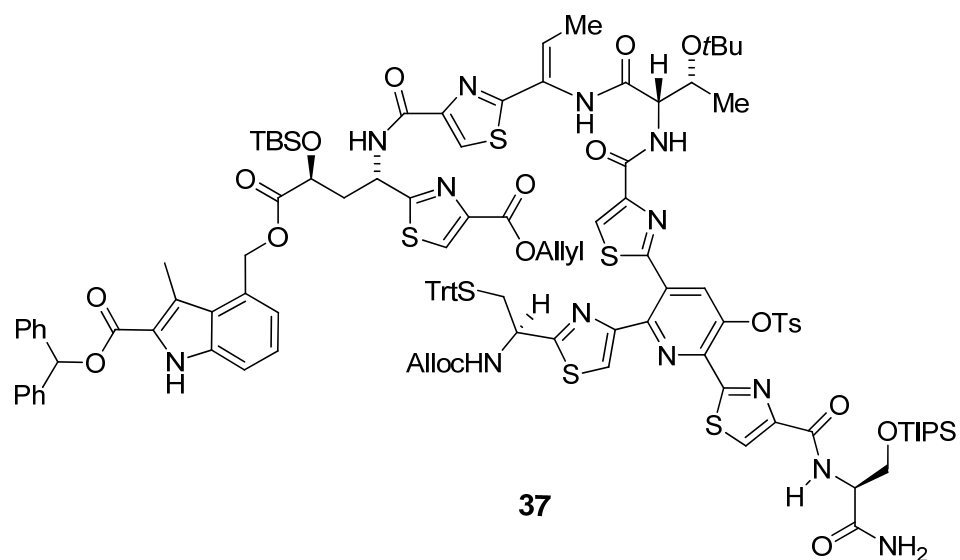


Abbildung 4.15: Chemische Strukturen der totalsynthetischen Nosiheptidfragmente **37-39**.

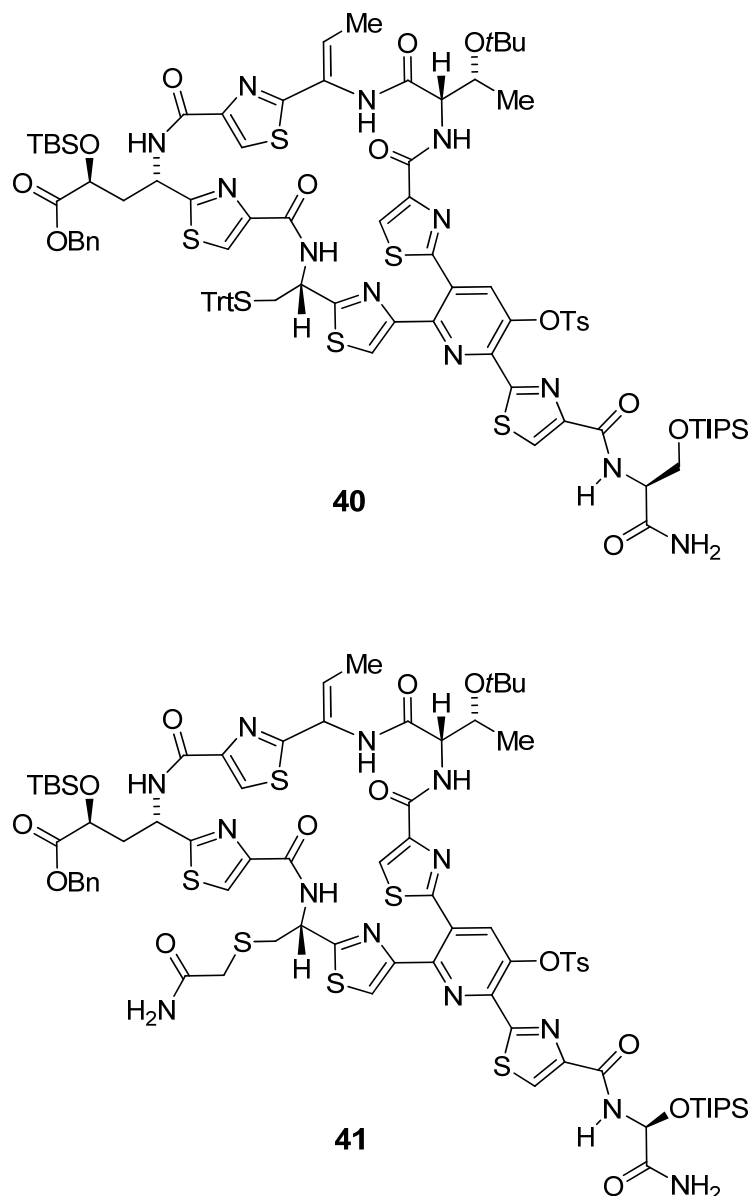


Abbildung 4.16: Chemische Strukturen der totalsynthetischen Nosiheptidfragmente **40-41**.

Ein mit **34-36** vergleichbares trisubstituiertes Hydroxypyridin wurde auch in einer kürzlich publizierten Studie in diversen *in vitro* Translationsmaschinerie-Testsystemen untersucht. Auch hier zeigte das entsprechende Fragment keine Bioaktivität.^[30] Interessanterweise, zeigte die Analyse der entsprechenden Moleküleinheit aus Thiostrepton (**1**), des Dehydropiperidin-Kerns, eine messbare Aktivität in den Translationsmaschinerie-Testsystemen^[30] als auch in *in vitro* Bakterienwachstumsinhibitionssystemen.^[25c] Diese unterschiedlichen Aktivitäten könnten ein Indiz für unterschiedliche Bindemodi von **1** und **2** sein. In der Tat sind die Positionen Kerneinheiten für **1** und **2** in den Kristallstrukturen beider

Verbindungen im Komplex mit der ribosomalen 50S Untereinheit, signifikant unterschiedlich.^[17] Überraschend ist jedoch die fehlende Aktivität der größeren Fragmente **38-41**, vor allem der Verbindungen mit einem intakten A-Ring. Gründe hierfür können einerseits im fehlenden B-Makrozyklus (B-Ring) bzw. in den vorhandenen Schutzgruppen liegen. Insbesondere die tert. Butyl-geschützte Hydroxylgruppe der Threonin-Einheit könnte hier eine Rolle spielen, da diese in der Kristallstruktur von **2** in H-Brückenentfernung zu N1 von A1067 befindet (Abbildung 4.17, H-Brücke B).^[17]

Die Schutzgruppe der Hydroxylgruppe der Hydroxypyridin-Einheit sollte sich nicht störend auswirken. Semisynthetische Modifikationen dieser Position, im mit **2** eng verwandten Nocathiacin zeigten, dass Modifikationen hier einen nur geringen Einfluss auf die Bioaktivität haben.^[4i] Generell können die Schutzgruppen zu einer sterischen Hinderung der Thiopeptidfragment-Zielstruktur-Interaktion führen. Antworten zu diesen Fragen würden vollständig schutzgruppenfreie Fragmente liefern, welche jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht verfügbar waren.

4.4 Diskussion

Die Kombination chemischer Semisynthese mit der biochemisch/biophysikalischen Analyse der semisynthetischen Produkte erlaubte neben der Herstellung physikochemisch-optimierter Derivate und wertvoller Werkzeugverbindungen, wie der fluoreszente Thiostreptonsonde und des Thiostrepton-PEG-Biotin-Konjugat, das vertiefte Studium der Wechselwirkung von Thiostrepton mit seiner ribosomalen Zielstruktur. Die Studien zeigten, dass der azyklische Molekülschwanz von Thiostrepton **1** nur geringen Einfluss auf die Bindung an die ribosomale Zielstruktur hat. Dieser Molekülteil eignete sich daher mit seinen reaktiven Dehydroaminosäuren (DHA1+2, Abbildung 4.17 A) hervorragend für semisynthetische Modifikationen in Form von *Sulfa*-Michael-Additionen.^[1c] Die Einführung polarer Gruppen (geladen oder ungeladen) zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit des Parentalmoleküls hat generell keinen Einfluss auf die Zielstrukturaffinität. Apolare Gruppen werden deutlich schlechter toleriert. Der Einfluss der Modifikationen auf die Bioaktivität der Verbindungen wurde erst in Wachstumsinhibitionsstudien mit *gram-positiven* Prokaryoten sichtbar. Hierbei zeigte sich, dass stark polare und negativ geladene/saure Gruppen deutliche Aktivitätsverluste verursachen. Der Grund hierfür ist voraussichtlich eine Verschlechterung der Zellgängigkeit der Verbindung, da lipophile oder positiv

geladene/basische Gruppen deutlich besser toleriert wurden. Vergleichbare semisynthetische Studien mit dem Thiopeptid Nocathiacin, bei denen ebenfalls der azyklische Molekülschwanz auf Basis von Michael-Additionen modifiziert wurde, wiesen in dieselbe Richtung.^[4h, 4k, 31] Eine wirksame Strategie um Wirkstoffe wasserlöslich und gleichzeitig auch zellpermeabel zu machen ist die Addition so genannter zellpenetrierender Peptide.^[32] Im Fall der Thiopeptide würde diese Strategie jedoch das bereits hohe Molekulargewicht dieser Verbindungen (1-2 kDa) noch weiter in die Höhe treiben. Ein vielversprechender Ansatz wäre in diesem Zusammenhang, die Verwendung kleinerer, bioaktiver, synthetischer Fragmente von Thiopeptidantibiotika. Studien von Nicolaou *et al.*^[25c] zeigten für den Dehydropiperidin-Kern von Thiostrepton **1** eine bemerkenswerte biologische Restaktivität in Wachstumsinhibitionsstudien mit *gram positiven* Prokaryoten, welche nur ca. 25-fach niedriger war als die Aktivität von Thiostrepton und nur ca. 5-fach niedriger als die von Vancomycin. Der dem Dehydropiperidin-Kern von Thiostrepton **1** entsprechende trisubstituierte Hydroxypyridin-Kern aus Nosiheptid **2**, zeigte hingegen keine Bioaktivität in den, im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro* Translationsinhibitionsstudien. Eine konkurrierende Studie, in der Fragmente unterschiedlicher Thiopeptide ihre Bioaktivität untersucht wurden, lieferte dieselben Resultate.^[30] Bemerkenswerterweise zeigte der Dehydropiperidin-Kern von Thiostrepton **1** in derselben Studie Bioaktivität. Dieser Sachverhalt legt die Vermutung nahe, dass **1** und **2** trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit, unterschiedliche Bindungsmodi am Ribosom besitzen. Die Kristallstrukturen der beiden Thiopeptide im Komplex mit der ribosomalen 50S Untereinheit stützen diese Vermutung.^[17] Die Mehrheit der in der vorliegenden Arbeit analysierten Nosiheptid-Fragmente enthielt noch chemische Schutzgruppen. Um signifikantere Aussagen über die Bioaktivität dieser Fragmente treffen zu können, ist es zwingend nötig die Experimente mit schutzgruppenfreien Verbindungen zu wiederholen.

Obwohl der Chinaldinsäure-Makrozyklus (B-Ring) von Thiostrepton (**1**) in der Kristallstruktur des Komplexes von **1** mit der ribosomalen 50S Untereinheit dem Lösungsmittel zugewandt ist,^[17] hatten selektive Modifikation des B-Ring-Dehydroalanins (DHA3) einen starken Einfluss auf die Zielstrukturaffinität. Die Bedeutung B-Ringstrukturen für die Thiopeptidbindung ist unklar. Eine mögliche Funktion wäre die Präorganisation der A-Ring Konformation, welche dann die hochaffine Bindung ermöglicht. Die Studien des B-Ring-geöffneten Derivats von **1** belegten die Wichtigkeit dieses Molekülteils für die Interaktion

mit der Zielstruktur. Möglicherweise führen die Modifizierungen des relativ rigiden B-Ring Dehydroalanins (DHA3), zu einer Destabilisierung des B-Rings, welche eine Verzerrung der Gesamtstruktur des Moleküls bewirkt. Aufschluss über den genauen Einfluss des B-Rings auf die Thiopeptidkonformation können in diesem Zusammenhang nur strukturelle Studien liefern. Eine weitere Funktion des B-Rings könnte jedoch auch ein direkter elektrostatischer Beitrag zur Bindung sein, wie es durch die mögliche H-Brücke zwischen der C8-Hydroxylgruppe der 8-Hydroxychinaldinsäure (QS) im B-Ring und N1 der RNA-Base A1067 in der Kristallstruktur^[17] angedeutet wird (Abbildung 4.18).

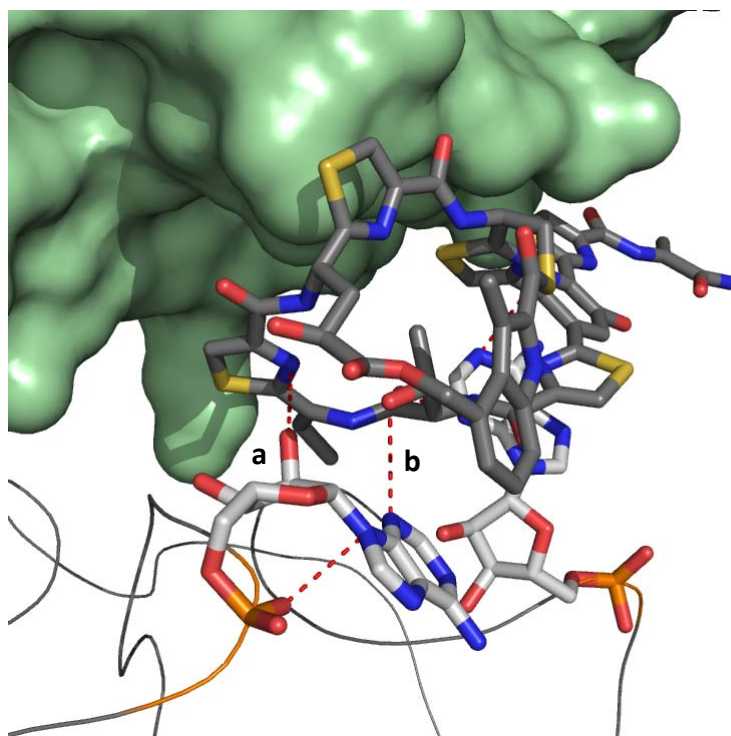


Abbildung 4.17: Darstellung möglicher Wasserstoffbrückenbindungen (a+b, rot gestrichelt, generiert mit PyMol) zwischen Nosiheptid **2** und A1067 (*E. coli* Nummerierung) der 23S rRNA, visualisiert auf Basis der Kristallstruktur des Komplexes von **2** und der ribosomalen 50S Untereinheit (PDB: 2zjp).^[17]

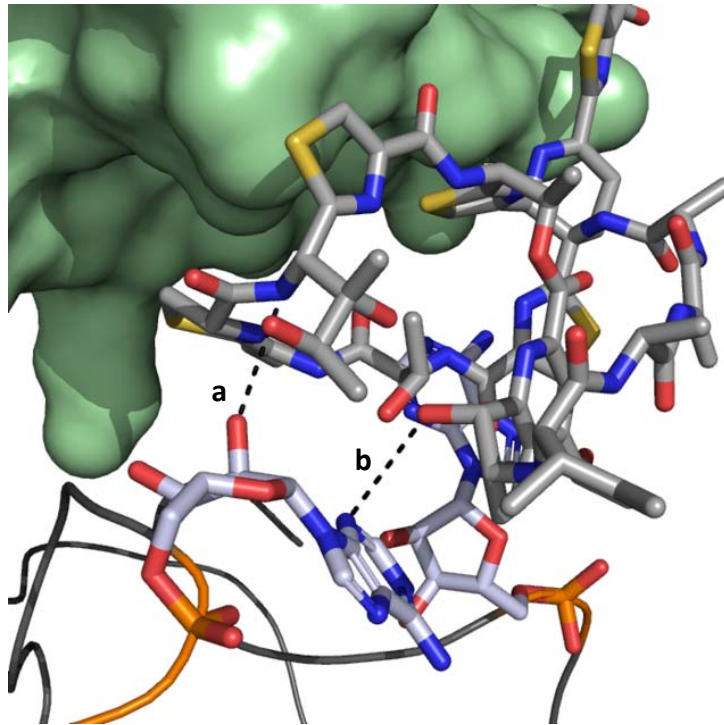


Abbildung 4.18: Darstellung möglicher Wasserstoffbrückenbindungen (a+b, schwarz gestrichelt, generiert mit PyMol) zwischen Thiostrepton **1** und A1067 (E. coli Nummerierung) der 23S rRNA, visualisiert auf Basis der Kristallstruktur des Komplexes von **1** und der ribosomalen 50S Untereinheit (PDB 3cf5).^[17]

Wie stark sich bereits kleine Änderungen der Makrozyklenstruktur von **1** auf die Affinität auswirken, zeigten die Studien des, an der Thiazolin-Einheit (THZ1) L-konfigurierten, Thiostreptonepipimers **28**, sowie des an dieser Stelle zum Thiazol oxidierten Derivats. Beide Verbindungen zeigten in den strukturellen NMR-Analysen signifikante Änderungen der A-Ring-Konfiguration, welche im Fall des Epimers zu 10-fachen Affinitätsverlusten im Vergleich zum Naturstoff führte. Die in diesem Zusammenhang durchgeführten „Docking“-Studien (genauer, die „Docking“-Lösungen mit dem besten „Docking Score“)^[21] belegten, dass sich **28** im Bereich des A-Rings deutlich schlechter in die Thiostreptonbindetasche zwischen 23S rRNA und L11-Protein einfügt und so wohlmöglich sterische Hinderungen die Affinitätsverluste bedingen. Die, im Fall der „Docking“-Lösungen des besten „Cluster Scores“,^[21] eingenommene Bindegeometrie des Thiostreptonepipimers, ist biochemisch nicht belegt und damit unwahrscheinlich. Durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte „Proximity-Induced Covalent Capture“ Technik^[33] (siehe hierzu Kapitel 6.2.1), konnte für **28**, eine Reaktivität an den Positionen G24C und P25C detektiert werden. Eine

solche Reaktion wäre in der „Docking“-Lösung nicht möglich, da die Dehydroaminosäuren des azyklischen Molekülschwanzes von **28** zu weit von den eingeführten Cystein-Einheiten entfernt wären. Bemerkenswert für die „Docking“-Lösungen von Thiostrepton ist jedoch, dass die einzigen detektierten Kontakte zwischen **1** und RNA, ausschließlich die beiden essentiellen Nukleobasen A1067 und A1095 einbeziehen.

Die „Docking“-Lösungen des besten „Cluster Scores“ für Thiostrepton (Abbildung 4.17) deuteten interessanterweise drei mögliche H-Brücken zwischen Thiostrepton und der RNA-Base A1067 an. Eine der drei H-Brücken (Abbildung 4.17+20) involviert hierbei, ähnlich der Situation in der Kristallstruktur, das N1-Atom der A1067 Adenin-Einheit. Das Gegenstück ist in diesem Fall nicht die C8-Hydroxylgruppe der 8-Hydroxychinaldinsäure,^[17] (vgl. Abbildung 4.18), sondern die Hydroxylgruppen der Threonin-Einheit (THR) des A-Rings. Die zwei verbleibenden möglichen H-Brücken binden die „Riboseeinheit“ von A1067 ein. Diese werden in der „Docking“-Lösung von den beiden Hydroxylgruppen der bishydroxylierten Isoleucin-Einheit (ILE) aufgebaut. Die dem A-Ring nähere Hydroxylgruppe wechselwirkt hierbei mit der 2'OH-Gruppe der Ribose. Die zweite Hydroxylgruppe geht eine mögliche H-Brückenbindung mit dem Sauerstoff des Riboseheterozyklus ein. Die Acetylierung dieser OH-Gruppe (Verbindung **31**) führt zu einer ca. 10-fachen Reduzierung der Bindungsaffinität (Tabelle 4.3) und legt so ebenfalls eine mögliche Rolle dieser Funktionalität in der Ausbildung einer H-Brücke nahe.

Sowohl in der Kristallstruktur als auch im „Docking“, treten die 2'OH-Gruppe der Ribose, wie auch N1 der Adenin-Einheit als H-Brückenbindungspunkte zwischen der 23S rRNA und bizyklischen Thiopeptiden wie **1** (Abbildung 4.18-20) und **2** (Abbildung 4.17 und 4.20) auf. Auch frühere „Docking“-Studien von Lentzen *et al.* machten diese Wechselwirkungen wahrscheinlich.^[34] Die 2'OH-Gruppe von A1067 spielt eine wichtige Rolle im Resistenzmechanismus des Thiostreptonproduzenten *Streptomyces azureus* (siehe hierzu auch Kapitel 5).^[35] Die N1-Position des Adenins ist darüberhinaus in „RNA-Footprinting“ Studien von Thiostrepton mit DMS, vor der Methylierungsreaktion abgeschirmt.^[36] Interessanterweise, bewirkt auch die Bindung von EF-G eine Abschirmung gegen die chemische Methylierung von N1 von A1067.^[37] Dieser Sachverhalt unterstreicht die Wichtigkeit dieser Funktionalitäten. Sowohl die Komplex-Kristallstruktur von **2**^[17] als auch die „Docking“-Lösung **1**^[38] weisen auf mögliche H-Brücken hin, welche jeweils über die Threonin-Einheit der Thiopeptide und N1 von A1067 aufgebaut werden (Abbildung 4.19+20).

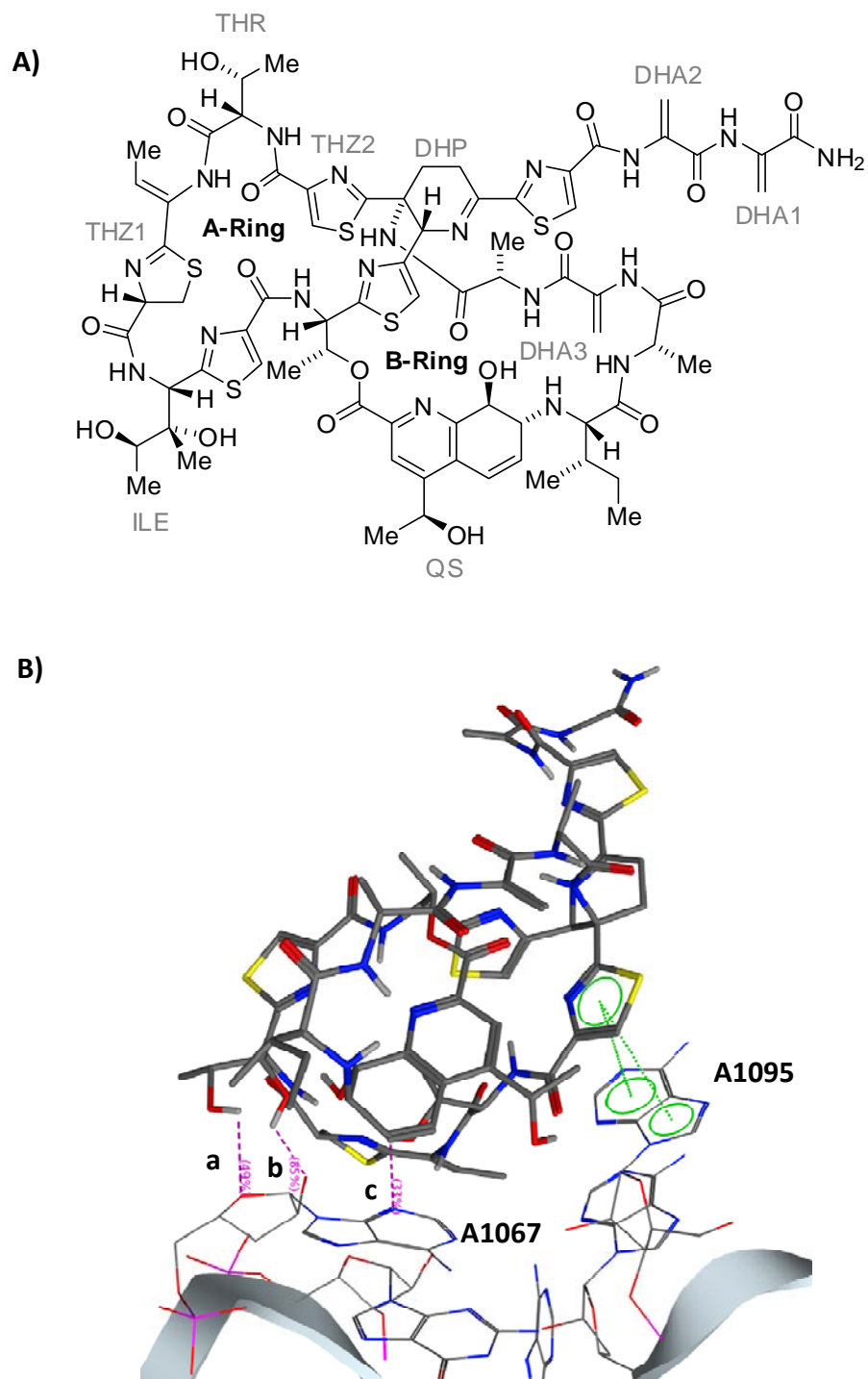


Abbildung 4.19: A) Chemische Struktur von Thiostrepton (**1**). Wichtige Gruppen sind markiert. B) Darstellung möglicher Wasserstoffbrückenbindungen (a-c, pink gestrichelt) bzw. π -Stapel-Wechselwirkung (grün) zwischen Thiostrepton **1** und den Nucleobasen A1067 und A1096 (*E. coli* Nummerierung) der 23S rRNA, visualisiert auf Basis des in silico „Dockings“ von **1** in die Kristallstruktur des Komplexes zwischen **1** und der ribosomalen 50S Untereinheit (PDB: 3cf5).

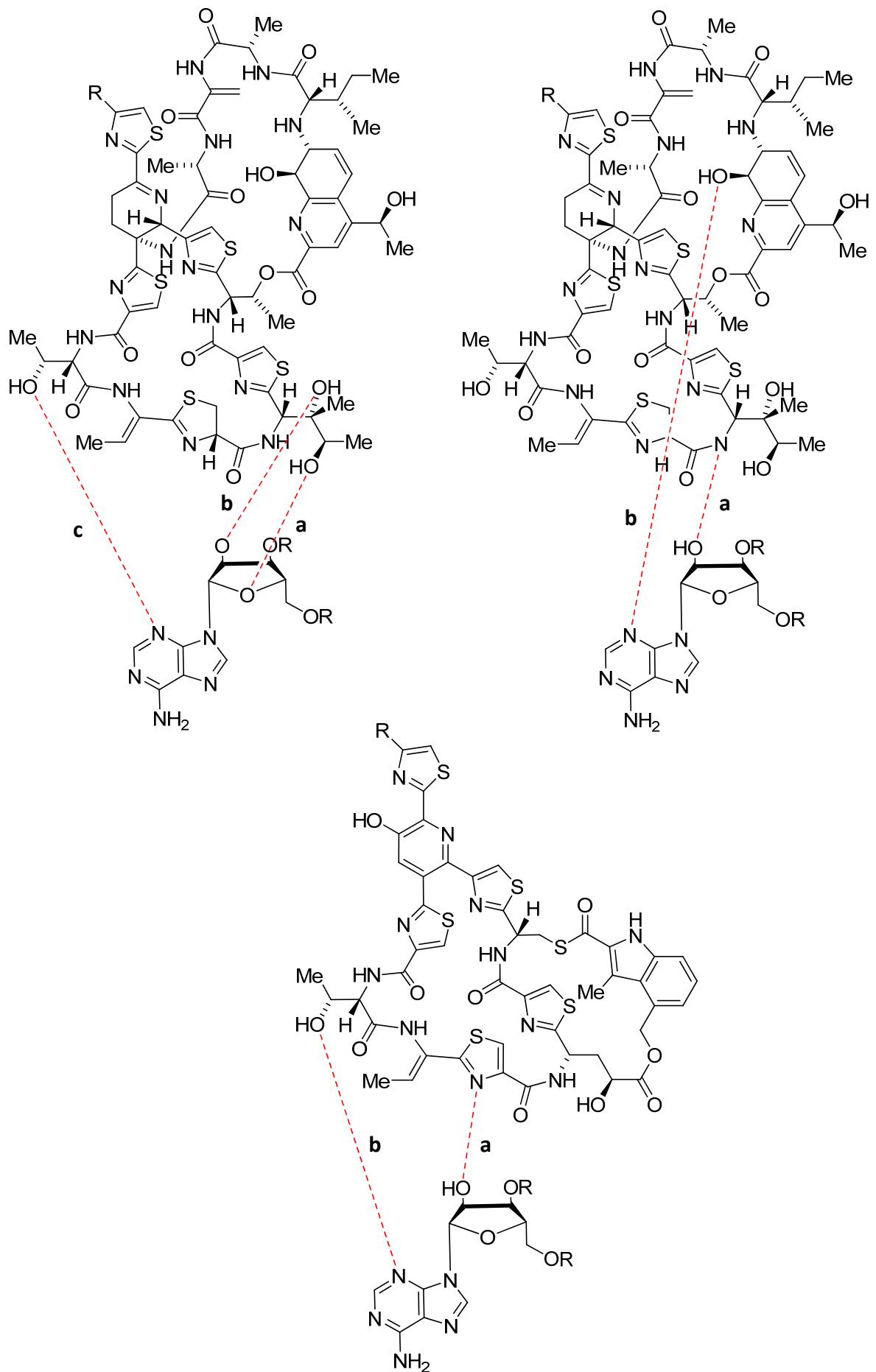


Abbildung 4.20: Modelle möglicher H-Brückennetzwerke zwischen A1067 und Thiopeptidantibiotika auf Basis des semi-relaxierten „Docking“ von **1** (A) sowie den Kristallstrukturen der Komplexe von **1** (B) und **2** (C) mit der ribosomalen 50S Untereinheit.^[17] Die Klein-Buchstabenkennzeichnung der H-Brücken entspricht der aus Abbildung 4.17-19.

Die Abwesenheit eines Stickstoffatoms an dieser Position, wie z.B. bei der Mutation von A1067 zu Pyrimidinbasen, führt zu starken Affinitätsverlusten, wohingegen ein Guanin an dieser Position die Affinität nicht beeinflusst (vgl. Kapitel 5). Eine gezielte Modifizierung des Threonin-Hydroxyls wird in Zukunft die Wichtigkeit dieser Funktionalität als H-Brücken-Donor klären.

Trotz all der Anzeichen für mögliche H-Brücken zwischen Thiopeptid und Zielstruktur sind diese für die hohen Zielstrukturaffinitäten der Thiopeptide, als auch zur Erklärung der bemerkenswerten Affinitätsverluste im Falle einiger semisynthetischen Derivate, wie z.B. dem Thiostreptonepimer **28**, nicht zwingend notwendig. Auch eine rein hydrophobe Interaktion ist denkbar.^[17] Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten PICC-Studien (Kapitel 6) legen nahe, dass die hochaffine Bindung von **1** an den L11-23S rRNA-Komplex primär durch die optimale, zur Zielstruktur komplementäre Form des Thiopeptids ermöglicht wird. Das Molekül scheint hierbei stabilisierend, wie ein Imitat eines ribosomalen Faktors, an eine bestimmte Konformation des L11-23S rRNA-Komplexes zu binden, ohne hierbei weitere Konformationsänderungen des ribosomalen Komplexes auszulösen. Der Hauptteil der in diesem Kapitel beschriebenen affinitätsreduzierenden Modifizierungen hat einen direkten Einfluss auf die Gesamtkonformation von **1** oder sie verändern die Ausmaße bestimmter Molekülteile. Solche Modifizierungen führen dazu, dass das Thiopeptid sterisch nicht mehr in die ribosomale Bindetasche passt und somit Bindungsaffinität verliert. Denselben Effekt hätte auch die 2'-O-Methylierung von A1067 im Fall des Thiostreptonresistenzmechanismus.^[35, 39] Um einen genaueren Einblick in die chemische Natur der Thiopeptid-Zielstruktur-Interaktion zu erhalten, sind in Zukunft hochaufgelöste strukturelle Studien notwendig.

Die Analyse semi- und totalsynthetischer Thiopeptidderivate legte dar, dass die Modifizierbarkeit des Thiopeptidgrundgerüst Grenzen unterliegt. Die Kenntnis sowie die Überschreitung dieser Grenzen lieferten jedoch wichtige Informationen über die Natur der Thiopeptid-Zielstruktur-Interaktion. Die hier gesammelten Erkenntnisse werden in Zukunft

dazu nützlich sein, potente und möglicherweise vom Thiopeptidgrundgerüst abweichende Analoga mit einem optimierten pharmakologischen Profil zu entwickeln.

4.5 Referenzen

- [1] a) M. C. Bagley, J. W. Dale, E. A. Merritt, X. Xiong, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 685-714; b) R. A. Hughes, C. J. Moody, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8076-8101; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 7930-7954; c) S. Schoof, S. Baumann, B. Ellinger, H. D. Arndt, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 242-245; d) M. J. Pucci, J. J. Bronson, J. F. Barrett, K. L. DenBleyker, L. F. Discotto, J. C. Fung-Tomc, Y. Ueda, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 3697-3701; e) S. B. Singh, J. Occi, H. Jayasuriya, K. Herath, M. Motyl, K. Dorso, C. Gill, E. Hickey, K. M. Overbye, J. F. Barrett, P. Masurekar, *J. Antibiot.* **2007**, *60*, 565-571.
- [2] P. Ehrlich, *Dtsch Chem. Ges.* **1909**, *42*, 17-47.
- [3] a) B. Wilkinson, J. Micklefield, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 379-386; b) S. B. Zotchev, *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 616-617; c) A. A. Bowers, M. G. Acker, A. Koglin, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7519-7527.
- [4] a) H. D. Arndt, C. P. Hackenberger, D. Schwarzer, *Chemie in unserer Zeit* **2010**, *44*, 130-137; b) F. von Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, D. Häbich, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5194-5254; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 5072-5129; c) M. G. Acker, A. A. Bowers, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17563-17565; d) R. P. Morris, J. A. Leeds, H. U. Naegeli, L. Oberer, K. Memmert, E. Weber, M. J. LaMarche, C. N. Parker, N. Burrer, S. Esterow, A. E. Hein, E. K. Schmitt, P. Krastel, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5946-5955; e) T. P. Connolly, A. Regueiro-Ren, J. E. Leet, D. M. Springer, J. Goodrich, X. S. Huang, M. J. Pucci, J. M. Clark, J. J. Bronson, Y. Ueda, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 550-553; f) A. Regueiro-Ren, B. N. Naidu, X. Zheng, T. W. Hudyma, T. P. Connolly, J. D. Matiskella, Y. Zhang, O. K. Kim, M. E. Sorenson, M. Pucci, J. Clark, J. J. Bronson, Y. Ueda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 171-175; g) A. Regueiro-Ren, Y. Ueda, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8699-8702; h) B. N. Naidu, M. E. Sorenson, J. J. Bronson, M. J. Pucci, J. M. Clark, Y. Ueda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2069-2072; i) B. N. Naidu, M. E. Sorenson, T. Hudyma, X. Zheng, Y. Zhang, J. J. Bronson, M. J. Pucci, J. M. Clark, Y. Ueda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3743-3746; j) B. N. Naidu, M. E. Sorenson, J. D. Matiskella, W. Li, J. B. Sausker, Y. Zhang, T. P. Connolly, K. S. Lam, J. J. Bronson, M. J. Pucci, H. Yang, Y. Ueda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3545-3549; k) B. N. Naidu, M. E. Sorenson, Y. Zhang, O. K. Kim, J. D. Matiskella, J. A. Wichtowski, T. P. Connolly, W. Li, K. S. Lam, J. J. Bronson, M. J. Pucci, J. M. Clark, Y. Ueda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5573-5577; l) C. L. Myers, P. C. Hang, G. Ng, J. Yuen, J. F. Honek, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 4231-4237.
- [5] a) K. C. Nicolaou, D. Vourloumis, N. Winssinger, P. S. Baran, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 44-122; b) K. C. Nicolaou, S. A. Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2004**, *101*, 11929-11936; c) K. C. Nicolaou, E. J. Sorensen, *Classics in total synthesis : targets, strategies, methods*, VCH, Weinheim ; New York, **1996**; d) K. C. Nicolaou, S. A. Snyder, *Classics in total synthesis II : more targets, strategies, methods*, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.
- [6] a) H. D. Arndt, S. Schoof, J. Y. Lu, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6900-6904; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 6770-6773; b) C. Li, W. L. Kelly, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 153-164; c) L. C. Wieland Brown, M. G. Acker, J. Clardy, C. T. Walsh, M. A. Fischbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2009**, *106*, 2549-2553; d) R. Liao, L. Duan, C. Lei, H. Pan, Y. Ding, Q. Zhang, D. Chen, B. Shen, Y. Yu, W. Liu, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 141-147; e) W. L. Kelly, L. Pan, C. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4327-4334; f) Y. Yu, L. Duan, Q. Zhang, R. Liao, Y. Ding, H. Pan, E. Wendt-Pienkowski, G. Tang, B. Shen, W. Liu, *ACS Chem. Biol.* **2009**; g) M. Wei, S. Wang, Y. Fang, Y. Chen, *Bioresour. Technol.* **2010**, *101*, 3617-3622.
- [7] P. Hrcniar, Y. Ueda, S. Huang, J. E. Leet, J. J. Bronson, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8789-8793.

- [8] T. Suzuki, T. Yamane, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1987**, *25*, 526-531.
- [9] S. Schoof, Dissertation, TU Dortmund (Dortmund), **2010**.
- [10] a) H. D. Arndt, S. Schoof, S. Baumann, *PCT/EP2009/001949*; b) S. Baumann, S. Schoof, M. Bolten, C. Haering, M. Tagaki, K. Shin-Ya, H. D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6973-6981.
- [11] a) H. D. Arndt, S. Schoof, S. Baumann, B. Ellinger, *PCT/EP2009/001948*; b) S. Schoof, G. Pradel, M. N. Aminake, B. Ellinger, S. Baumann, M. Potowski, Y. Najajreh, M. Kirschner, H. D. Arndt, *Angew Chem* **2010**, *122*, 3389-3393; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 3317-3321;
- [12] M. Riedrich, Dissertation, TU Dortmund (Dortmund), **2009**.
- [13] J.-Y. Lu, Dissertation, TU Dortmund (Dortmund), **2009**.
- [14] a) M. Riedrich, S. Harkal, H. D. Arndt, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7031-7035; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 2701-2703; b) J. Y. Lu, M. Riedrich, M. Mikyna, H. D. Arndt, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 8281-8284; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 8137-8140; c) J. Y. Lu, H. D. Arndt, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 4205-4212; d) J. Y. Lu, J. A. Keith, W. Z. Shen, M. Schurmann, H. Preut, T. Jacob, H. D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13219-13221.
- [15] a) M. L. Chiu, M. Folcher, P. Griffin, T. Holt, T. Klatt, C. J. Thompson, *Biochemistry* **1996**, *35*, 2332-2341; b) M. L. Chiu, M. Folcher, T. Katoh, A. M. Puglia, J. Vohradsky, B. S. Yun, H. Seto, C. J. Thompson, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20578-20586.
- [16] K. C. Nicolaou, M. Zak, B. S. Safina, A. A. Estrada, S. H. Lee, M. Nevalainen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11176-11183.
- [17] J. M. Harms, D. N. Wilson, F. Schluenzen, S. R. Connell, T. Stachelhaus, Z. Zaborowska, C. M. Spahn, P. Fucini, *Mol. Cell.* **2008**, *30*, 26-38.
- [18] P. H. Anborgh, A. Parmeggiani, *EMBO J.* **1991**, *10*, 779-784.
- [19] S. Schoof, H. D. Arndt, *Chem. Commun.* **2009**, 7113-7115.
- [20] a) B. Anderson, D. C. Hodgkin, M. A. Viswamitra, *Nature* **1970**, *225*, 233-235; b) C. S. Bond, M. P. Shaw, M. S. Alphey, W. N. Hunter, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2001**, *57*, 755-758.
- [21] a) D. S. Goodsell, A. J. Olson, *Proteins* **1990**, *8*, 195-202; b) D. S. Goodsell, G. M. Morris, A. J. Olson, *J. Mol. Recognit.* **1996**, *9*, 1-5; c) G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. Huey, A. J. Olson, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1996**, *10*, 293-304; d) G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. S. Halliday, R. Huey, W. E. Hart, R. K. Belew, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639-1662; e) R. Huey, G. M. Morris, A. J. Olson, D. S. Goodsell, *J. Comput. Chem.* **2007**, *28*, 1145-1152.
- [22] B. J. Leslie, P. J. Hergenrother, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1347-1360.
- [23] a) S. Uemura, R. Iizuka, T. Ueno, Y. Shimizu, H. Taguchi, T. Ueda, J. D. Puglisi, T. Funatsu, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, e70; b) S. C. Blanchard, H. D. Kim, R. L. Gonzalez, Jr., J. D. Puglisi, S. Chu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2004**, *101*, 12893-12898.
- [24] L. Margulis, M. F. Dolan, *Sciences* **1997**, *37*, 20-25.
- [25] a) M. Schlitzer, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 944-986; b) M. Ueno, S. Furukawa, F. Abe, M. Ushioda, K. Fujine, S. Johki, H. Hatori, H. Ueda, *J. Antibiot.* **2004**, *57*, 590-596; c) K. C. Nicolaou, M. Zak, S. Rahimpour, A. A. Estrada, S. H. Lee, A. O'Brate, P. Giannakakou, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15042-15044; d) B. D. Bowling, N. Doudican, P. Manga, S. J. Orlow, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2008**, *63*, 37-43; e) U. G. Bhat, P. A. Zipfel, D. S. Tyler, A. L. Gartel, *Cell Cycle* **2008**, *7*, 1851-1855; f) G. A. McConkey, M. J. Rogers, T. F. McCutchan, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 2046-2049; g) M. Sullivan, J. Li, S. Kumar, M. J. Rogers, T. F. McCutchan, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, *109*, 17-23; h) S. Chaubey, A. Kumar, D. Singh, S. Habib, *Mol. Microbiol.* **2005**, *56*, 81-89.
- [26] A. Garcia-Marcos, A. Morreale, E. Guarinos, E. Briones, M. Remacha, A. R. Ortiz, J. P. Ballesta, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 7109-7117.
- [27] J. R. Masters, *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 315-319.
- [28] P. Bozidis, C. D. Williamson, A. M. Colberg-Poley, *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2007**, *Chapter 3*, Unit 3 27.

- [29] S. Schoof, G. Pradel, M. N. Aminake, B. Ellinger, S. Baumann, M. Potowski, Y. Najajreh, M. Kirschner, H. D. Arndt, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3389-3393; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 3317-3321.
- [30] A. L. Starosta, H. Qin, A. Mikolajka, G. Y. Leung, K. Schwinghammer, K. C. Nicolaou, D. Y. Chen, B. S. Cooperman, D. N. Wilson, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1087-1096.
- [31] B. N. Naidu, M. E. Sorenson, T. P. Connolly, Y. Ueda, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 10098-10102.
- [32] a) H. D. Herce, A. E. Garcia, *J. Biol. Phys.* **2007**, *33*, 345-356; b) K. M. Wagstaff, D. A. Jans, *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 1371-1387.
- [33] S. Baumann, S. Schoof, S. D. Harkal, H. D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5664-5666.
- [34] G. Lentzen, R. Klinck, N. Matassova, F. Aboul-ela, A. I. Murchie, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 769-778.
- [35] a) E. Cundliffe, *Nature* **1978**, *272*, 792-795; b) A. Bechthold, H. G. Floss, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *224*, 431-437; c) M. S. Dunstan, P. C. Hang, N. V. Zelinskaya, J. F. Honek, G. L. Conn, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 17013-17020; d) C. J. Thompson, J. M. Ward, D. A. Hopwood, *J. Bacteriol.* **1982**, *151*, 668-677.
- [36] J. Egebjerg, S. Douthwaite, R. A. Garrett, *EMBO J.* **1989**, *8*, 607-611.
- [37] D. Moazed, J. M. Robertson, H. F. Noller, *Nature* **1988**, *334*, 362-364.
- [38] H. R. A. Jonker, S. Baumann, A. Wolf, S. Schoof, F. Hiller, K. W. Schulte, K. K. Kirschner, H. Schwalbe, H. D. Arndt, *eingereicht* **2010**.
- [39] J. Thompson, F. Schmidt, E. Cundliffe, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 7915-7917.

Kapitel 5

Molekulare Determinanten der mikrobiellen Resistenz gegen Thiopeptidantibiotika

Teile dieses Kapitels sind bereits publiziert:

1. S. Baumann, S. Schoof, M. Bolten, C. Haering, M. Tagaki, K. Shin-Ya, and H. -D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6973-6981.

5.1 Einleitung

Die Resistenzentwicklung pathogener Prokaryoten gegen häufig eingesetzte Standardantibiotika ist eine stetig wachsende Bedrohung für die menschliche Gesundheit.^[1] Um die involvierten Pathogene zu bekämpfen, werden neue Strategien und Moleküle mit bisher ungenutzten antibiotischen Wirkungsmechanismen intensiv erforscht.^[2] Trotz einiger physikochemischer Nachteile für die Humanapplikation (siehe Kapitel 1) stellen die antibakteriell hochpotenten Thiopeptidantibiotika in diesem Zusammenhang einen vielversprechenden Ausgangspunkt dar.^[3] Die Verbindungen binden zum einen an einen Teil der als Zielstruktur klinisch bisher ungenutzten GTPase-assoziierten Region des bakteriellen Ribosoms, genauer an den Komplex der 23S rRNA und des ribosomalen L11-Proteins. Darüberhinaus existierten bisher keine Hinweise auf die Entwicklung von Resistenzen gegen Thiopeptidantibiotika *in vivo*, ein wichtiger Befund in Anbetracht der Tatsache, dass Thiopeptidantibiotika wie Nosiheptid (**2**) als Futterzusatz in der Tiermast eingesetzt werden.^[4] Im Rahmen von gezielten *in vitro* Selektionsstudien wurde jedoch für einige bakterielle Spezies das Auftreten spontaner Thiopeptidresistenzen beschrieben.^[5] Die gefundenen Mutationen für das L11-Protein erstreckten sich hierbei vom Austausch einzelner Aminosäuren bis hin zum vollständigen Verlust des gesamten Proteins bzw. der N-terminalen Ligandenbindedomäne. Der Austausch von Einzelaminosäuren wurde hierbei hauptsächlich innerhalb einer prolinreichen Helix festgestellt (21-PPVGPALQQH-30, *Thermus thermophilus* Sequenz und Nummerierung).^[5d] Für die rRNA wurden bisher ausschließlich Mutationen der Nucleobasen A1067 und A1095 beschrieben, welche zur Thiopeptidresistenz führen.^[5j, 5k] Die genauen Positionen der in die Resistenzentwicklung involvierten Aminosäuren und Nucleobasen sind in Abbildung 5.1 A dargestellt. Einige thiopeptidproduzierende Streptomyceten exprimieren darüberhinaus eine spezifische Methyltransferase, welche die 2'-O-Methylierung der Nucleobase A1067 katalysiert und die Organismen so hochgradig thiopeptidresistent macht.^[5e, 5f, 5h, 5i, 6] Über diese Informationen hinaus ist die molekulare Basis der Thiopeptidresistenz weitgehend unverstanden. Zum genaueren Verständnis dieser molekularen Grundlagen wurden deshalb im Rahmen dieser Arbeit Bindestudien mit einer Kollektion verschiedener L11-Protein und 23S rRNA-Punktmutanten in isolierten L11-RNA-Komplexen wie auch vollständigen Ribosomen durchgeführt und quantitative Gleichgewichtsbindedaten bestimmt. Darüberhinaus wurden

einige der Mutationen rekonstituiert um ihren Einfluss in lebenden Zellen zu studieren. Die Ergebnisse dieser Studien werden in diesem Kapitel dargelegt und diskutiert.

5.2 Studien zur Interaktion von Thiopeptidantibiotika mit 23S rRNA und L11-Mutanten

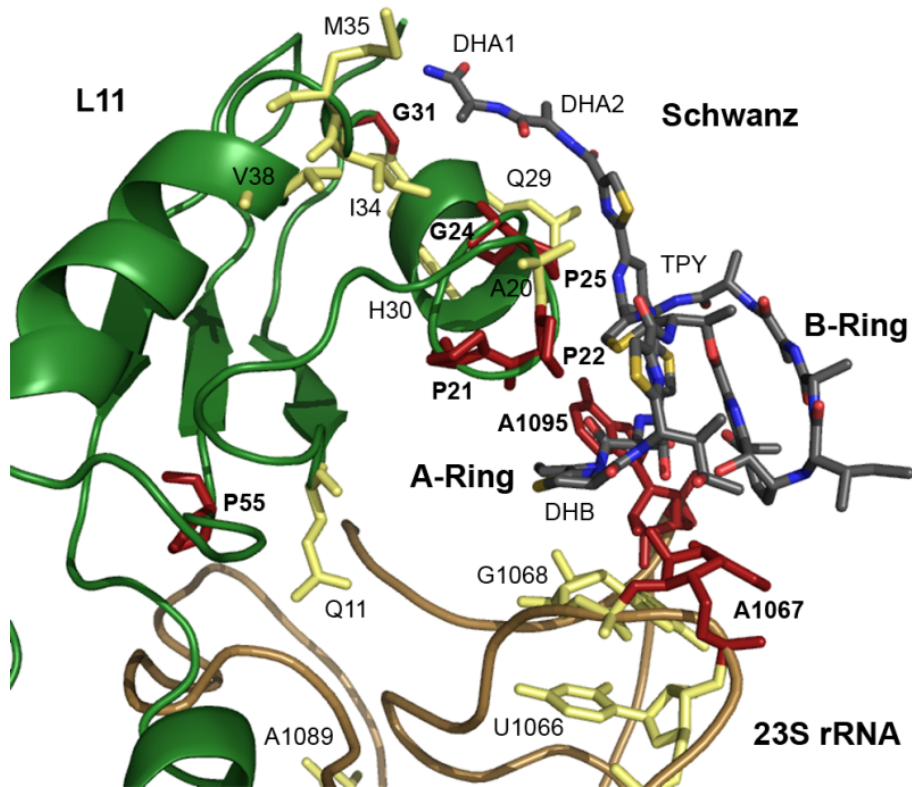
5.2.1 Mutanten der 23S rRNA

Zur quantitativen Analyse der Bindung von Thiopeptiden an Mutanten der ribosomalen GTPase-assoziierten Region wurden Fluoreszenzanisotropiestudien (vgl. 3.4.1) mit mutierten Fragmenten der 23S rRNA (L11-Bindedomäne; 1051-1109, *E. coli* Nummerierung), dem L11-Protein aus *Thermus thermophilus* (*Tth*L11; 3.2.2) und der fluoreszenten Thiostreptonsonde **5** durchgeführt. Eine Übersicht aller analysierten RNA-Mutanten ist in Abbildung 5.1 A+B dargestellt. Hauptaugenmerk wurde hierbei auf die beiden für die Thiopeptidbindung als essentiell beschriebenen Nukleobasen A1067 sowie A1095 gelegt,^[7] von welchen alle möglichen Punktmutationen erstellt wurden. Darüberhinaus, wurden weitere proximale (U1066, G1068) und distale (A1089) Mutationsorte, sowie das an Position A1067 2'-O-methylierte Derivat des Wildtyp-RNA-Fragments^[5e, 5f, 5h, 6, 8] in die Untersuchungen mit aufgenommen. Sämtliche Mutanten-RNA-Fragmente wurden hierzu analog zum Wildtypfragment mittels T7-basierter *in vitro* Transkription hergestellt. Die an A1067 2'-O-methylierte Variante des Wildtypfragments wurde synthetisch hergestellt (Dharmacon). Die Faltung der synthetisierten RNA-Fragmente wurde CD-spektroskopisch kontrolliert (Abbildung 5.1 C). Alle synthetisierten Fragmente zeigten bei der Verwendung gleicher RNA-Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede in ihrem CD-Spektrum und lagen demnach korrekt und in ähnlicher Weise gefaltet vor.

Im Bindeassay (Kapitel 3.4)^[9] zeigte die 2'-O-methylierte A1067 RNA-Variante einen drastischen Affinitätsverlust (~3000-fach) zur fluoreszenten Sonde **5** und unterstrich damit die Effektivität dieses Resistenzmechanismus. Hohe Affinitätsverluste konnten auch für die Transversionsmutanten A1067C und A1067U (~1000-fach) dokumentiert werden. Die Mutante A1067G zeigte eine im Vergleich zur Wildtyp-RNA unverändert hohe Affinität zur Sonde. Dieses Resultat zeigte, dass die Affinität zur Nukleobase 1067 hauptsächlich von der Purin oder Pyrimidinnatur des Basenheterozyklus bestimmt wird. In der Tat wurde auch in frühere Studien^[7a] der A1067G Mutation berichtet, dass diese nur einen geringen Einfluss

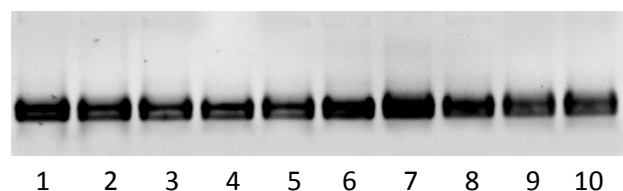
auf die Thiostreptonaktivität in Bakterien besitzt.^[5a, 5c, 5d, 5j, 5k, 10] Interessanterweise zeigten Mutationen in direkter Nachbarschaft zu A1067 keinen Effekt auf die Sondenbindung und sind dementsprechend, vermutlich nicht in die Thiopeptiderkennung eingebunden (Tabelle 5.1). Dasselbe Resultat lieferte die Mutante A1089G, welche sich weit entfernt von der angenommenen Thiopeptidbindestelle befindet.

A)



B)

Eintrag	Position	Mutation
1	U1066	C
2	A1067	C
3		G
4		U
5		2'OMe
6	G1068	U
7	A1089	G
8	A1095	C
9		G
10		U



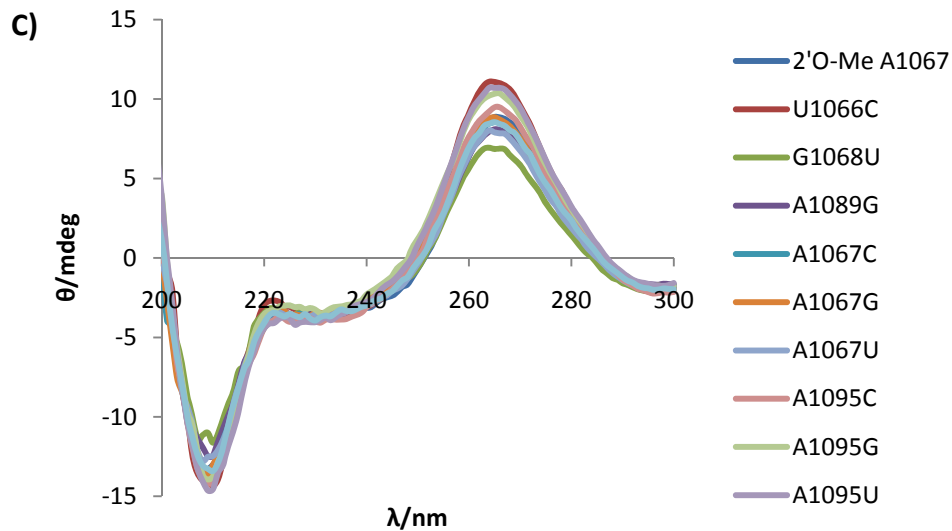


Abbildung 5.1: A) Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit studierten Mutationen des 23S rRNA-L11-Komplexes, visualisiert auf Basis der Kristallstruktur von Thiostrepton (**1**) am Ribosom (PDB 3cf5).^[7] Beschriebene Loci für Resistenzmutationen sind rot, zusätzlich getestete Loci gelb dargestellt. B) Übersicht der hergestellten Mutanten und Derivate des 23S rRNA Wildtypfragments + 10% denaturierende PAGE der gereinigten RNAs (Ethidiumbromid-gefärbt) C) CD-Spektren sämtlicher hergestellter Mutanten sowie der an Position A1067 2'O-methylierten Variante des 23S rRNA Wildtyp-Fragments. Die Spektren wurden in Quartzküvetten ($d = 1$ cm) bei Raumtemperatur und einer RNA-Konzentration von $0,4 \mu\text{M}$ aufgenommen.

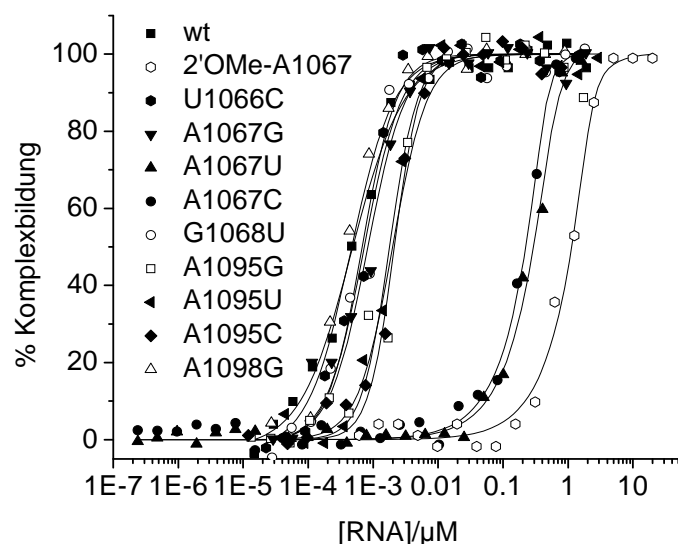


Abbildung 5.2: Fluoreszenzanisotropie-Titrations von *Tth*L11 ($0,7 \mu\text{M}$) und fluoreszenter Thiostreptonsonde **5** (5 nM) mit unterschiedlichen Mutanten des 23S rRNA Fragments, angepasst an die analytische Lösung für das gekoppelte Gleichgewicht (2.13.2.2).

Eintrag	RNA	K_D/nM
1	Wildtyp	$0,33 \pm 0,17$
2	U1066C	$0,28 \pm 0,15$
3	A1067C	410 ± 168
4	A1067G	$0,34 \pm 0,07$
5	A1067U	460 ± 90
6	2'OMe-A1067	970 ± 20
7	G1068U	$0,29 \pm 0,09$
8	A1089C	$0,36 \pm 0,17$
9	A1095C	$5,2 \pm 2,8$
10	A1095G	$2,3 \pm 1,2$
11	A1095U	$4,5 \pm 1,9$

Tabelle 5.1: Affinitäten von RNA-Punktmutanten-*Tth*L11 Wildtyp-Komplexen an die Thiostreptonsonde **5**.

Die Analyse der Position 1095 zeigte, dass jede eingeführte Mutation zu einer signifikanten Reduktion der Sondenaffinität (7-15-fach) führte, welche im Einklang mit der beschriebenen, erhöhten Thiopeptidtoleranz steht. Zusammenfassend zeigen die Studien, dass Resistenzmutationen auf der RNA-Ebene eine Reduzierung der Thiopeptidaffinität herbeiführen. Der Einfluss von Mutationen an Position A1067 ist hierbei ca. 100-fach größer als der Einfluss von Mutationen an Position A1095. Dies weist darauf hin, dass A1067 das Hauptelement der RNA-Erkennung durch Thiostrepton **1** ist.

5.2.2 Mutanten des L11-Proteins

Zur Analyse des Einflusses der Mutation einzelner Aminosäuren des L11-Proteins wurden Fluoreszenzanisotropiestudien mit Fragmenten der Wildtyp 23S rRNA, 14 verschiedene Mutanten des L11-Proteins aus *Thermus thermophilus* (*Tth*L11) und der fluoreszenten Thiostreptonsonde **5** durchgeführt.^[9a, 9b] Die rplK-(L11)-Mutanten wurden ausgehend vom Plasmid p*Tth*L11 (vgl. Kapitel 2.5 b) mittels *in vitro* Mutagenese (vgl. 2.10.4) hergestellt und analog zum Wildtypprotein als N-terminal His₆-markierte Fusionsproteine heterolog in *E. coli* exprimiert und mittels IMAC (Ni²⁺-NTA-Agarose) gereinigt. Die Ausbeuten des Proteins lagen üblicherweise bei 5-10 mg Fusionsprotein pro Liter Expressionskultur. Alle für diese Studie gereinigten Proteine wurden standardmäßig in Lagerpuffer mit 10 mM TCEP gelagert, um eine Dimerisierung der Proteine über die z.T. eingefügten Cysteine zu vermeiden.

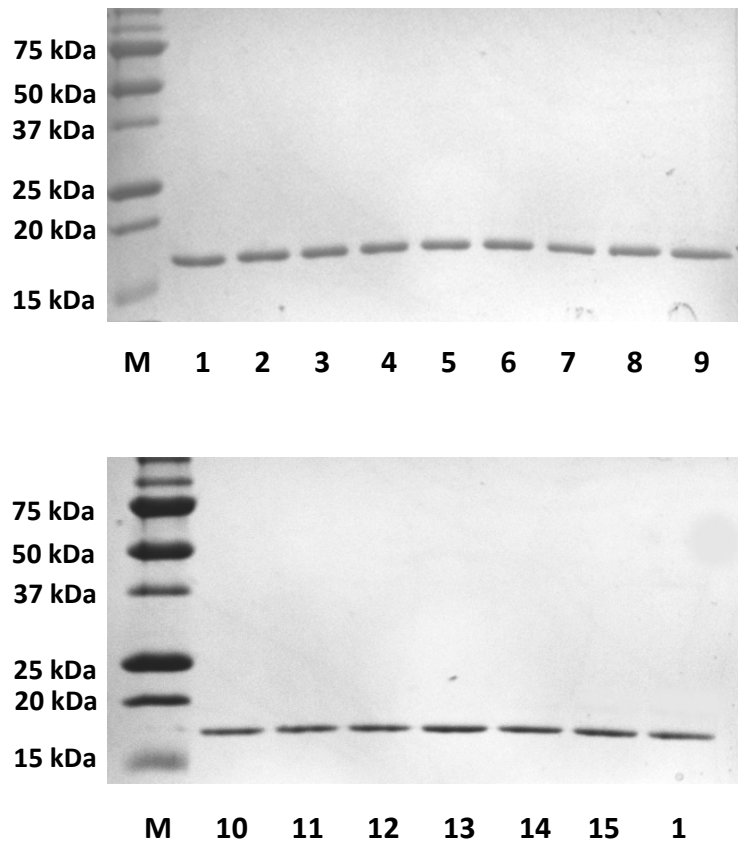


Abbildung 5.3: A) 15%ige SDS-PAGE der gereinigten Mutanten *TthL11*-Fusionsproteine (2-15) und des Wildtyps (1) (je ca. 0,9 µg/Spur). Die genaue Zuordnung der Mutanten ist Abbildung 5.4 zu entnehmen. M: Marker.

Eine Übersicht aller hergestellten Proteine ist den Abbildung 5.1 A und Tabelle 5.2 dargestellt. Die hergestellten Mutanten umfassten hierbei sechs Mutationen, welche *in vivo* erhöhte Thiopeptidtoleranzen hervorrufen,^[5a, 5c, 5d] sowie neun weitere,^[11] welche eine systematische Analyse des gesamten Protein N-Terminus ermöglichten. Fluoreszenzanisotropiestudien der Bindung der Mutanten an die fluoreszente Thiostreptonsonde **5** zeigten bemerkenswerterweise, dass die hergestellten Mutanten sowie das Wildtypprotein keine signifikant unterschiedlichen Bindungsaffinitäten an die Sonde zeigten (Abbildung 5.4-5). Die gemessenen Affinitäten variierten hierbei nur zwischen 0,27 und 0,69 nM (Tabelle 5.2). Auch die Alkylierung einiger Cysteinmutanten mit Iodoacetamid hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Sondenaffinität (Abbildung 5.4 B).

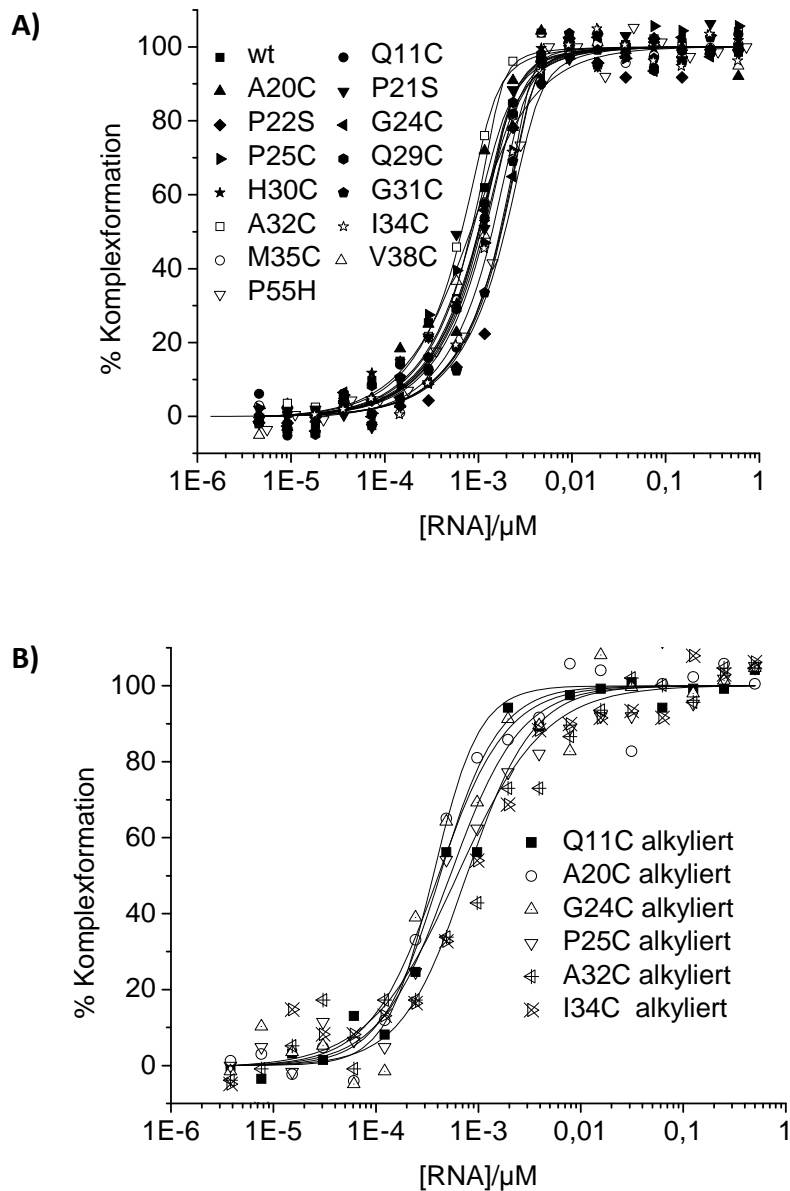


Abbildung 5.4: A) Fluoreszenz-anisotropie-Titrationen verschiedener *TthL11*-Mutanten bzw. des Wildtyps (0,7 μM) und fluoreszenter Thiostreptonsonde 5 (5 nM) mit dem 23S rRNA Wildtyp Fragment, angepasst an die analytische Lösung für das gekoppelte Gleichgewicht (2.11.2.2). B) Fluoreszenz-anisotropie-Titrationen verschiedener alkylierter (Iodoacetamid) *TthL11*-Cysteinmutanten (0,7 μM) und fluoreszenter Thiostreptonsonde 5 (5 nM) mit dem 23S rRNA Wildtyp Fragment, angepasst an die Hill-Funktion.

Eintrag	L11 Protein	K_D/nM	Eintrag	L11 Protein	K_D/nM
1	Wildtyp	$0,33 \pm 0,05$	9	H30C	$0,37 \pm 0,06$
2	Q11C	$0,48 \pm 0,04$	10	G31C	$0,69 \pm 0,05$
3	A20C	$0,35 \pm 0,01$	11	A32C	$0,27 \pm 0,02$
4	P21S	$0,34 \pm 0,01$	12	I34C	$0,56 \pm 0,03$
5	P22S	$0,66 \pm 0,06$	13	M35C	$0,36 \pm 0,03$
6	G24C	$0,49 \pm 0,09$	14	V38C	$0,44 \pm 0,03$
7	P25C	$0,35 \pm 0,06$	15	P55H	$0,65 \pm 0,07$
8	Q29C	$0,41 \pm 0,03$			

Tabelle 5.2: Affinitäten von RNA-Wildtyp-*Tth*L11-Mutanten-Komplexen an die Thioestreptonsonde 5.

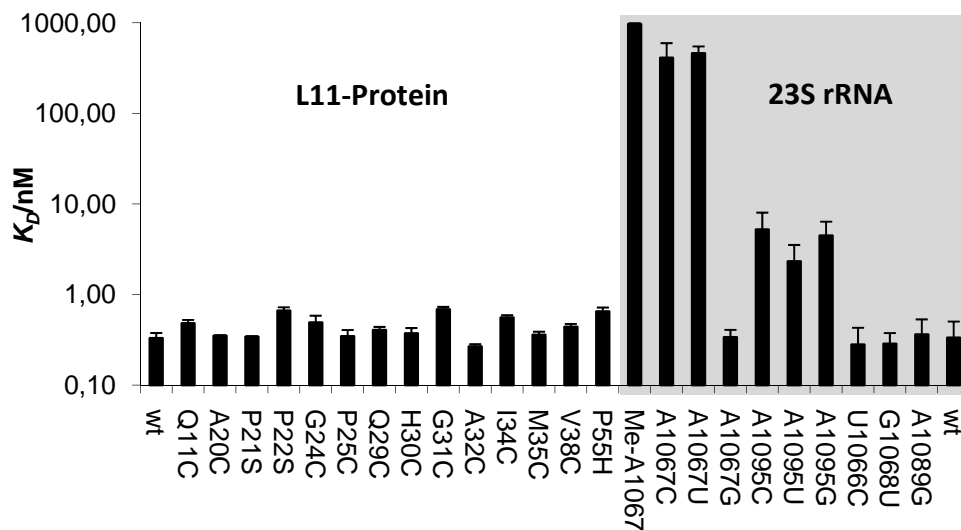


Abbildung 5.5: Übersicht der quantitativen Bindedaten der Bindung der fluoreszenten Sonde 5 an *Tth*L11 und 23S rRNA Mutanten (Logarithmische Skalierung!)

5.2.3 Analyse von Mutanten des L11-Proteins in intakten 70S Ribosomen

Die bemerkenswerten Ergebnisse der Bindungsstudien der Thioestreptonsonde an die L11-Mutanten/RNA-23S rRNA-Komplexe führte zur Frage, ob die beobachteten Effekte der unbeeinflussten Sondenbindung ein Artefakt der Analyse isolierter ribosomaler „Sub-Komplexe“ sein könnte. Es wurden daher zusätzliche Studien der Mutanten in der natürlichen ribosomalen Umgebung d.h. in intakten 70S Ribosomen angestrebt. Nomura *et al.* konnten bereits von mehr als 40 Jahren zeigen, dass die Kombination der rRNAs und ribosomalen Proteine aus unterschiedlichen bakteriellen Spezies, funktionale Ribosomen hervorbringen kann.^[12] Um einen leichten und schnellen Zugang zu den entsprechend

mutierten Ribosomen zu haben, wurden die *T. thermophilus* L11-Mutantenkonstrukte heterolog in einem zuvor beschriebenen L11-defizienten (rplK) *E. coli* Stamm^[13] zur Expression gebracht. Die so hergestellten *Tth*L11-*E. coli* Ribosomenchimären wurden mittels der bereits in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Affinitätsreinigungsmethode^[14] isoliert und der korrekte Einbau des L11-Proteinfusionskonstrukts mittels SDS-PAGE und Immuno-(Western)-blots überprüft. Zur Detektion der L11-Konstrukte wurden α -His₆-Antikörper verwendet (Abbildung 5.6 A).

In der Vergangenheit wurden bereits erfolgreich fluoreszenzmarkierte Erythromycin-Derivate in vergleichbaren Fluoreszenzanisotropie-Assay-Formaten für die Analyse der Makrolid-Bindestelle auf intakten Ribosomen genutzt wurden.^[15] Die Titration der Sonde **5** mit den gereinigten Ribosomenchimären führte zu sigmoidalen Bindekurven, welche unabhängig von der analysierten L11-Mutante, scheinbare Affinitäten zwischen 0,5 und 2 nM zeigten (Abb. 5.6 C; Tabelle 5.3 A). Die Affinitäten der Sonde an die unterschiedlichen Mutanten im intakten Ribosom erschienen demnach, wie auch im isolierten 23S rRNA-L11-Komplex, im Vergleich zum *Tth*L11-Wildtyp unverändert. Würden die Resistenzmutationen auf der Proteinseite zu drastischen Affinitätsverlusten (hoher nanomolarer bis mikromolarer Bereich) führen, hätten sie in einem der beiden Systeme gefunden werden müssen. In Anbetracht der generell nicht abschätzbaren Homogenität der Ribosomenpräparationen, sowie der biophysikalischen Grenzen dieser 1:1 Bindestudie (aufgrund der photophysikalischen Eigenschaften von Fluorescein, waren mindestens nanomolare Konzentrationen der Sonde notwendig) ist es darüberhinaus wahrscheinlich, dass mit diesem Experiment nur eine Obergrenze für die Affinität ermittelt werden konnte. Die realen Affinitäten an das intakte Ribosom werden noch weit höher sein (pM) und so einer irreversiblen Bindung nahe kommen. Dieses Postulat wird durch das Ergebnis bestärkt, dass Verdrängungstitrationen der Sonde am intakten Ribosom nicht möglich waren (Kapitel 3.4.4). Die Verfügbarkeit L11-defizienter Ribosomen ermöglichte zu untersuchen, ob Thiopeptide generell dazu fähig sind an die L11-freie 23S rRNA zu binden (vgl. Kapitel 3). Eine grundsätzlich korrekte Faltung der RNA ist in diesem vorauszusetzen, da L11-defiziente Bakterienstämme generell lebensfähig sind.^[16] Fluoreszenzanisotropie-Titrations der Sonde mit L11-defizienten Ribosomen zeigten relativ ungewöhnliche Kurvenverläufe welche nach einer anfänglichen Sättigung bei niedrigen Ribosomenkonzentrationen, einen kurzen Anstieg und darauf einen drastischen Abfall des Anisotropiesignals (Abbildung 5.6 C), bei hohen

Ribosomenkonzentrationen bis weit unter die Anfangswerte, zeigte (Daten nicht gezeigt). Dies deutete eine mögliche unspezifische Bindung oder Aggregation der Sonde an und wurde deshalb weiter untersucht. Um beide Störparameter auszuschließen, wurden Titrations der Sonde mit L11⁻-Ribosomen sowie *Tth*L11 P25C komplementierter Ribosomen in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des Detergenz NP-40 durchgeführt.

Unter allen getesteten NP-40-Konzentrationen zeigten die komplementierten Ribosomen eine stabile Bindung an die fluoreszente Sonde. Die scheinbaren Affinitäten änderten sich auch bei den höchsten Detergenzkonzentrationen nur minimal (Tabelle 5.1 B). Im Fall der L11-defizienten rplK⁻-Ribosomen hingegen wurde das Anisotropiesignal durch die Zugabe des Detergenz drastisch reduziert. Eine Zugabe von 0,1% NP-40 reduzierte das Signal schon mehr als 50%. Die Abwesenheit einer stabilen Interaktion von L11⁻ Ribosom und Sonde in Anwesenheit von Detergenz bestätigte demnach die Vermutung einer unspezifischen Bindung bzw. Aggregation. Verwunderlich war jedoch die im Fall des rplK⁻-Ribosoms beobachtete Abnahme des Anisotropie- bzw. Polarisations signals bei steigender Ribosomenkonzentration. Basierend auf dem Modell von Perrin^[17] ist die Fluoreszenz-polarisation definiert als:

$$\left(\frac{1}{P} - \frac{1}{3}\right) = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3}\right) \left(1 + \frac{\tau}{\phi}\right) \quad \text{und} \quad \phi = \frac{\eta V}{RT}$$

mit P_0 : fundamentale Polarisation, τ : Fluoreszenzlebensdauer, ϕ : Rotationskorrelationszeit, η : Viskosität, V : molekulares Volumen des Fluorophors, T : Temperatur und R : Gaskonstante.

Dies bedeutet, dass das Polarisations bzw. Anisotropiesignal ansteigt, wenn das Molekulargewicht bzw. die Viskosität steigt; bzw., dass das Signal absinkt, wenn die Fluoreszenzlebensdauer des Fluorophors zunimmt. Um den Einfluss L11-freier bzw. *Tth*L11 komplementierter Ribosomen auf die Fluoreszenzlebensdauer zu bestimmen, wurde mir freundlicher Unterstützung von M.Sc. Juni Koo und Dr. Claus Czeslik (TU Dortmund) die zeitaufgelöste Fluoreszenzintensität^[18] der Thiostreptonsonde **5** in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des jeweiligen Ribosoms bestimmt (2.13.3). Die Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdauer-Messung sind in Abbildung 5.7 dargestellt.

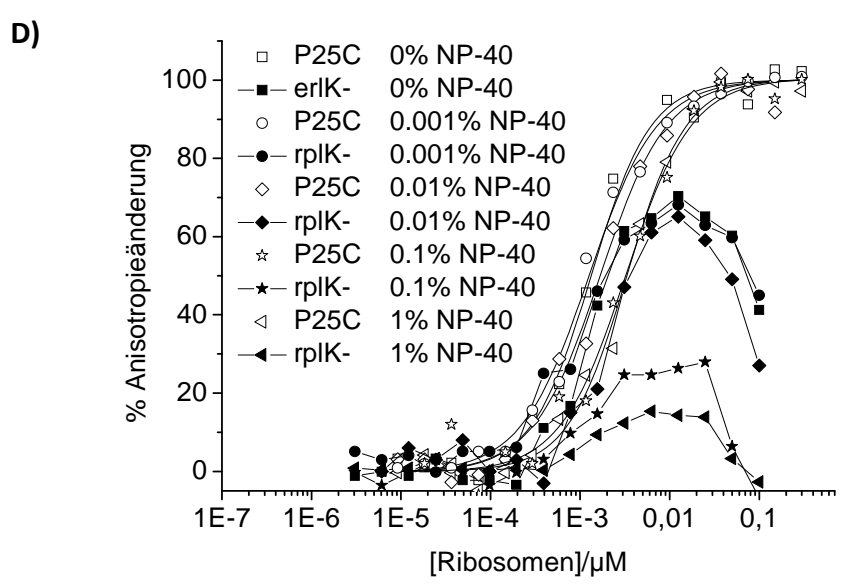
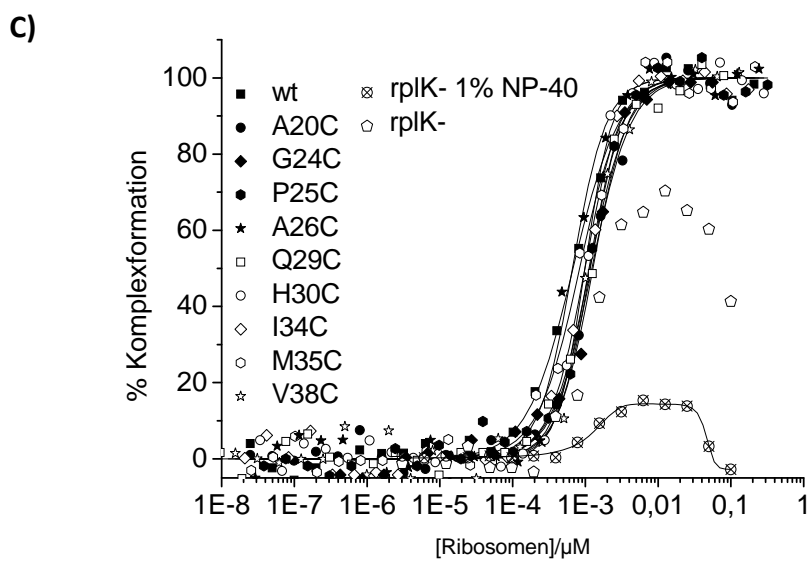
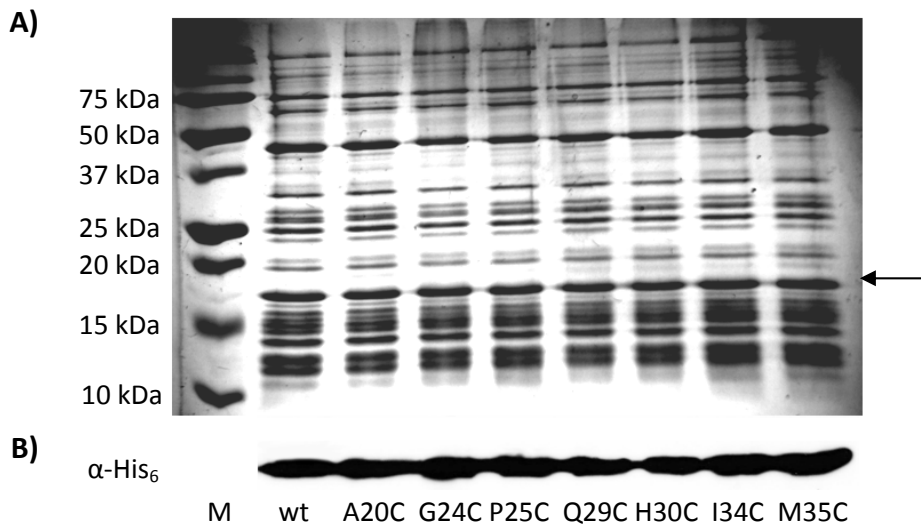


Abbildung 5.6: Analyse des der *TthL11-E. coli* Ribosomenchimären A) SDS-PAGE der ribosomalen Proteine der isolierten Ribosomen. Das TthL11-Fusionskonstrukt ist durch einen Pfeil markiert. B) Westernblot-Analyse His₆-markierter Proteine in den isolierten 70S Ribosomen. C) Fluoreszenz-anisotropie-Titrations der fluoreszenten Thioestreptonsonde **5** (5 nM) mit verschiedenen *TthL11*-Mutantenribosomenchimären sowie L11-defizienten Ribosomen, angepasst an die Hill-Funktion. D) Analyse des Einflusses von Detergenz (NP-40) auf die Bindung der fluoreszenten Sonde **5** an L11-defiziente bzw. P25C-komplementierte Ribosomen aus *E. coli*.

A)			B)		
Eintrag	L11 im Ribosom	K_{app}/nM	[NP-40]/%	K_{app}/nM	
				P25C	<i>rplK</i> ⁻
1	wt	0,42 ± 0,08	0	0,52 ± 0,05	-
2	A20C	2,38 ± 0,35	0,001	1,33 ± 0,16	-
3	G24C	1,12 ± 0,09	0,01	1,25 ± 0,13	-
4	P25C	0,52 ± 0,05	0,1	1,68 ± 0,20	-
5	A26C	1,12 ± 0,18	1	3,35 ± 0,29	-
6	Q29C	0,96 ± 0,11			
7	H30C	0,96 ± 0,17			
8	I34C	1,23 ± 0,27			
9	M35C	1,17 ± 0,20			
10	V38C	2,16 ± 0,35			

Tabelle 5.1: A) Scheinbare Affinitäten der Thioestreptonsonde **5** an *E. coli* *rplK*⁻-Ribosomen, *in vivo* komplementiert mit dem *TthL11* Wildtyp bzw. Mutanten. B) Scheinbare Affinitäten der Thioestreptonsonde **5** an *E. coli* *rplK*⁻-Ribosomen sowie *TthL11* P25C komplementiert, in Anwesenheit verschiedener NP-40 Konzentrationen

A)			
Ribosom	τ von 5 in ns		
Konz.	-	100 nM	250 nM
wt	3,34 ± 0,08	3,72 ± 0,10	3,88 ± 0,11
<i>rplK</i> ⁻	3,34 ± 0,08	3,86 ± 0,12	4,10 ± 0,11

τ Fluorescein (Lit.): 4,1 ± 0,1 ns

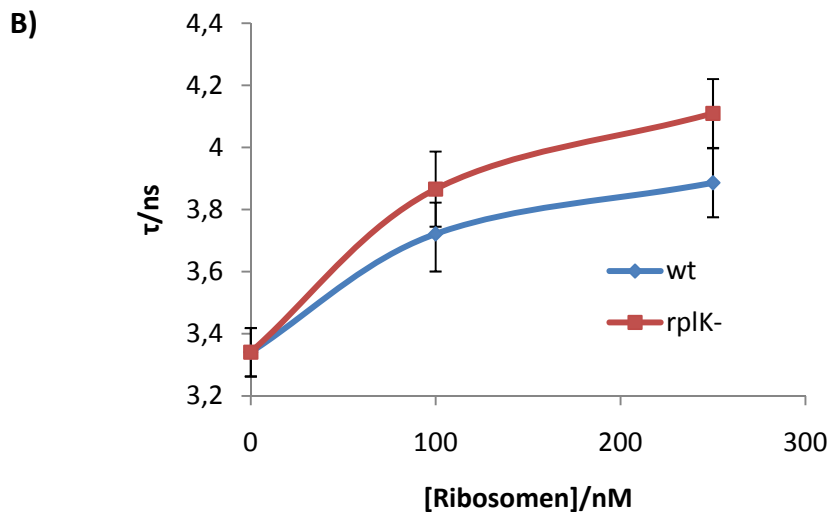


Abbildung 5.7: Analyse der Fluoreszenzlebensdauer τ der Thiostreptonsonde **5** in An- bzw. Abwesenheit von Ribosomen A) Tabelle der ermittelten τ -Werte für **5** (100 nM) in Anwesenheit von *E. coli* rplK⁻-Ribosomen bzw. *TthL11* wt komplementierten Ribosomen (0; 100; 250 nM). B) Graphische Darstellung der Werte von τ für *E. coli* rplK⁻-Ribosomen bzw. *TthL11* wt komplementierten Ribosomen als Funktion der Ribosomenkonzentration.

Die Zugabe von einem bzw. zwei Äquivalent(en) Ribosomen zur Sonde **5** (100 nM) führte bei beiden Ribosomenkonstrukten zu einer signifikanten, wenn auch sehr geringen Erhöhung von τ . Dieser Effekt wird möglicherweise durch minimale Änderungen der Viskosität des Systems hervorgerufen. Die Erhöhung war für die rplK⁻-Ribosomen minimal stärker als für die komplementierten Ribosomen (Abb. 5.7). Eine Bestimmung von τ unter den exakten Konzentrationsbedingungen des Anisotropieassays war nicht möglich, da eine Detektion von 5 nM **5** mit dem verwendeten Instrument nicht möglich war. Der vergleichbare Trend der Werte von τ für beiden Ribosomenkonstrukte wies darauf hin, dass die für das rplK⁻-Ribosom beobachteten Effekte demnach hauptsächlich durch unspezifische Interaktion bzw. Aggregation bedingt wurde.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass das L11-Protein generell unentbehrlich für eine hochaffine Bindung von Thiopeptiden an das Gesamtribosom wie auch die isolierten RNA-Protein-Komplexe ist. Markant ist hierbei zusätzlich, dass die Affinitäten an die Zielstruktur unbeeinflusst von Punktmutationen des L11-Proteins sind und generell mindestens im niederen nanomolaren Bereich liegen.

5.2.4 Rekonstitution von Resistenzmutationen *in vivo*

Die unbeeinflusste Bindung der Thiostreptonsonde an Komplexe verschiedenster *TthL11*-Punktmutanten und des 23S rRNA Wildtyps verstärkte die Frage, ob L11-Punktmutationen allein *in vivo* überhaupt zu einer Resistenz des Organismus gegen Thiopeptidantibiotika führen können. Dies war bislang nicht gezielt durch Rekonstitution sichergestellt worden. Da Thiopeptidantibiotika die äußere Membran Gram-negativer Prokaryoten (wie *E. coli* und *T. thermophilus*)^[19] nicht durchdringen können, wurden entsprechende Studien in dem Gram-positiven *Bacillus subtilis* durchgeführt. Hierzu wurde ein bereits beschriebener L11-defizienter *B. subtilis* *rplK*-Knockout Stamm^[16] genutzt, freundlicherweise bereitgestellt von Prof. Dr. W. G. Haldenwang (UT San Antonio). Agardiffusionstests mit dem erhaltenen Stamm zeigten eine Hemmhofentwicklung in Anwesenheit von Thiostrepton **1**, welcher jedoch von einem Bakterienrasen überwachsen war (Abbildung 5.8 A). Der erhaltene Stamm war demnach augenscheinlich eine Mischung von thiopeptidresistenten und nichtresistenten *B. subtilis*. Zur Isolierung des resistenten Stamms wurde die Mischung in Anwesenheit von 0,5 µM **1** angezogen. Das Isolat zeigte im Agardiffusionstest in Anwesenheit von **1** keine Hemmhofbildung. Wachstumsanalysen des so isolierten L11-Knockout-Stamms zeigten im Vergleich zum *B. subtilis* Wildtyp ein sehr stark reduziertes Wachstum. Unter den verwendeten Bedingungen konnte eine Verdopplungszeit von 20 ± 1 min. für den Wildtyp und eine 6× höhere Verdopplungszeit von 116 ± 17 min. für den *rplK*-Knockout-Stamm ermittelt werden. Diese erhöhten Verdopplungszeiten verdeutlichten die Wichtigkeit des L11-Proteins für die Lebensfähigkeit des Organismus und insbesondere bei der Proteinbereitstellung während der Zellteilung.^[16] Der Verlust von L11 als Resistenzmechanismus ergäbe demnach keinen biologischen Vorteil für den prokaryotischen Organismus und sollte dessen Pathogenität deutlich herabsetzen.

Der *TthL11* Wildtyp sowie die Mutanten P21S, P22S, G24C und P25C wurden als His₈-markierte Fusionsproteine (Trägervektor: pHT08, Dr. H. Nguyen, CGC Dortmund) transient in *B. subtilis* *rplK* sowie im Wildtyp zur Expression gebracht. Die Transformation der Expressionvektoren in die beiden Stämme führte im Fall des Wildtyps zum Wachstum charakteristischer Transformantenkolonien auf Selektionsagarplatten. Im Fall des *rplK*-Stamms konnte jedoch nach der Transformation die Ausbildung eines Biofilms beobachtet werden (Abbildung 5.9).

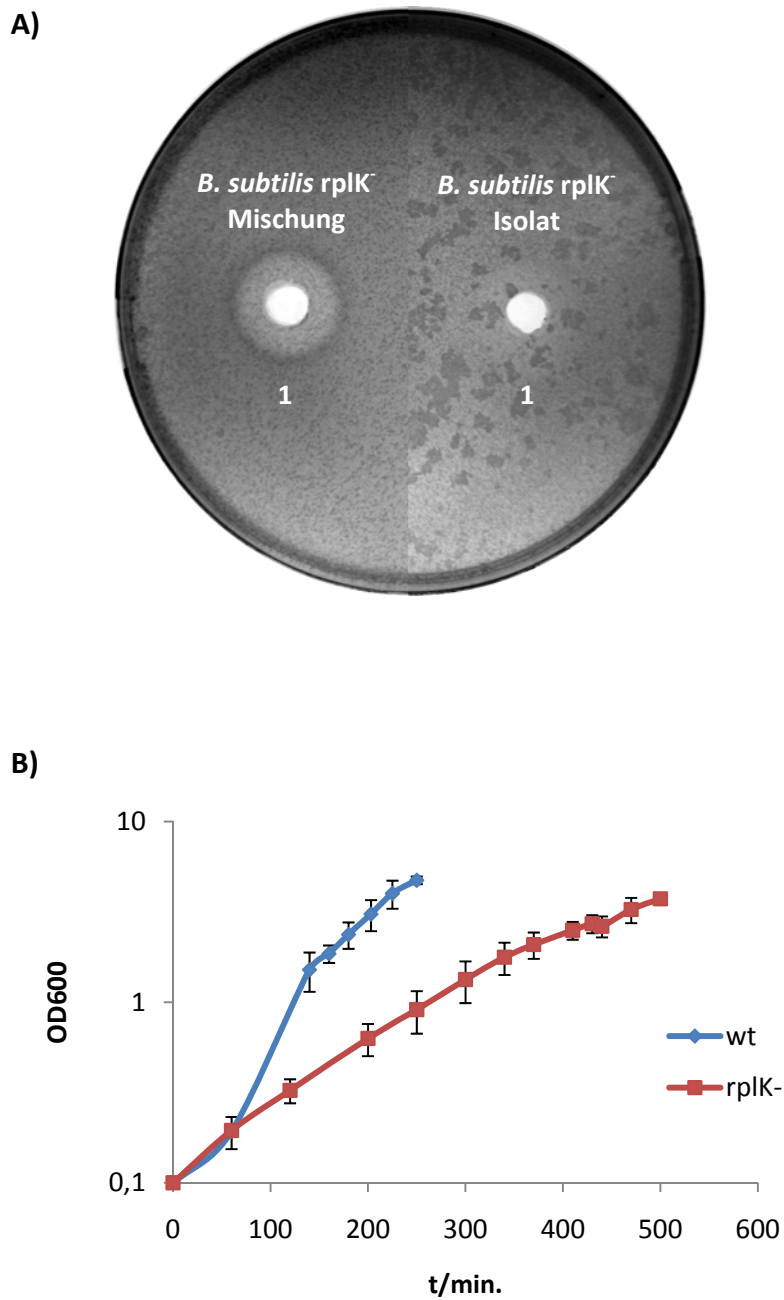


Abbildung 5.8: A) Agardiffusionstest des erhaltenen *B. subtilis* rplK⁻-Stamms (links) und nach Prä-Selektion (0,5 μ M **1** in der Flüssigvorkultur, rechts) unter Thiostrepton-Selektionsdruck. In die eingestanzten Löcher wurden 25 μ M Lösungen von **1** in 10% TFE gefüllt. B) Wachstumskurven des *B. subtilis* Wildtyps (wt) und des rplK-Knockouts bei 30°C in LB-Medium.

Dies wird im Falle dieses Stamms möglicherweise durch die Verwendung des Spiziten-Transformationsprotokolls^[20] ausgelöst. Eine gezielte Analyse von Chagneau & Saier in diesem Zusammenhang zeigte, dass primäre Auslöser für diesen Effekt das im Transformationsmedium enthaltene Casein-Hydrolysat und Glucose sind.^[21] Um dennoch zu überprüfen, ob der erhaltene Biofilm wirklich *B. subtilis* rplK/pHT08-Transformanten enthielt, wurden die Zellen unter Kanamycin- (Vektorresistenz) und Thiostrepton-Selektionsdruck (rplK⁻) in Flüssigkulturen angezogen. Um auszuschließen, dass es sich bei den analysierten Zellen um Bakterien und nicht um Hefen handelt, wurde das Wachstum zusätzlich in Anwesenheit von Ampicillin bzw. des Antimykotikums Nystatin überprüft. Die Zellen wuchsen in Anwesenheit von Kanamycin, Thiostrepton sowie Nystatin. Nur Ampicillin unterdrückte das Wachstum vollständig (Daten nicht gezeigt). Darüberhinaus bestätigten Kolonie-PCR-Experimente mit *B. subtilis* rplK spezifischen Primern sowohl bei den Transformanten des Wildtyps wie auch des Knockouts die Existenz des rplK-Gens (bei dem Knockout handelt es sich um eine „nonsense“-Mutante).^[16]

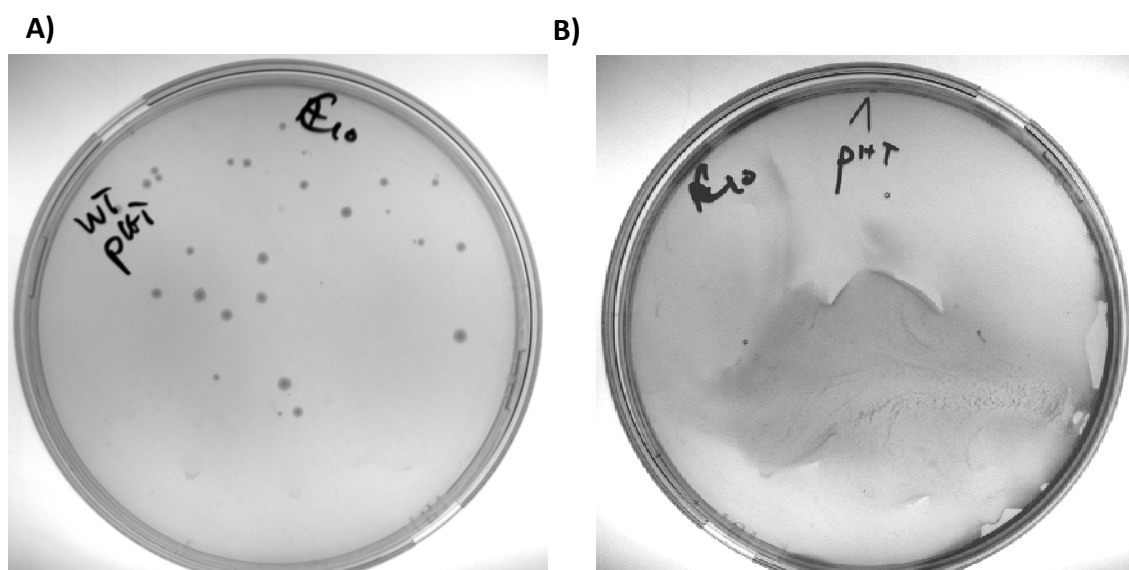
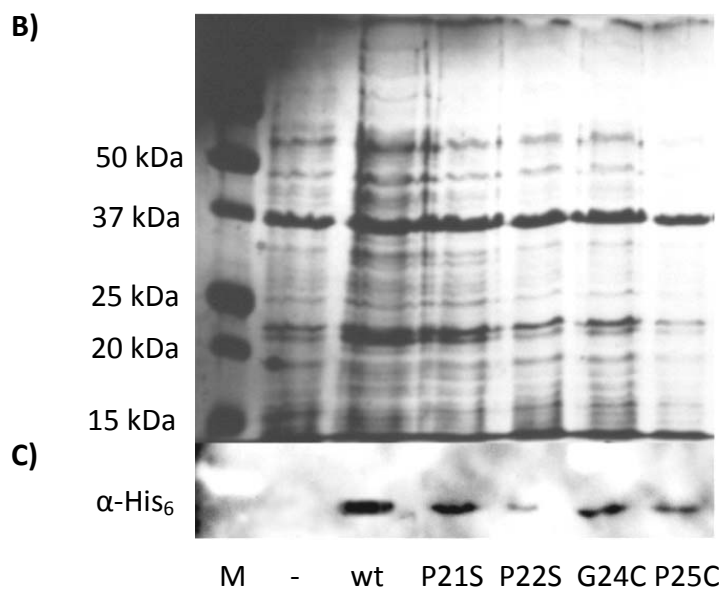
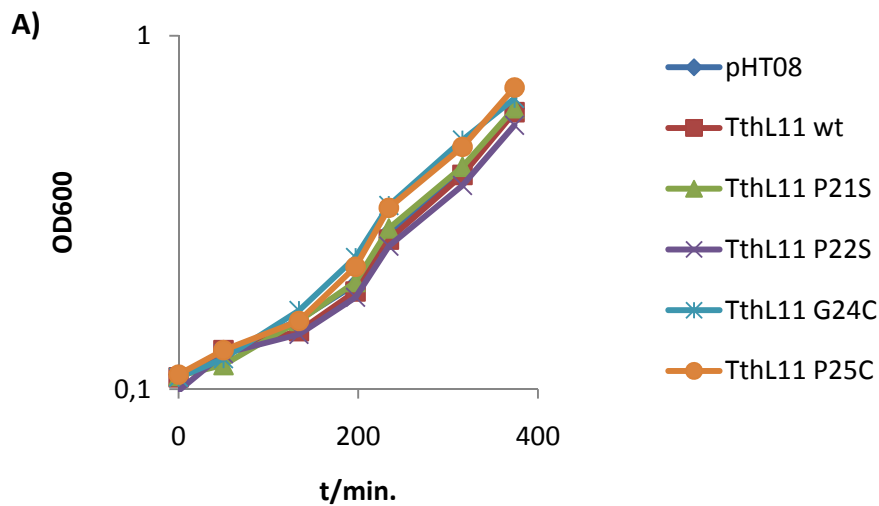


Abbildung 5.9: Transformantenselektion (Kanamycin) der Transformation des pHT08 Leervektors in *B. subtilis* Wildtyp (A) und rplK-Knockout (B).

Da der Verlust des L11-Proteins im Fall des Knockouts zu einer drastischen Verlängerung der Verdopplungszeit führte, könnte es sein, dass die Rekonstitution mit *TthL11* bzw. den Mutanten zu einer Reversion dieses Phänotyps führt. Wachstumsassays mit dem pHT08-

Leervektor bzw. mit den Mutantenkonstrukt transformierten Knockoutzellen in Anwesenheit von 1 mM des Expressionsinduktors IPTG zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede (Abb. 5.10 A). SDS-PAGE-Analysen der Zelllysate der Transformanten mit den *TthL11*-Mutantenkonstrukten zeigten allerdings keine deutlichen Überexpressionsbanden. Die Westenblot-Analyse der Lysate zeigte jedoch das schwache Signal einer Bande <20 kDa (erwartet: 17 kDa), welches im Fall der nur mit dem Leervektor transformierten Zellen nicht auftrat. Die relativ langen Belichtungszeiten die zur Detektion dieses Signals notwendig waren, wiesen auf eine sehr geringe Konzentration des Fusionsproteins in den Knockoutstämmen hin.



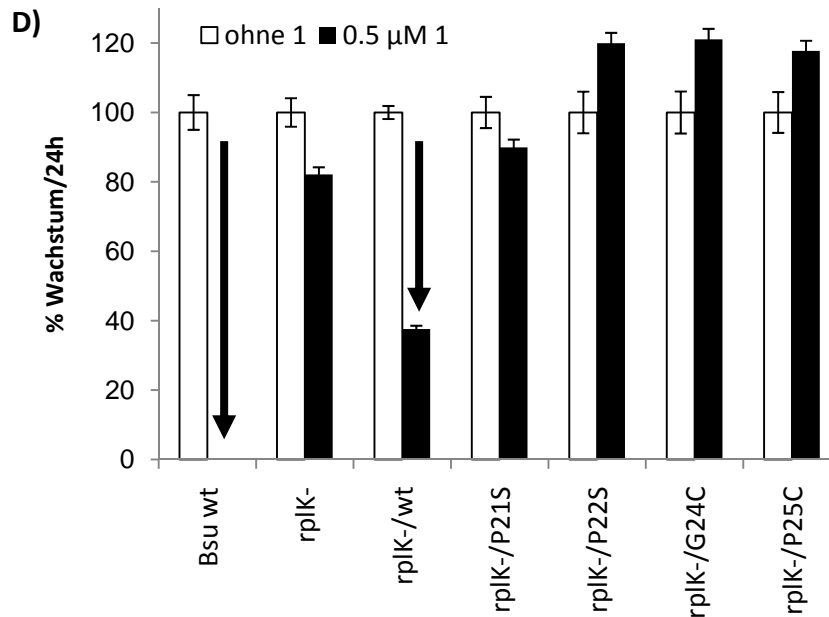


Abbildung 5.10: A) Wachstumsanalyse des mit *TthL11* wt oder Mutanten-komplementierten *B. subtilis* *rplK*-Knockout-Stamms im Vergleich zum nicht-komplementierten Stamm. Die Analyse wurde in Anwesenheit von 1 mM IPTG zur Expressionsinduktion, sowie Kanamycin als Selektionsdruck, durchgeführt. Als Kontrolle wurde der *B. subtilis* wt verwendet. B) SDS-PAGE (12,5%, Coomassiegefärbt) der *B. subtilis* *rplK*-Zellysate aus A). C) Westernblot-Analyse der Lysate aus B) mit α -His₆-Antikörpern (der Röntgenfilm wurde >4 h mit dem Blot belichtet). D) Analyse der Thiostreptonresistenz der rekonstituierten *B. subtilis* *rplK*-Knockout-Zellen. Signifikante Wachstumsänderungen sind mit einem Pfeil markiert.

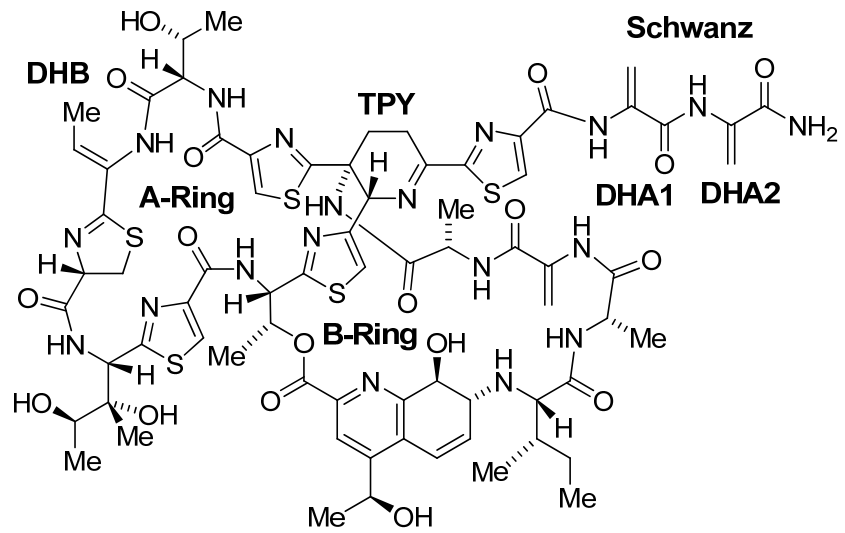
Ein Indiz für den erfolgreichen Einbau der Fusionsproteine in die Ribosomen des Knockout-Stamms, wäre ein Rückgewinn der Thiostrepton-Sensitivität im Fall des *TthL11* Wildtypkonstrukts. Wachstumsanalysen der unterschiedlichen komplementierten Bakterienkulturen sowie des Wildtyp *B. subtilis* Stamms in Anwesenheit von Thiostrepton **1** (0,5 µM) zeigten das dies in der Tat der Fall war. Der *B. subtilis* Wildtyp zeigte in über Nacht-Kulturen in Anwesenheit des Thiopeptids kein Wachstum (Abb. 5.10 B). Der mit dem pHT08-Leervektor transformierte Stamm, sowie die Kulturen die die *TthL11*-Punktmutanten exprimierten, zeigten wie erwartet ein unbeeinflusstes Wachstum in Anwesenheit von **1**.^[16, 22] Die Expression des *TthL11*-Wildtyps im *rplK*-Knockout-Stamm führte jedoch in Anwesenheit von **1** zu einer signifikanten 60%igen Reduktion des Wachstums und zeigte so die Thiopeptid-Resensitivierung des Stamms. Diese Resultate unterstrichen die Wichtigkeit

und Kausalität der Proteinmutationen in Zellen und zeigten darüberhinaus, dass die Thiopeptidbindung die Lebensfähigkeit der Mutanten nicht signifikant beeinflusste.

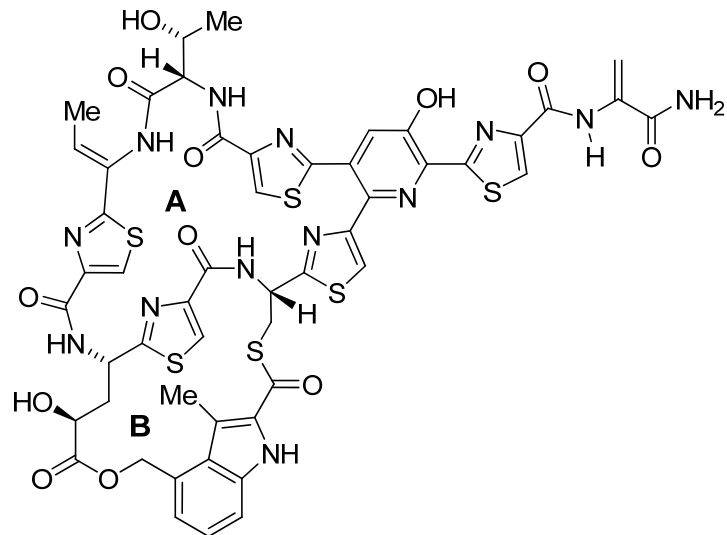
5.2.5 Verdrängungstitrationen der Sonde von *TthL11*-Mutanten-Komplexen

Um auszuschließen, dass die Ergebnisse der L11-Mutantenbindestudien im isolierten RNA-L11-Komplex durch die Verwendung der fluoreszenten Sonde verzerrt wurden, wurden zusätzlich Verdrängungstitrationen der Sonde mit verschiedenen Thiopeptidnaturstoffen durchgeführt (Abbildung 5.11). Die scheinbaren Affinitäten des bicyklischen Thiopeptids **1** an RNA-Komplexe der drei getesteten Proteine (L11 Wildtyp, G24C, P25C) zeigten keine signifikanten Unterschiede ($\sim 0,2$ nM) und unterstrichen damit die Validität der Bindedaten der fluoreszenten Sonde. Die gleichen Ergebnisse lieferten Verdrängungstitrationen mit dem ebenfalls bicyklischen Thiopeptid Nosiheptid **2** (Abb. 5.12). Bei den drei zusätzlich untersuchten Thiopeptiden **3**, **4** und **9** handelte es sich um monozyklische Thiopeptide. Micrococcin **3** bindet ebenfalls an die GTPase assoziierte Region des ribosomalen 50S Untereinheit, beeinflusst hier jedoch die Aktivität ribosomaler GTPasen in anderer Weise als das bicyklische **1**.^[23]

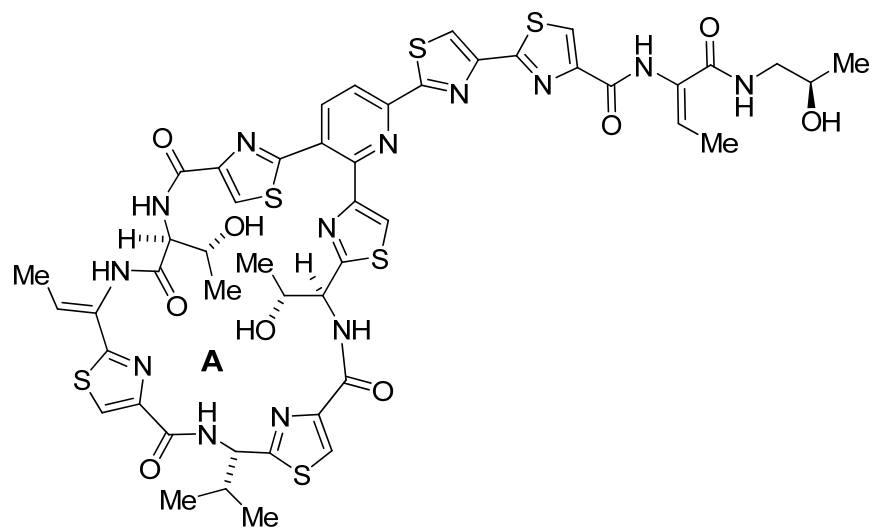
Micrococcin **3** konnte in Bindungsexperimenten die fluoreszente Sonde **5** interessanterweise nicht von Komplexen der 23S rRNA und der *TthL11* Mutante P25C (P26 in *E. coli* & *Bacillus*-Spezies) verdrängen (Abb. 5.12). Augenscheinlich konnte der Naturstoff also nicht an Komplexe der RNA und *TthL11* P25C binden und bestätigte damit frühere Indizien aus *Bacillus megaterium*.^[7c] Es ist anzumerken, dass der Resistenzmechanismus der Micrococcin-Hersteller *Micrococcus luteus* und *Bacillus cereus* zu Beginn unserer Studien nicht bekannt war. Für beide Organismen wurde keine RNA-Methyltransferase, analog zum Thiostrepton-Hersteller *Streptomyces azureus*,^[5e, 5f] identifiziert. Bemerkenswerterweise besitzt *Bacillus cereus* aber zwei weitere Kopien des *rpIK*-Gens, welche den Aminosäureaustausch Pro \rightarrow Thr an der Position P26 aufweisen.^[24] Die Ergebnisse des Bindungsassays bestätigen demnach, dass die Mutation dieser Prolinfunktion selektiv die Bindung von Micrococcin an die ribosomale GTPase-assoziierte Region (GAR) unterbindet und als natürlicher Resistenzmechanismus des Micrococcin-Produzenten angesehen werden kann.



1



2



3

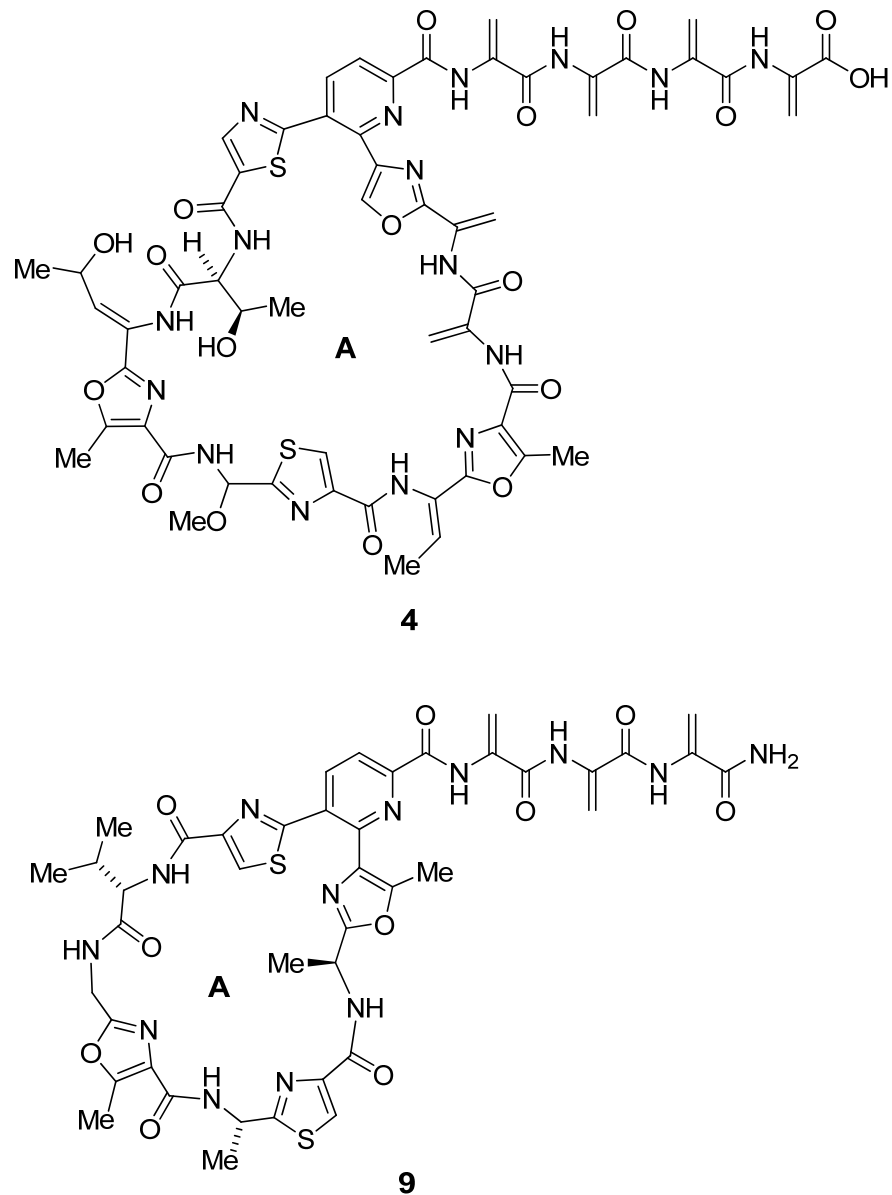
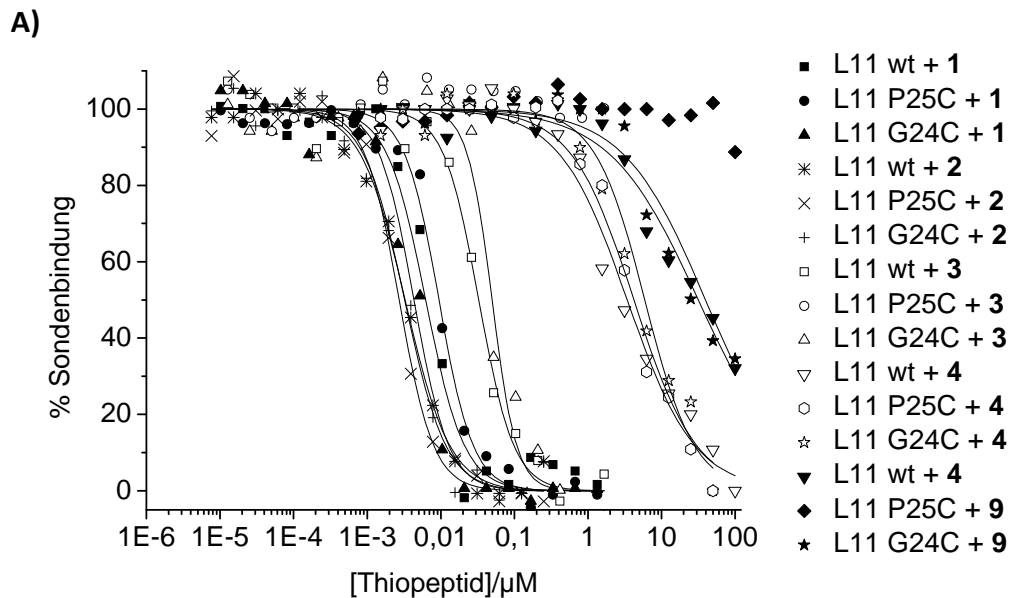


Abbildung 5.11: Chemische Strukturen der Thiopeptidnaturstoffe Thiostrepton **1**, Nosiheptid **2**, Micrococcin **3**, Promoinducin **4** und Promothiocin B **9**. Wichtige chemische Gruppen (vgl. 3.1 A) und gleiche Ringe sind markiert.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war für die zwei monozyklischen Naturstoffe **4** und **9** nur beschrieben, dass sie eine antibiotische Aktivität gegen Gram-positive Prokaryoten aufweisen.^[3] Die GTPase-assoziierte Region des Ribosoms wurde erst im Rahmen dieser Arbeit als Zielstruktur identifiziert und charakterisiert (Kapitel 3).^[9b] Das strukturell sehr stark mit Micrococcin **3** verwandte Promothiocin **9** zeigte ebenfalls eine reduzierte Affinität an die

P25C Mutante (Abb. 5.12) und teilt somit möglicherweise einen zu **3** analogen Bindemodus an die GAR. Das monozyklische Promoinducin **4** besitzt im Vergleich zu **3** und **9** einen weit größeren A-Ring und zeigte eine unbeeinflusste Bindung an alle drei getesteten L11-Proteine (Abb. 5.12).



B)

<i>TthL11</i>	K_D/nM				
	1	2	3	4	9
Wildtyp	0,23 ± 0,02	0,11 ± 0,01	1,46 ± 0,11	113 ± 13	1040 ± 125
G24C	0,24 ± 0,01	0,11 ± 0,01	1,64 ± 0,20	195 ± 21	1304 ± 171
P25C	0,30 ± 0,02	0,07 ± 0,01	>10000	139 ± 19	>10000

Abbildung 5.12: A) Verdrängungstitration der der Naturstoffe Thiostrepton **1**, Nosiheptid **2**, Micrococccin **3**, Promoinducin **4** und Promothiocin B **9** an Mutanten-L11-rRNA-Komplexen. Hierzu wurden stöchiometrische Mengen von Sonde und rRNA (5 nM) mit einem Überschuss des jeweiligen L11-Proteins komplexiert und mit variierenden Mengen der Thiopeptidliganden titriert. B) Tabelle der Dissoziationskonstanten der Bindung der Thiopeptidnaturstoffe an Komplexe der 23S rRNA mit *TthL11* wt, G24C bzw. P25C.

Diese Daten weisen darauf hin, dass die Wechselwirkung der Thiopeptidliganden mit L11 P25-Mutanten durch die Größe des Hauptmakrozyklus (A-Ring) bestimmt werden. Die Anwesenheit eines zweiten Makrozyklus (B-Ring) moduliert die Interaktion. Strukturell ist zu erwarten, dass dieser Makrozyklus die Struktur des A-Rings rigidifiziert und so möglicherweise die Bindekonformation bityklischer Thiopeptide optimiert. Bemerkenswert

ist in diesem Zusammenhang die große Spanne der Zielstrukturaffinitäten der verschiedenen Naturstoffe. Die höchsten (pikomolaren!) Affinitäten werden hierbei ausschließlich von den bicyklischen Thiopeptiden erreicht.

Auch der Monozyklus **3** besitzt eine bemerkenswert hohe Zielstrukturaffinität im niedrigen nanomolaren Bereich. Niedrig aufgelöste Kristallstrukturdaten für **3** zeigten jedoch einen Bindemodus, welcher sich stark von dem von **1+2** unterscheidet.^[7] Ein wichtiger Unterschied liegt hierbei u.a. in der Position des so genannten „Molekülschwanzes“ d.h. der thiopeptidtypischen azyklischen Verlängerung, welche im Fall von **3** direkt in die Bindung des Thiopeptids involviert zu sein scheint. Diese Daten werden durch die Bindedaten für **3** und **9** direkt unterstützt. Im Unterschied zu **3** besitzt **9** keine Dehydrobutyrin-Einheit im A-Ring und darüberhinaus keine Thiazoleinheiten im „Molekülschwanz“. Dies resultiert in einer, im Vergleich zu **3**, 5000× schwächeren Affinität an die ribosomale Zielstruktur. In der Kristallstruktur von **3** sind die Thiazoleinheiten des „Molekülschwanzes“ in der direkten Nähe zu Nukleobase A1095 der rRNA positioniert.^[7] Diese räumliche Nähe erlaubt möglicherweise die Ausbildung einer produktiven hydrophoben Stapel-Wechselwirkung eines der beiden Thiazole mit A1095.^[7] Die Dehydrobutyrine-Einheit scheint ein zusätzlich wichtiges Element für die hochaffine Bindung zu sein, da **4** im Vergleich zu **9**, trotz eines unvorteilhaft vergrößerten A-Rings, eine ca. 10× höhere Affinität aufweist.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die ribosomale GTPase-assoziierte Region ein gewisses Maß an Affinität für eine Vielzahl der Thiopeptidliganden besitzt. Für eine hochaffine Bindung des Liganden ist jedoch der Besitz bestimmter Schlüssel-Gruppen bzw. Konformation notwendig. Die Komposition dieser Parameter erlaubt darüberhinaus die Ausbildung zweier distinkter, hochaffiner Thiopeptid-Bindungsmodi, welche eindrucksvoll durch die Resistenzmechanismen für Thiostrepton **1** bzw. Micrococcin **3** dokumentiert sind.

5.3 Diskussion

Für die Interaktion von Thiopeptidliganden mit der 70S ribosomalen GTPase-assoziierten Region sind auf molekularer Ebene sowohl die 23S rRNA als auch das L11-Protein von Wichtigkeit. Im Falle der RNA sind an der Thiopeptidbindung primär die beiden Nukleobasen A1067 und A1095 beteiligt. Vielfältige Studien zeigen die generelle Wichtigkeit dieser RNA-Region für Bindungs- und Erkennungsereignisse.^[25] Resistenzmutationen auf der rRNA,

welche ausschließlich die Nukleobasen A1067 und A1095 beinhalten, führen zu reduzierten Thiopeptidaffinitäten.^[9b] Darüberhinaus zeichnet sich der Thiostrepton-Produzent *Streptomyces azureus* durch den Besitz eines Resistenzgens aus, dessen Produkt, eine RNA-Methyltransferase, eine selektive 2'O-Methylierung von A1067 ermöglicht und die Bindung von Thiopeptiden, in Anbetracht ihrer schlechten Wasserlöslichkeit, so vollständig unterbindet.^[5e, 5f, 5h, 5i, 6] Dieser Resistenzmechanismus ist bemerkenswert, wirkt aber gleichzeitig auch Fragen auf. Bei der Methyltransferase handelt es sich um ein hochspezifisches Enzym dessen evolutionäre Entstehung und Entwicklung unverhältnismäßig zur Ausbildung einer simplen Punktmutation der rRNA Base A1067 ist. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien bezüglich der RNA-Mutanten zeigten jedoch, dass die Transversion dieses Adenins zu Pyrimidinbasen markante, ca. 1000-fache Affinitätsverluste der Thiostreptonsonde bewirkte. Diese Punktmutationen würden den Organismus demnach, in Anbetracht der geringen Löslichkeiten der Thiopeptide in wässrigen Lösungen, mit einer starken Resistenz ausstatten. Entsprechende Mutanten wurden in der Tat in *in vitro* Experimenten (*T. thermophilus*, *E. coli*, *Halobacterium halobium*, *B. megaterium*) beschrieben, wenn der prokaryotische Organismus unter starken Thiopeptidselektionsdruck gesetzt wurde.^[5d] Es ist jedoch anzumerken, dass solche Experimente generell in so genannten Bakterienkultur-Vollmedien durchgeführt werden und somit keine direkte *in vivo* Relevanz besitzen, da der jeweilige Organismus keinen weiteren Störeinflüssen (z.B. ein begrenztes Nahrungsangebot, Immunabwehr, etc.) ausgesetzt wird. Die Mutation von A1067 zu Uracil bzw. Cytosin (Mutagenese der 23S rRNA) führt zu einer Erhöhung der Verdopplungszeit der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (*T. thermophilus*, *E. coli*).^[5d, 7a] Die spontane Entstehung der Mutation A1067C wurde noch nie in einem Organismus beobachtet. Die Einführung eines Guanins hat keinen Einfluss auf das Wachstum.^[5d, 7a] Purinbasen an Position 1067 scheinen demnach generell einen nachteiligen Effekt auf das Wachstum zu haben. Interessanterweise konnte für *E. coli* Ribosomen gezeigt werden, dass eine A1067U Mutation nachteilige Effekte für die Aktivität der ribosomalen GTPasen EF-G und EF-Tu ausübt.^[5d, 26] Studien von Villa *et al.*^[25a] sowie Schmeing *et al.*^[25b] lieferten zusätzlich eine strukturelle Basis für dieses Effekte. Im Ribosom-EF-Tu-Komplex interagiert A1067 direkt mit C56 der tRNA. Darüberhinaus wurde die Wichtigkeit von A1067 als auch A1095 bei der Interaktion des Ribosoms mit dem Releasefaktor 2 (RF2)^[25c] als auch dem Initiationsfaktor 2 (IF2)^[25d] von Wichtigkeit ist. Der Grund für den spezifischen

Resistenzmechanismus von *S. azureus* ist demnach darin zu suchen, dass die Nukleobase A1067 eine direkte physiologische Relevanz besitzt und nicht nur ein Teil einer größeren Interaktionsoberfläche ist. Der Austausch des A1067 zum Guanin würde zwar die ribosomale Aktivität nicht beeinflussen, hätte jedoch keinen konstruktiven Effekt, da Thiostrepton hochaffin an diese Mutante binden kann. Die starken Affinitätsverluste von Thiostrepton im Fall von Transversionsmutationen an Position A1067 verdeutlicht gleichzeitig jedoch auch die Wichtigkeit dieser Nukleobase für die Thiopeptidbindung. Keine der direkt benachbarten Basen verursachte bei Mutation detektierbare Affinitätsänderungen. Mutationen von A1095 hatten einen ca. 100-fach geringeren Einfluss auf die Affinität als Mutationen von A1067. Thiostrepton Wachstumsstudien zeigten auch für A1095 Transversionsmutanten eine Erhöhung der Verdopplungszeit und zeigten so, in Kombination mit der Tatsache, dass A1095 im Allgemeinen hochkonserviert ist, eine physiologische Relevanz dieser Position.^[5d, 7a] Die relativ geringe Beeinflussung der Thiostreptonaffinität in Kombination mit mutationsbedingten, physiologischen Nachteilen verdeutlichen mögliche Nachteile dieser Position als „hot spot“ für Resistenzmutationen des Thiostreptonproduzenten *S. azureus*.

Die Methylierung von RNA-Nukleotiden ist eine häufig vorkommende Modifizierung der rRNA, die am bakteriellen Ribosom sowohl für die Feinregulierung der Proteinbiosynthese,^[27] wie auch für die Vermittlung von Resistenzen gegen Ribosomen-gerichtete Antibiotika verantwortlich ist.^[28] Eine wichtige Frage im Zusammenhang des 2'-OMe-A1067 vermittelten Resistenzmechanismus von *S. azureus* gegen Thiopeptide ist, wie diese Modifikation zu solch drastischen Affinitätsverlusten der Thiopeptide führen kann. Die Wechselwirkung von Thiopeptiden mit bakteriellen Ribosomen ist bislang physikochemisch nicht gut verstanden. In Anbetracht der Thiopeptidstruktur scheint es sich hierbei hauptsächlich um hydrophobe sowie π -Stapelwechselwirkungen zu handeln. Ein weiterer wichtiger Faktor scheint darüberhinaus die Form des Thiopeptidliganden zu sein. In der Kristallstruktur des Komplexes von Thiostrepton (**1**) mit der ribosomalen 50S Untereinheit (3,3 Å)^[7j] passt sich **1** in die Spalte zwischen dem L11 N-Terminus und der 23S rRNA ein, ohne dabei die Konformation des ribosomalen Komplexes stark zu verändern (vgl. Abb. 3.22). Eine 2'-O-Methylierung der Ribose von A1067 könnte hier zu einer sterischen Hinderung der Interaktion führen. Die Kristallstruktur des Komplexes von Thiostrepton (**1**) mit der ribosomalen 50S Untereinheit^[7j] zeigt darüberhinaus an zwei Positionen H-Brücken-Bindungsnähe zwischen **1** und A1067 (Abbildung 5.13). Eine dieser H-Brücken (Abbildung

5.13 A) bezieht tatsächlich die 2'-O-Hydroxylgruppe der Riboseeinheit mit ein. Die Methylierung dieser Gruppe könnte die Ausbildung dieser Wechselwirkung unterbinden. Eine methylierungsbedingte Konformationsänderung der Ribose ist relativ unwahrscheinlich. Eine durch die 2'-O-Methylierung ausgelöste Änderung der Nukleotidkonfiguration könnte sich möglicherweise störend auf die Interaktion mit ribosomalen Faktoren auswirken. A1067 ist im Fall der Ribosomen-EF-G-^[29] bzw. EF-Tu- Interaktion,^[25b] im Fall freier Ribosomen^[30] bzw. 23S rRNA-L11-Komplexe^[7f] als auch im Fall der thiopeptidgebundenen Ribosomen,^[7j] C3'-endo (Ribose) und *anti* (Base) konfiguriert. Die zweite mögliche H-Brückenwechselwirkung (Abbildung 5.13 B) zwischen **1** und A1067 involviert N1 von A1067 sowie die C8-Hydroxylgruppe der 8-Hydroxyquinaldinsäure-Einheit des B-Rings von **1**. Diese mögliche H-Brücke könnte die bei Transversionsmutationen (Kapitel 5.2.1) und im Fall des semisynthetischen B-Ring-geöffneten Derivates von **1** (Kapitel 4.2.3) beobachteten drastischen Affinitätsreduktionen erklären. Im Fall der Kristallstruktur des Komplexes von Nosiheptid (**2**) mit der ribosomalen 50S Untereinheit befinden sich die 2'-OH-Gruppe der Ribose sowie N1 der Basenfunktion von A1067 ebenfalls in H-Brückennähe zum Thiopeptid (Abbildung 4.17+20). Dasselbe wurde auch für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten „Docking“-Studien mit Thiostrepton **1** gefunden (Abbildung 4.19+20) und unterstreicht somit die Bedeutung dieser beiden Funktionalitäten für die Bindung (siehe Kapitel 4.4).

Thiopeptidresistenzmutationen der GAR auf Seiten von L11 manifestieren sich im Allgemeinen, neben dem Verlust von Teilen oder des gesamten Proteins, im Austausch einzelner Schlüsselaminosäuren innerhalb des N-Terminus.^[5d] Experimentell hatte kein einzelner Aminosäureaustausch Einfluss auf die Affinität bizyklischer Thiopeptide wie Thiostrepton und Nosiheptid an isolierte RNA-L11-Komplexe, wie auch intakte 70S Ribosomen. Trotzdem ist die Anwesenheit von L11 für die hochaffine Bindung von fundamentaler Bedeutung. Resistenzmechanismen bei denen die Inhibitorbindung geduldet, jedoch funktional überbrückt wird sind selten, aber wurden bereits z. B. bei HIV reverse Transkriptase-Inhibitoren^[31] sowie Makrolidantibiotika^[32] beschrieben. Der proteinbedingte Resistenzmechanismus für Thiostrepton lässt sich deshalb nur zum Teil durch das klassische „Schlüssel-Schloss“-Prinzip der Bindung des Liganden erklären (Abbildung 5.15; Flexibilitätsmodell). Anders sieht die Situation bei dem monozyklischen Thiopeptid Micrococcin aus. Diese Verbindung ist nicht in der Lage an Mutanten der Schlüsselaminosäure P25 zu binden (Abbildung 5.15; Affinitätsmodell).

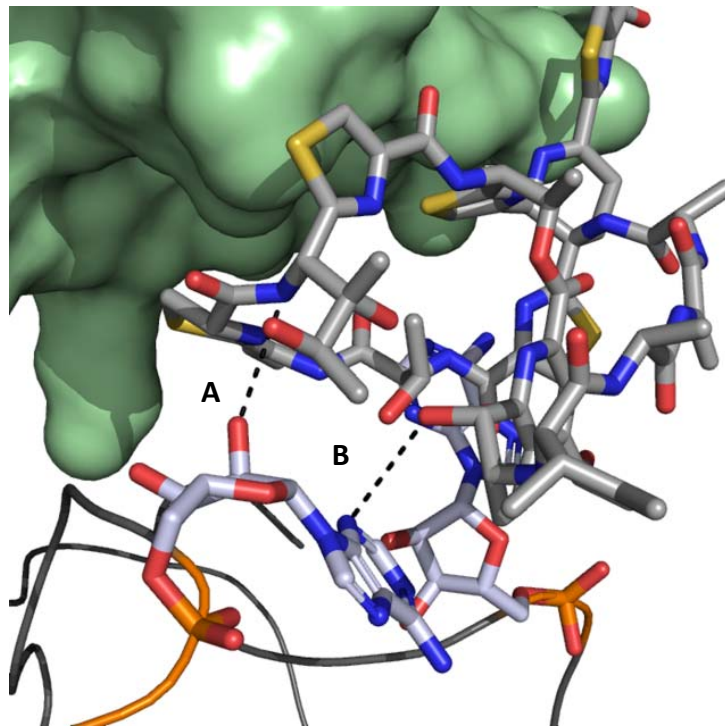


Abbildung 5.13: Darstellung möglicher Wasserstoffbrückenbindungen (A+B, schwarz gestrichelt, generiert mit PyMol) zwischen Thiostrepton **1** und A1067 (E. coli Nummerierung) der 23S rRNA, visualisiert auf Basis der Kristallstruktur des Komplexes zwischen **1** und der ribosomalen 50S Untereinheit (PDB 3cf5).^[7]

Die Wichtigkeit dieser Mutation wird auch durch den darauf basierenden Resistenzmechanismus des Micrococcin-Produzenten *B. cereus* unterstrichen.^[9b, 24] Die unterschiedliche Wirkungsweise von Micrococcin und Thiostrepton an der ribosomalen GTPase-assoziierten Region ist bereits recht gut erforscht. Micrococcin scheint die GTP-Hydrolyse von EF-G *in vitro* zu befördern,^[23a, 23b] wohingegen Thiostrepton den GTP-Umsatz unterbindet.^[23b-f] Solche Unterschiede in der Wirkungsweise implizieren funktionale Unterschiede der Ligandenbindung, welche darüberhinaus die nachträgliche Bindung von Elongationsfaktoren nicht *per se* ausschließen. Bei den meisten für die Resistenz verantwortlichen Schlüsselaminosäuren handelt es sich um hochkonservierte Proline einer so genannten prolinreichen Helix an der Spitze des N-Terminus. Mit einer Mutation dieser Proline sollte eine stark erhöhte Flexibilität der Helix einhergehen. Kristallstrukturanalysen der Interaktion der GTPase-assoziierten Region mit den Elongationsfaktoren EF-G (GDP, Fusidinsäure-stabilisiert) und EF-Tu weisen auf charakteristische Konformationsänderungen in dieser Region hin, welche sich in Änderungen

der Orientierung des L11 N-Terminus relativ zur 23S rRNA manifestieren. Vor allem die Prolin-reiche Helix zeigt hierbei eine signifikante Seitwärts-Bewegung (Abbildung 5.14).^[25b, 29]

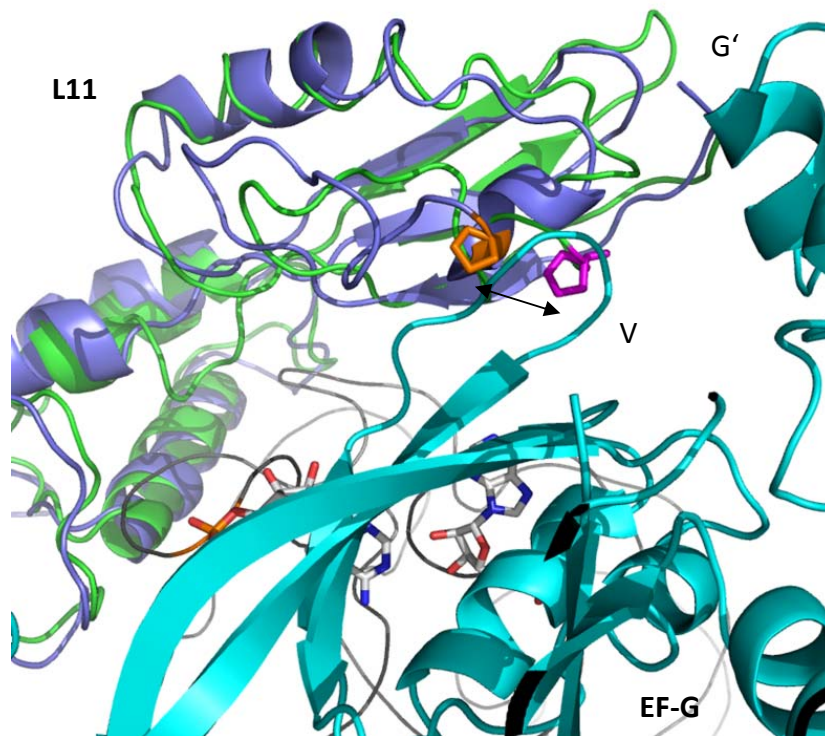


Abbildung 5.14: Überlagerung der L11-Proteine aus den Kristallstrukturen der 50S Untereinheit des bakteriellen Ribosoms im Komplex mit Thiostrepton (1)(Blau, PDB: 3cf5)^[7f] bzw. EF-G-GDP (Grün, PDB: 2wri+2wrj).^[29] Die Bewegung der Prolin-reichen Helix ist durch einen Pfeil markiert. Hervorgehoben ist jeweils die Aminosäure P25 (*T. thermophilus* Nummerierung): Orange (3cf5), Pink (2wri+2wrj). EF-G-GDP (Cyan, Domäne V und G' sind markiert). RNA (graues Band).

Kürzlich publizierte Kristallstrukturdaten der Bindung von Thiostrepton und Micrococцин an diese Region zeigten, dass die Liganden an einer Spalte zwischen dem L11 N-Terminus und der 23S rRNA binden.^[7j] Thiostrepton würde auf Basis dieser Daten wie eine Art molekularer „Keil“ Bewegungen des L11 N-Terminus relativ zur RNA blockieren und somit auch folgende Translationsschritte beeinflussen. Das Molekül dringt hierbei relativ tief in eine sich eröffnende Spalte zwischen L11 und RNA ein.^[7j] Eine Erhöhung der Flexibilität des N-Terminus von L11 ermöglicht dann voraussichtlich wieder die Einnahme translationsaktiver Konformationen, die im Fall des Protein-Wildtyps in Anwesenheit des Thiopeptidliganden nicht möglich sind. Micrococцин scheint hier eher wie eine Art molekularer „Klebstoff“ zu wirken. Die Kristallstrukturdaten zeigen hier eine eher oberflächliche Bindung des Liganden,

sowie eine deutlich größere Kontaktfläche mit dem Protein.^[7] Diese Indizien verdeutlichen auch warum die Wirksamkeit von Micrococcin durch Veränderungen der Bindeoberfläche auf RNA- und Proteinseite beeinflusst werden kann.

Eine Frage die in diesem Zusammenhang jedoch ungeklärt bleibt ist, welche genaue Rolle L11 für die Bindung von Thiostrepton spielt, wenn viele Punktmutationen toleriert werden. Eine Möglichkeit wäre die Stabilisierung der RNA-Struktur. Studien von Bausch *et al.*^[33] in diesem Zusammenhang zeigten, dass die Entfernung des Protein N-Terminus, die Thiostreptonaffinität drastisch reduziert. Die Aufgabe des N-Terminus könnte hier in einer zusätzlichen Stabilisierung der RNA oder der Bereitstellung eines hydrophoben Gegenstücks zur RNA-Bindung bestehen, welche die Bindeumgebung in einer Richtung flexibel abdichtet. Zur genauen Klärung dieser Frage sind jedoch weitere Analysen notwendig.

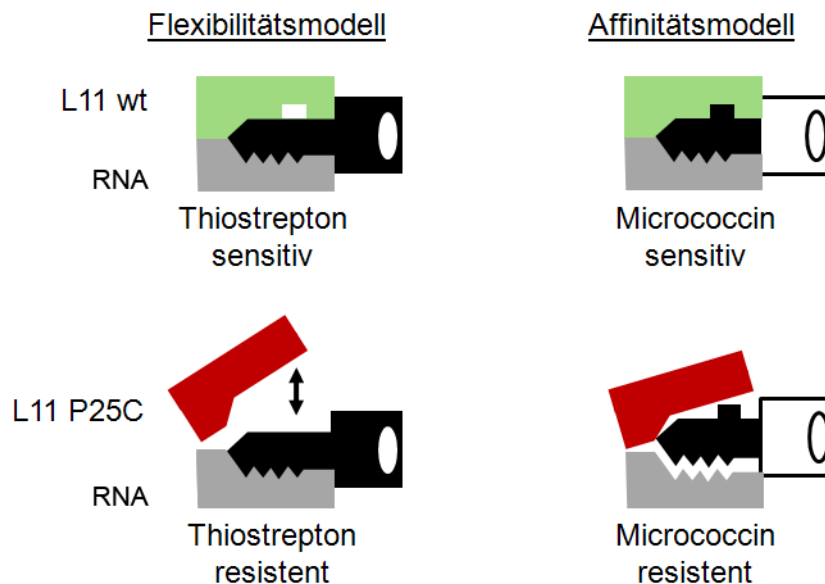


Abbildung 5.15: Schematische Darstellung zweier Modelle der proteinvermittelten Resistenz gegen die Thiopeptidnaturstoffe Thiostrepton **1** und Micrococcin **3**. Im Fall von **1** führen Mutationen des Protein N-Terminus zu einer Flexibilitätserhöhung (Flexibilitätsmodell), welche eine Interaktion des Proteins mit ribosomalen Faktoren trotz effizienter Ligandenbindung zulässt. Im Fall von **3** bewirkt dieselbe Mutation eine Veränderung der Bindungsfläche und verhindert so eine effektive Bindung des Thiopeptidliganden (Affinitätsmodell). Grün: L11 wt; rot: L11 P25C; grau: 23S rRNA.

Die Charakterisierung der molekularen Ursachen der Resistenz gegen Thiopeptidantibiotika verdeutlicht, dass simple Punktmutationen auf RNA- und Proteinseite zu bemerkenswerten molekularen Eigenschaften führen können. Interessanterweise führt die Modifizierung der

Thiopeptidbindestelle, konträr zur Erwartung, nicht ausschließlich zu reduzierten Zielstrukturaffinitäten. Modifizierungen des Proteins beeinflussen nicht die Bindung von bizyklischen Thiopeptiden, führen aber trotzdem zur Resistenz bzw. deutlich erhöhten Thiopeptidtoleranzen. Dieser Sachverhalt muss für die Nutzbarmachung der ribosomalen GTPase-assoziierten Region als Zielstruktur für neue Antibiotika mit einbezogen werden, da selbst hochaffine Liganden ansonsten leicht wirkungslos werden könnten. Affinitätsreduzierende Mutationen auf der RNA-Seite (A1067, A1095) sowie mögliche „nonsense“-Mutationen im L11-Gen tragen zu diesem Befund negativ bei. Es ist jedoch bemerkenswert, dass trotz der jahrelangen Nutzung von Nosiheptid oder Thiostrepton in der Schweinemast und Veterinärmedizin, noch keine Entstehung von Thiopeptidresistenzen *in vivo* berichtet wurde. Der Grund hierfür könnte sein, dass die Thiopeptidinteraktion mit molekularen Gruppen stattfindet, deren Mutation weitreichende Konsequenzen für das Bakterium haben kann, die im Fall von Pathogenen im Wirtsorganismus nicht unbedingt zu einem Selektionsvorteil führen.

Die innerhalb dieser Studie gesammelten Erkenntnisse legen *a priori* dar, welches die molekularen Auswirkungen von Thiopeptidresistenzmutationen sein können. Sie werden eine gezielte chemische Strategieentwicklung (d.h. Wirkstoffdesign und Screening) ermöglichen um die bakterielle 70S ribosomale GTPase-assoziierte Region zu einer fruchtbaren Plattform für die erfolgreiche Bekämpfung prokaryotischer Pathogene zu machen.

5.4 Referenzen

- [1] a) S. B. Levy, B. Marshall, *Nat. Med.* **2004**, *10*, S122-129; b) A. C. Croft, A. V. D'Antoni, S. L. Terzulli, *Med. Sci. Monit.* **2007**, *13*, RA103-118; c) H. Nikaido, *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 119-146.
- [2] a) F. von Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, D. Häbich, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5194-5254; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 5072-5129; b) M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Science* **2009**, *325*, 1089-1093.
- [3] M. C. Bagley, J. W. Dale, E. A. Merritt, X. Xiong, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 685-714.
- [4] G. L. Cromwell, T. S. Stahly, V. C. Speer, R. O'Kelly, *J. Anim. Sci.* **1984**, *59*, 1125-1128.
- [5] a) M. J. Pucci, J. J. Bronson, J. F. Barrett, K. L. DenBleyker, L. F. Discotto, J. C. Fung-Tomc, Y. Ueda, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 3697-3701; b) S. B. Singh, J. Occi, H. Jayasuriya, K. Herath, M. Motyl, K. Dorso, C. Gill, E. Hickey, K. M. Overbye, J. F. Barrett, P. Masurekar, *J. Antibiot.* **2007**, *60*, 565-571; c) S. Pestka, D. Weiss, R. Vince, B. Wienen, G. Stoffler, I. Smith, *Mol. Gen. Genet.* **1976**, *144*, 235-241; d) D. M. Cameron, J. Thompson, S. T. Gregory, P. E. March, A. E. Dahlberg, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 3220-3227; e) E. Cundliffe, *Nature* **1978**, *272*, 792-795; f) J. Thompson, F. Schmidt, E. Cundliffe, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*,

- 7915-7917; g) A. Bechthold, H. G. Floss, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *224*, 431-437; h) M. S. Dunstan, P. C. Hang, N. V. Zelinskaya, J. F. Honek, G. L. Conn, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 17013-17020; i) C. J. Thompson, J. M. Ward, D. A. Hopwood, *J. Bacteriol.* **1982**, *151*, 668-677; j) H. Hummel, A. Bock, *Biochimie* **1987**, *69*, 857-861; k) J. Thompson, E. Cundliffe, A. E. Dahlberg, *J. Mol. Biol.* **1988**, *203*, 457-465.
- [6] A. Bechthold, H. G. Floss, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *224*, 431-437.
- [7] a) G. Rosendahl, S. Douthwaite, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 357-363; b) B. T. Porse, I. Leviev, A. S. Mankin, R. A. Garrett, *J. Mol. Biol.* **1998**, *276*, 391-404; c) B. T. Porse, E. Cundliffe, R. A. Garrett, *J. Mol. Biol.* **1999**, *287*, 33-45; d) W. S. Bowen, N. Van Dyke, E. J. Murgola, J. S. Lodmell, W. E. Hill, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 2934-2943; e) G. L. Conn, D. E. Draper, E. E. Lattman, A. G. Gittis, *Science* **1999**, *284*, 1171-1174; f) B. T. Wimberly, R. Guymon, J. P. McCutcheon, S. W. White, V. Ramakrishnan, *Cell* **1999**, *97*, 491-502; g) G. Lentzen, R. Klinck, N. Matassova, F. Aboul-ela, A. I. Murchie, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 769-778; h) H. R. Jonker, S. Ilin, S. K. Grimm, J. Wöhnert, H. Schwalbe, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 441-454; i) D. Lee, J. D. Walsh, P. Yu, M. A. Markus, T. Choli-Papadopoulou, C. D. Schwieters, S. Krueger, D. E. Draper, Y. X. Wang, *J. Mol. Biol.* **2007**, *367*, 1007-1022; j) J. M. Harms, D. N. Wilson, F. Schluenzen, S. R. Connell, T. Stachelhaus, Z. Zaborowska, C. M. Spahn, P. Fucini, *Mol. Cell.* **2008**, *30*, 26-38; k) W. Li, J. Sengupta, B. K. Rath, J. Frank, *RNA* **2006**, *12*, 1240-1253.
- [8] C. J. Thompson, J. M. Ward, D. A. Hopwood, *J. Bacteriol.* **1982**, *151*, 668-677.
- [9] a) S. Schoof, S. Baumann, B. Ellinger, H. D. Arndt, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 242-245; b) S. Baumann, S. Schoof, M. Bolten, C. Haering, M. Tagaki, K. Shin-Ya, H. D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6973-6981; c) H. D. Arndt, S. Schoof, S. Baumann, B. Ellinger, *PCT/EP2009/001948*.
- [10] J. Thompson, E. Cundliffe, *Biochimie* **1991**, *73*, 1131-1135.
- [11] S. Baumann, S. Schoof, S. D. Harkal, H. D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5664-5666.
- [12] a) K. Hosokawa, R. K. Fujimura, M. Nomura, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1966**, *55*, 198-204; b) M. Nomura, P. Traub, H. Bechmann, *Nature* **1968**, *219*, 793-799.
- [13] T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, H. Mori, *Mol. Syst. Biol.* **2006**, *2*, 1-11.
- [14] B. A. Maguire, L. M. Wondrack, L. G. Contillo, Z. Xu, *RNA* **2008**, *14*, 188-195.
- [15] J. Li, I. H. Kim, E. D. Roche, D. Beeman, A. S. Lynch, C. Z. Ding, Z. Ma, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 794-797.
- [16] S. Zhang, J. M. Scott, W. G. Haldenwang, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 2316-2321.
- [17] F. Perrin, *J. Phys.* **1926**, *7*, 390-401.
- [18] a) E. Gratton, M. Limkeman, *Biophys. J.* **1983**, *44*, 315-324; b) E. Gratton, D. M. Jameson, R. D. Hall, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1984**, *13*, 105-124; c) C. Czeslik, C. Royer, T. Hazlett, W. Mantulin, *Biophys. J.* **2003**, *84*, 2533-2541.
- [19] J. Kelly, A. H. Kutscher, F. Tuoti, *Antibiot. Chemother.* **1960**, *10*, 78-83.
- [20] C. Anagnostopoulos, J. Spizizen, *J. Bacteriol.* **1961**, *81*, 741-746.
- [21] C. Chagneau, M. H. Saier, Jr., *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *8*, 177-188.
- [22] a) P. Hrcnciar, Y. Ueda, S. Huang, J. E. Leet, J. J. Bronson, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8789-8793; b) B. N. Naidu, M. E. Sorenson, J. J. Bronson, M. J. Pucci, J. M. Clark, Y. Ueda, *Bioorg. Med. Chem. Lett* **2005**, *15*, 2069-2072.
- [23] a) E. Cundliffe, J. Thompson, *Eur. J. Biochem.* **1981**, *118*, 47-52; b) D. M. Cameron, J. Thompson, P. E. March, A. E. Dahlberg, *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 27-35; c) M. V. Rodnina, A. Savelsbergh, N. B. Matassova, V. I. Katunin, Y. P. Semenov, W. Wintermeyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1999**, *96*, 9586-9590; d) B. Weisblum, V. Demohn, *FEBS Lett.* **1970**, *11*, 149-152; e) S. Pestka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1970**, *40*, 667-674; f) A. L. Starosta, H. Qin, A. Mikolajka, G. Y. Leung, K. Schwinghammer, K. C. Nicolaou, D. Y. Chen, B. S. Cooperman, D. N. Wilson, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1087-1096.
- [24] L. C. Wieland Brown, M. G. Acker, J. Clardy, C. T. Walsh, M. A. Fischbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2009**, *106*, 2549-2553.

- [25] a) E. Villa, J. Sengupta, L. G. Trabuco, J. LeBarron, W. T. Baxter, T. R. Shaikh, R. A. Grassucci, P. Nissen, M. Ehrenberg, K. Schulten, J. Frank, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2009**, *106*, 1063-1068; b) T. M. Schmeing, R. M. Voorhees, A. C. Kelley, Y. G. Gao, F. V. t. Murphy, J. R. Weir, V. Ramakrishnan, *Science* **2009**, *326*, 688-694; c) B. P. Klaholz, T. Pape, A. V. Zavialov, A. G. Myasnikov, E. V. Orlova, B. Vestergaard, M. Ehrenberg, M. van Heel, *Nature* **2003**, *421*, 90-94; d) L. Brandi, S. Marzi, A. Fabbretti, C. Fleischer, W. E. Hill, C. O. Gualerzi, J. Stephen Lodmell, *J. Mol. Biol.* **2004**, *335*, 881-894.
- [26] U. Saarma, J. Remme, M. Ehrenberg, N. Bilgin, *J. Mol. Biol.* **1997**, *272*, 327-335.
- [27] C. S. Chow, T. N. Lamichhane, S. K. Mahto, *ACS Chem. Biol.* **2007**, *2*, 610-619.
- [28] S. Douthwaite, D. Fourmy, S. Yoshizawa, in *Topics in Current Genetics, Fine-Tuning of RNA Functions by Modification and Editing, Vol. 12* (Ed.: H. Grosjean), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2005**, s. 285-307.
- [29] Y. G. Gao, M. Selmer, C. M. Dunham, A. Weixlbaumer, A. C. Kelley, V. Ramakrishnan, *Science* **2009**, *326*, 694-699.
- [30] B. S. Schuwirth, M. A. Borovinskaya, C. W. Hau, W. Zhang, A. Vila-Sanjurjo, J. M. Holton, J. H. Cate, *Science* **2005**, *310*, 827-834.
- [31] K. Das, J. Ding, Y. Hsiou, A. D. Clark, Jr., H. Moereels, L. Koymans, K. Andries, R. Pauwels, P. A. Janssen, P. L. Boyer, P. Clark, R. H. Smith, Jr., M. B. Kroeger Smith, C. J. Michejda, S. H. Hughes, E. Arnold, *J. Mol. Biol.* **1996**, *264*, 1085-1100.
- [32] D. Tu, G. Blaha, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Cell* **2005**, *121*, 257-270.
- [33] S. L. Bausch, E. Poliakova, D. E. Draper, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 29956-29963.

Kapitel 6

Strukturelle Studien der Thiopeptid- Zielstruktur-Interaktion

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

S. Baumann, S. Schoof, S. D. Harkal, H. D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5664-5666.

6.1 Einleitung

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit existierte außer der Kristallstruktur des Liganden-freien 23S rRNA-L11 Komplexes^[1] keine strukturelle Information über die genaue Bindestelle oder die Bindegeometrie von Thiopeptidantibiotika an der 70S ribosomalen GTPase assoziierten Region. Mutationsstudien, wie auch biochemische „RNA-Footprinting“-Studien mit Thiostrepton **1** und Micrococcin **3**, konnten die zu erwartende Thiopeptid-Binderegion jedoch auf die Spalte zwischen der 23S rRNA L11-Binderegion (1051-1109, *E. coli*-Nummerierung) und dem N-Terminus des ribosomalen L11-Proteins eingrenzen. Auf der RNA-Seite spielen hierbei die beiden Nukleobasen A1067 und A1095 an den Spitzen der Helices 43+44 eine wichtige Rolle.^[2] Auf der Proteinseite schien insbesondere eine prolinreiche Helix des L11 N-Terminus für die Bindung von Wichtigkeit zu sein.^[3] Trotz intensiver kristallographischer^[1] und NMR-spektroskopischer^[4] Untersuchungen wurde die exakte Ortung und vor allem die Orientierung des Liganden kontrovers diskutiert. Eine große Schwierigkeit beim Arbeiten mit Thiopeptidantibiotika ist deren schlechte Löslichkeit in wässrigen Medien, ein Sachverhalt, der auch die Humananwendung dieser bemerkenswert aktiven Naturstoffe^[5] bisher ausschloss und strukturelle Untersuchungen deutlich erschwerte. Um genauere Information über die Bindestelle und vor allem eine genaue Orientierung von Thiopeptidliganden am bakteriellen Ribosom zu erhalten, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine chemisch-biologische Strategie verfolgt. Ein fruchtbarer Ansatz zum Studium von Liganden-Rezeptor-Interaktionen ist die Nutzung von intermolekularer chemischer Reaktivität in Abhängigkeit von der räumlichen Nähe der beiden Interaktionspartner. Solche „affinity labeling“-Strategien wurden bereits mehrere Jahrzehnte erfolgreich zur Analyse des Interieurs von Protein-Rezeptoren genutzt^[6] und sind darüberhinaus für das Studium aktiver Zentren in Enzymen, sehr etabliert.^[7] Auch für die Untersuchung der Wechselwirkung von Liganden mit Rezeptoroberflächen liefert die Literatur Beispiele.^[8] (Ein detailliertere Übersicht über dieses Feld wird in der allgemeinen Einleitung dieser Arbeit (Kapitel 1) dargestellt). Derartige Strategien wurden jedoch bisher nicht für die Charakterisierung der Interaktion von Liganden mit Oberflächen von DNA-Protein- bzw. RNA-Protein-Komplexen etabliert. Eine solche Oligonukleotid-Proteinoberfläche benötigt zur kovalenten Bindung des Liganden reaktive Funktionalitäten auf der Liganden- und Rezeptorseite. Geeignete reaktive Gruppen wären in diesem Zusammenhang Thiol- und Michael-Akzeptor-Paarungen, wobei sich die Funktionalität auf

der Rezeptorseite leichter in das Protein als in das Oligonucleotid einbringen lässt.^[8b, 9] Das Auftreten einer nahe-induzierten kovalenten Reaktion des Liganden mit dem Rezeptor – „Proximity-Induced Covalent Capture“ (PICC)^[10] – würde so einerseits die Bindung des Liganden und darüberhinaus die genaue Bindegeometrie ortsaufgelöst skizzieren (Abbildung 6.1). Wichtige Voraussetzungen für ein solches Experiment sind, dass der Rezeptor keine bindungsinduzierten Strukturänderungen und demnach eine relativ rigide Rezeptorgeometrie aufweist, um eine Übertragung der Resultate auf bekannte Rezeptorstrukturdaten zu ermöglichen. Darüberhinaus darf die kovalente Bindung von Ligand und Rezeptor im Fall eines ternären Komplexes erst nach der nicht-kovalenten Bindung des Liganden an den Rezeptor erfolgen. Die Affinität des Liganden an den Rezeptor muss zusätzlich mikromolar oder kleiner sein, um eine Komplexbildung und chemische Reaktion bei physiologischen Bedingungen zu ermöglichen.

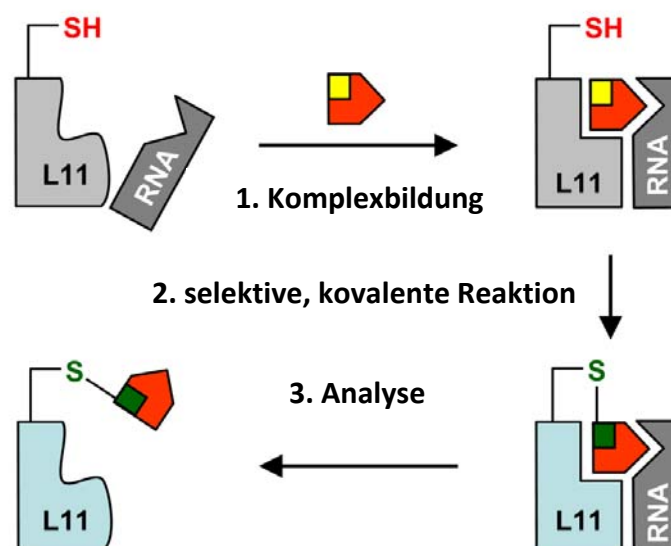


Abbildung 6.1: Prinzip des nahe-induzierten kovalenten Einfangs – „Proximity-Induced Covalent Capture“ (PICC)^[10] – eines Liganden auf Basis eines RNA-Protein-Komplexes. Durch die Bindung des Liganden wird dessen chemisch-reaktive Funktionalität in die Nähe der korrespondierenden, chemisch-reaktiven Funktionalität des Proteins gebracht. Dies führt zur Reaktion zwischen Ligand und Protein, dessen Produkte im Anschluss isoliert und analysiert werden können.

Eine Besonderheit der Thiopeptidantibiotika ist der Besitz einer Vielzahl von Dehydroaminosäuren, vor allem Dehydroalaninen, welche sich über das gesamte Thiopeptidgrundgerüst verteilen^[5a] und welche günstige Voraussetzungen für irreversible 1,4-Thiol-Additionen besitzen.^[11] Die benötigten Thiofunktionen könnten in Form von

Cysteinen, sehr leicht durch *in vitro* Mutagenese in das Rezeptor-Protein eingebracht werden. Die Entwicklung, Prüfung und Anwendung der „Proximity-Induced Covalent Capture“-Methodologie^[10] zur Analyse der Thiopeptidbindegeometrie an isolierten 23S rRNA-L11-Komplexen sowie intakten Ribosomen, ist das Thema dieses Kapitels. Die Methode erlaubte u.a. zum ersten Mal die Untersuchung der genauen Orientierung für verschiedene Thiopeptidnaturstoffe und deren Derivate.

6.2 Proximity-Induced Covalent Capture (PICC)

6.2.1 Methodenentwicklung: PICC isolierter RNA-Protein-Komplexe

Das Cystein-freie L11-Protein aus *Thermus thermophilus* wurde im Rahmen dieser Studie als Modell-Protein verwendet. Auf Basis der Kristallstruktur des 23S rRNA-L11-Komplexes^[1] sowie der biochemischen Kenntnis der Thiopeptidbinderegion^[2-3] wurden geeignete Positionen des L11-N-Terminus für die Einführung von reaktiven Cysteingruppen ausgewählt (Abbildung 6.2+3A). Der Austausch hochkonservierter Aminosäuren wurde hierbei (bis auf G24, *T. thermophilus* Nummerierung) vermieden (Abbildung 6.2). Ausgehend vom Expressionsvektor *pTthL11* (Kapitel 2.5), wurden die gewünschten Einzelaminosäure-Austauschmutanten für alle markierten Positionen mittels *in vitro* Mutagenese (2.10.4) erzeugt und als N-terminal His₆-markierte Fusionsproteine zur Expression gebracht. Alle so hergestellten Fusionsproteine waren in der löslichen Proteinfraction zu finden und wurden mittels Ni²⁺-NTA-Agarose-Affinitätschromatographie unter reduzierenden Bedingungen (2 mM TCEP) gereinigt (2.11.4, vgl. auch Kapitel 5.2.2).

	1	10	20	30	40						
<i>T. thermophilus</i>	----M	KKVVAVV	LQLPAGKAT	PA	PEV	GPA	LGQH	GANIME	FV	KAFNA	
<i>T. fusca</i>	-----	KKVAAQI	KLQLPAGKAT	PAP	PEV	GPALG	QHGVN	NIMEF	CKRFNA		
<i>T. maritima</i>	---	MAKKVAAQI	KLQLPAGKAT	PAP	PEV	GPALG	QHGVN	NIMEF	CKRFNA		
<i>E. coli</i>	---	MAKKVQAYV	KLQVAAGMAN	PS	PEV	GPALG	QQGVN	NIMEF	CKAFNA		
<i>R. bacterium</i>	---	MAKKLAGKM	KLQIPAGQAN	PS	PEV	GPALG	QRGIN	NIMEF	CKAFNA		
<i>C. diphtheriae</i>	-----	KKVAAQI	KLQLPAGKAT	PAP	PEV	GPALG	QHGVN	NIMEF	CKRFNA		
<i>S. griseus</i>	MPP	KKKVTGLI	KLQINAGAAN	PAP	PEV	---	QHGVN	NIMEF	CKAYNA		
<i>R. baltica</i>	---	MAKQVTG	QAKFQVPGG	QAT	PAP	PEV	GTSLG	KYGVN	LGQFV	QQFND	
<i>M. mycoides</i>	---	MAKKITR	VAKLEF	MAMQAK	P---	---	GAELAS	LGIN	MPAFT	TREFND	
<i>N. sennetsu</i>	----	MKKVVARL	KLQVPA	GKAS	ET	PAI	ASSL	GPKGV	NLMK	FQCACNE	
<i>S. solfataricus</i>	-----	MPTKTI	IKIM	VEGGS	AKG	GP	PLG	PTLS	QGLN	VQEVV	KKIND

Abbildung 6.2: Sequenzvergleich der L11-Protein N-Termini (*T. thermophilus* Nummerierung). Hochkonservierte Positionen sind grau unterlegt. Die für die PICC-Studien gewählten Positionen zur Mutation, sind fett gedruckt.

Die produzierten Proteine enthielten >95% aktive Sulfhydrylgruppen (verifiziert durch Titrations mit dem Ellman's Reagenz, siehe Anhang)^[12] und zeigten in CD-spektroskopischen Analysen eine vergleichbare Gesamtfaltung (Abbildung 6.3). Die Mutanten wurden bei neutralem pH auf ihre Reaktivität mit Thiostrepton **1** und Nosiheptid **2** (Abbildung 6.4) überprüft. Zur Charakterisierung der Reaktionsparameter wurden erste Experimente hierzu zunächst mit der L11-Mutante G24C durchgeführt (Abbildung 6.3 A).

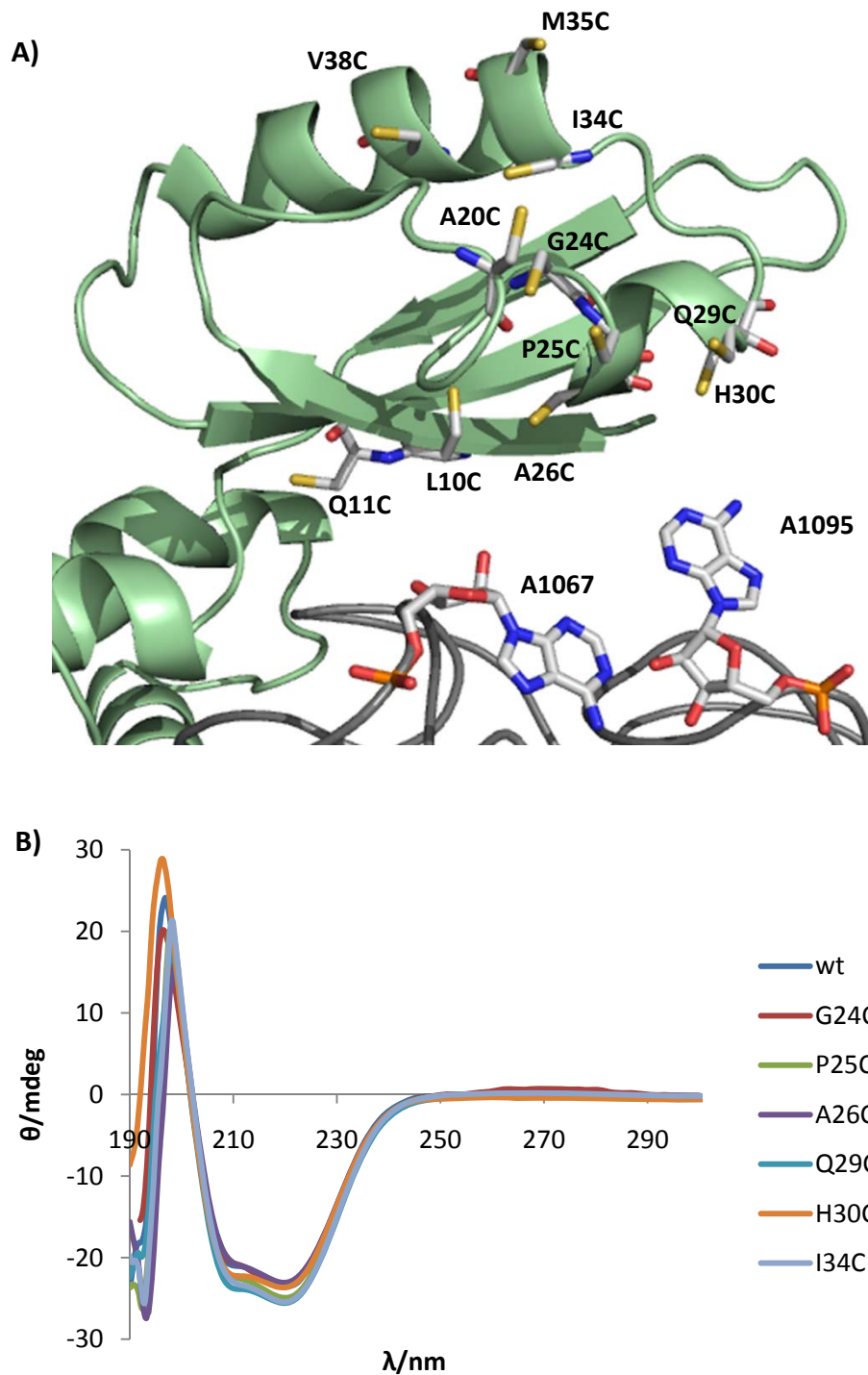
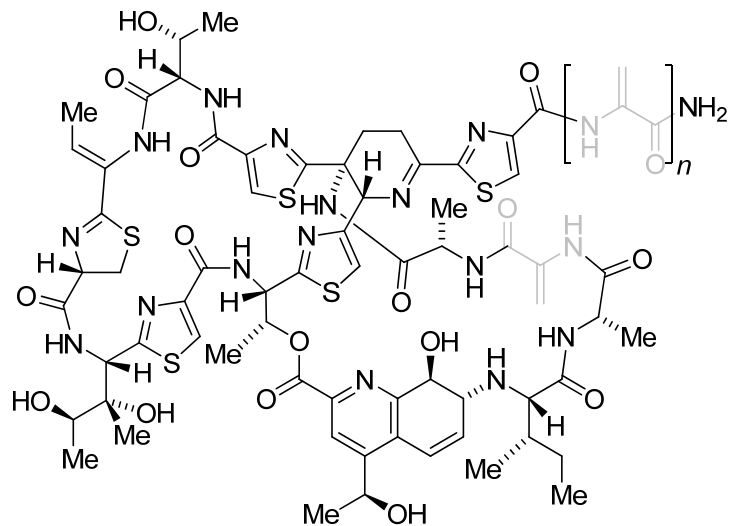
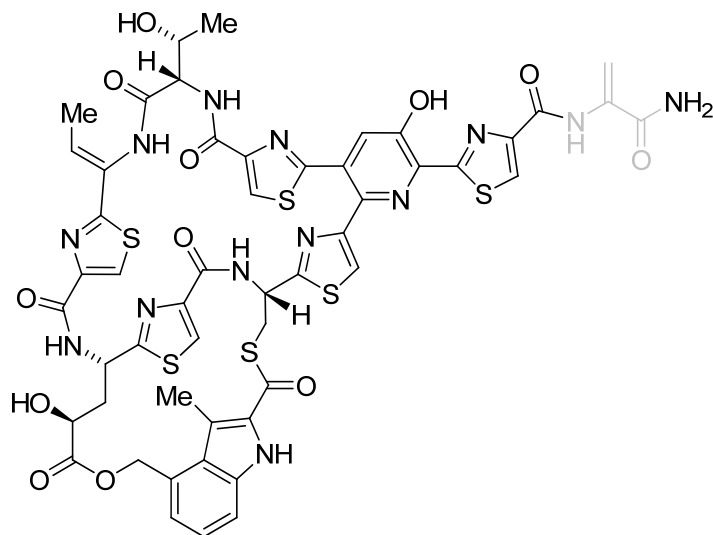


Abbildung 6.3: A) Darstellung der hergestellten Einzel-Cysteinmutanten von *TthL11* auf Basis der Kristallstruktur des L11-23S rRNA-Komplexes (PDB: 1mms).^[1] L11: grün, RNA: grau (die beiden für die Thiopeptidinteraktion essentiellen Nukleobasen A1067 und A1095 sind hervorgehoben). B) CD-Spektren repräsentativer Einzel-Cysteinmutanten von *TthL11*. Die Spektren wurden in Quartzküvetten (d: 0,1 cm) unter reduzierenden Bedingungen (2 mM TCEP) bei einer Proteinkonzentration von 3 μ M und 5°C aufgenommen.



1: n = 2, 12: n = 1, 13: n = 0



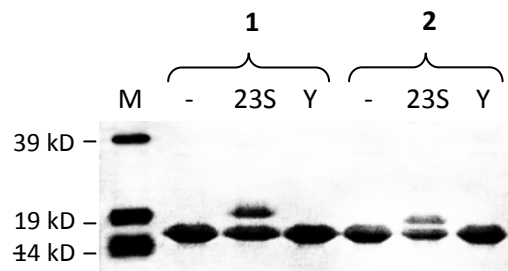
2

Abbildung 6.4: Chemische Strukturen von Thiostrepton **1** sowie dessen verkürzten Derivaten **12** und **13** sowie Nosiheptid **2**. Dehydroalanin-Einheiten sind grau markiert.

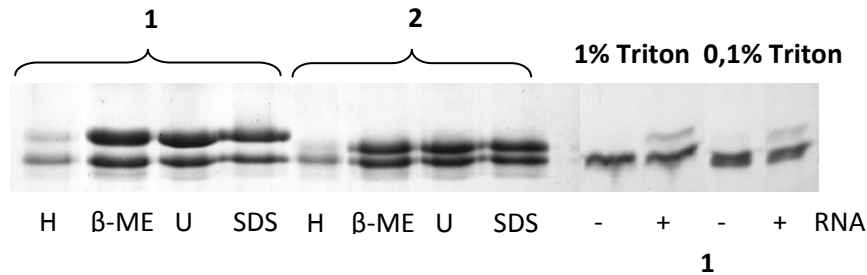
Interessanterweise, führte die Komplexierung von L11-Proteinmutanten, der L11-Bindedomäne der 23S rRNA (58 nt, 1051-1109, *E. coli* Nummerierung vgl. Kapitel 2.10.1.1 und 3.2.1) und des Thiopeptidliganden unter physiologischen Konzentrationen (0,5-5 μM) innerhalb weniger Stunden, zur Bildung eines neuen Proteinprodukts von L11-G24C (Abbildung 6.5 A). Typische denaturierende Bedingungen, (SDS, Hitze, 8 M Harnstoff, β -Mercaptoethanol) sowie Detergenzien (bis 1% Triton-X) bzw. die An- oder Abwesenheit von Mg^{2+} -Ionen hatten keinen Einfluss auf die Produktintegrität und zeigten so die Ausbildung einer kovalenten Bindung (Abbildung 6.5 B). In SDS-PAGE-Analysen der Protein-Addukte von G24C mit **1** bzw. **2** konnten die Addukte leicht von den Ursprungproteinen unterschieden und darüberhinaus die Thiopeptid-abhängigen Massenunterschiede der G24C-**1**- bzw. G24C-**2**-Addukte bestimmt werden (Abbildung 6.5). Weder in der Abwesenheit von RNA oder in der Anwesenheit einer undefinierten Mischung von RNAs aus Hefe-Extrakten wurde, unter den verwendeten Bedingungen, eine signifikante Produktbildung beobachtet (Abbildung 6.5 A). Zusammen mit der RNA-Konzentrationsabhängigkeit der PICC-Reaktion (Abbildung 6.5 C), belegt dies Wichtigkeit des passenden 23S rRNA Fragments für die kovalente Addition. Die Behandlung des Proteins mit dem Cystein-alkylierenden Reagenz Iodoacetamid, oder der Umsatz von Thiostrepton **1** mit Cystein^[13] vor der PICC-Reaktion, unterdrückte die Addition des Thiopeptidliganden vollständig (Daten nicht gezeigt). Dies zeigte, dass das Protein-interne Cystein selektiv über eine *Sulfa*-Michael-Addition mit einem der Dehydroalanine von **1** reagierte.

Die Analyse der PICC-Reaktionsmischungen und Proteingele mit MALDI-TOF bestätigte zusätzlich die Entstehung kovalenter Thiopeptid-Monoaddukte (Abbildung 6.6 A+B). Die Massendifferenzen von Proteinedukt sowie PICC-Produkt entsprachen hierbei den Massen der addierten Thiopeptide. Das Auftreten multipler Additionen wurde nicht beobachtet und zeigte somit die hohe Selektivität der Reaktionen. Der proteolytische Verdau der PICC-Reaktionsprodukte erlaubte darüberhinaus die genaue Zuordnung des Thiopeptid-Anknüpfungspunkts am Protein (Abbildung 6.6 C+D).

A)



B)



C)

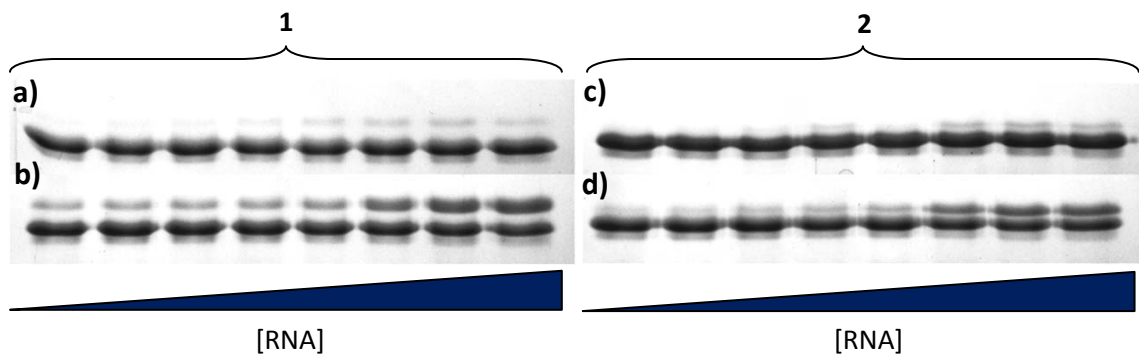


Abbildung 6.5: A) 15%igen SDS-PAGE (Coomassie-gefärbt) von *TthL11 G24C* (5 μM) inkubiert mit Thiostrepton (**1**) oder Nosiheptid (**2**); keine RNA (-), 5 μM *E. coli* 23S rRNA (1051-1109, +), Hefe-Gesamt-RNA (2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), Marker (M). B) Analyse der Stabilität der *TthL11 G24C*-PICC-Addukte von **1** und **2**. Nach der PICC-Reaktion wurden die L11/L11-Addukt-Gemische (1:1:1 Gemische von L11, RNA, und Thiopeptid, je 5 μM) folgenden Bedingungen ausgesetzt: H: 10 min. 95°C; β -ME: 10 min. 2,5% (v/v) β -Mercaptoethanol + 10 min. 95°C; U: 8 M Harnstoff + 10 min. 95°C; SDS: 5% (w/v) SDS + 10 min. 95°C. Die Stabilität des *TthL11 G24C* **1** wurde zusätzlich noch in Anwesenheit von 0,1 bzw. 1% (w/v) Triton-X überprüft. C) RNA-Konzentrationsabhängigkeit der PICC-Reaktion. *TthL11 G24C* (5 μM) wurde hierzu mit **1** (1 (a) bzw. 10 μM (b)) bzw. **2** (1 (c) bzw. 10 μM (d)) gemischt und mit 23S rRNA (1051-1109) titriert. Eingesetzte RNA-Konzentrationen: 0; 0,05 μM ; 0,2 μM ; 0,5 μM ; 1 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM .

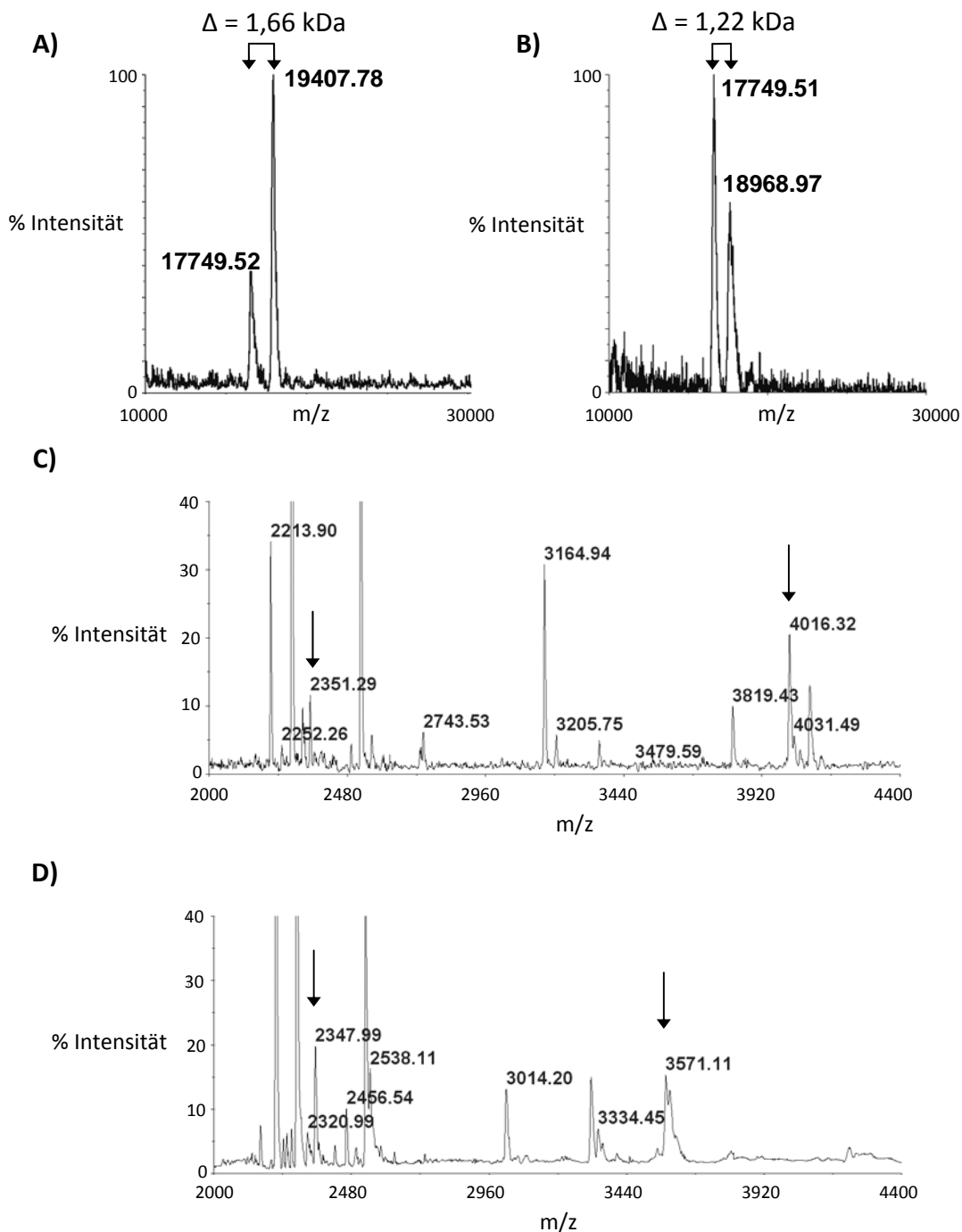


Abbildung 6.6: MALDI-TOF-Spektren der *TthL11* G24C 1- (A) bzw. 2-PICC-Addukte.(B): $M(TthL11\ G24C) = 17751\ Da$; $M(\mathbf{1}) = 1664,9\ Da$; $M(\mathbf{2}) = 1222,4\ Da$. C+D) MALDI-TOF-Spektren des proteolytischen Verdauers der *TthL11* G24C PICC-Addukte von **1** (A) und **2** (B). Der tryptische Verdau von *TthL11* G24C ($M: 17751\ Da$) *in silico* liefert ein $2349,79\ Da$ Fragment, welches den Aminosäureaustausch $G \rightarrow C$ belegt: $(K)A_{(17)}TPAPPVCPALGQHGANIMEFVK_{(39)}(A)$. Ergebnisse *in vitro*: C) Vollständiges MALDI-TOF-Spektrum des tryptischen Verdauers des *TthL11* G24C-1-Addukts: Fragment $2349,8$ (berechnet), $2351,3$ (gefunden); Fragment + **1** $4013,8$ (berechnet), $4016,3$ (gefunden). D) Vollständiges MALDI-TOF-Spektrum des tryptischen Verdauers des *TthL11* G24C-2-Addukts: Fragment $2349,8$ (berechnet), $2351,3$ (gefunden); Fragment + **2** $4013,8$ (berechnet), $4016,3$ (gefunden).

Bei der Titration von *Tth*L11 G24C und **1** (Abbildung 6.5 C) mit RNA fiel auf, dass es zu leichten Hintergrundreaktion von L11 und **1** in Abwesenheit von RNA kam. Gründe hierfür könnten unspezifische Interaktionen von L11 und **1** sein. Die Herabsetzung der Thiopeptidkonzentration (physiologische 1-5 μM) konnte diesen Effekt jedoch vollständig unterdrücken (Abbildung 6.5 A). Andere unspezifische Reaktionen wurden nur bei pH-Werten über 8.5 oder stark erhöhten Konzentrationen sichtbar (Daten nicht gezeigt). Darüberhinaus war auffällig, dass bei PICC-Reaktionen (1:1:1 Stöchiometrie der beteiligten Moleküle) nur ca. 50% Produktbildung beobachtet werden konnte, welches möglicherweise durch strukturelle Flexibilität innerhalb des Komplexes, durch die schlechte Löslichkeit bzw. Aggregation des Thiopeptidliganden oder auch durch unspezifische Nebenreaktionen bedingt sein kann.

Eine Reihe unterschiedlicher L11-Cysteinmutanten (Abbildung 6.2 + 6.3 A) wurde im Folgenden auf PICC-Reaktivität untersucht (Abbildung 6.7). Für **1** konnten vier charakteristische, reaktive Positionen identifiziert werden: G24C, P25C, Q29C und I34C. Darüberhinaus, zeigten die beiden Positionen A20C und H30C schwache Reaktivität. Für **2** zeigten die PICC-Experimente interessanterweise nur zwei reaktive Positionen: G24C und P25C. Es ist erwähnenswert, dass viele Prokaryoten an Position 38 (V38 in *T. thermophilus*) ein Cystein aufweisen (Abbildung 6.2). Die fehlende Reaktivität dieser Position im PICC-Experiment zeigt, dass diese nativen Cysteine für den Wirkmechanismus von Thiopeptiden *in vivo* keine kovalente Reaktion eingehen. Die Darstellung der reaktiven Positionen für **1** und **2** auf Basis der Kristallstruktur des L11-23S rRNA (1051-1109)-Komplexes (Abbildung 6.8),^[1] zeigt einen sehr engen und definierten reaktiven PICC-Bereich für beide Thiopeptide. **2**, mit seinem einzelnen Michaelakzeptorsystem im azyklischen Molekülschwanz (Abbildung 6.4), reagierte ausschließlich mit den zwei benachbarten Positionen G24C und P25C und ließ so eine auf die Aminosäure genaue Positionierung des Thiopeptid-Dehydroalanins im ternären Komplex zu.

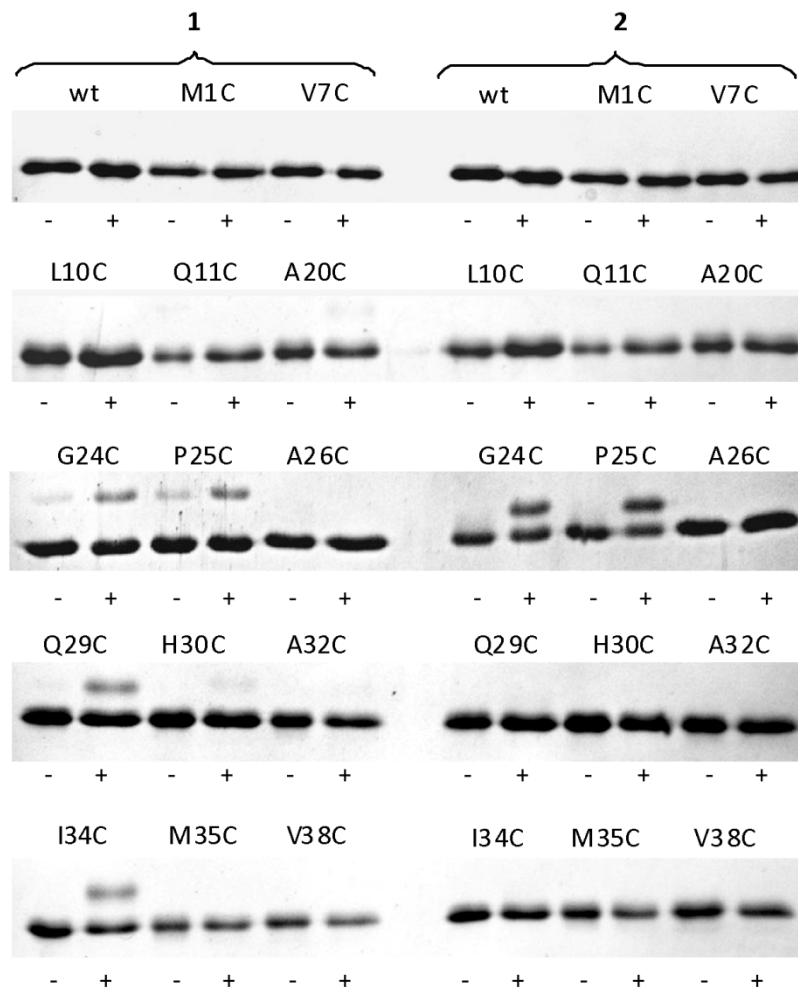
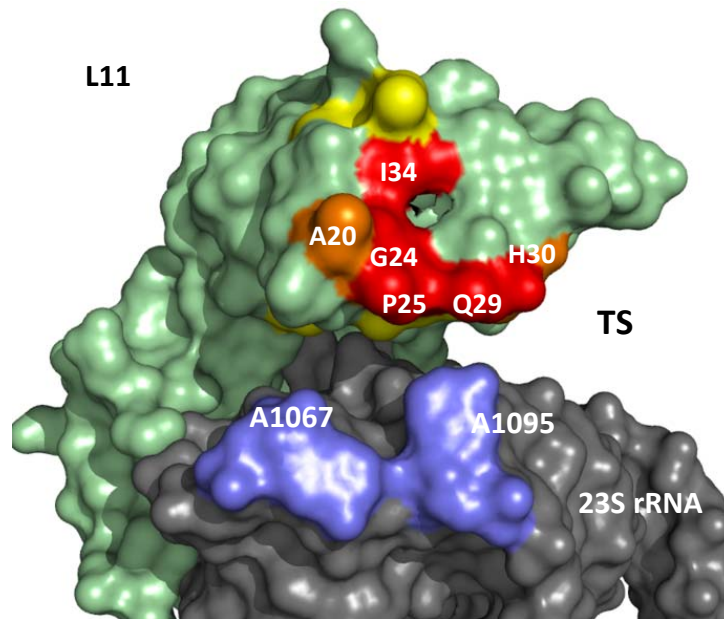


Abbildung 6.7: PICC-Analyse sämtlicher hergestellter *TthL11* Einzel-Cysteinmutanten. Hierzu wurden stöchiometrische Mengen der Proteinmutanten und der Thiopeptide **1** bzw. **2** (5 μ M) in An- (+) oder Abwesenheit (-) der *E. coli* 23S rRNA (1051-1109) inkubiert und die Ausbildung kovalenter Addukte mittels 15%iger SDS-PAGE (Coomassie gefärbt) analysiert.

Interessanterweise befanden sich die reaktiven Positionen für **2** exakt an der Spalte zwischen dem L11-N-Terminus und der 23S rRNA, der postulierten Bindestelle der Thiopeptide.^[1-4] Für **1** konnte drei reaktive Areale gefunden werden (Abbildung 6.8). Neben G24C und P25C, waren die im Bezug auf die Aminosäuresequenz zwar entfernten, jedoch in der L11-Tertiärstruktur direkt benachbarten Positionen Q29C und I34C an der Reaktion beteiligt. In Anbetracht der strukturellen Verwandtschaft zu **2**, steht dieses im Vergleich zu **2** größere dreieckige Reaktionsmuster im Einklang mit dem längeren und flexiblen, azyklischen Dehydroaminosäureschwanz von **1**. Die Dehydrobutyrin-Einheit des A-Rings von **1** und **2** zeigte generell keine Reaktivität mit Thiolen.^[14]

A)



B)

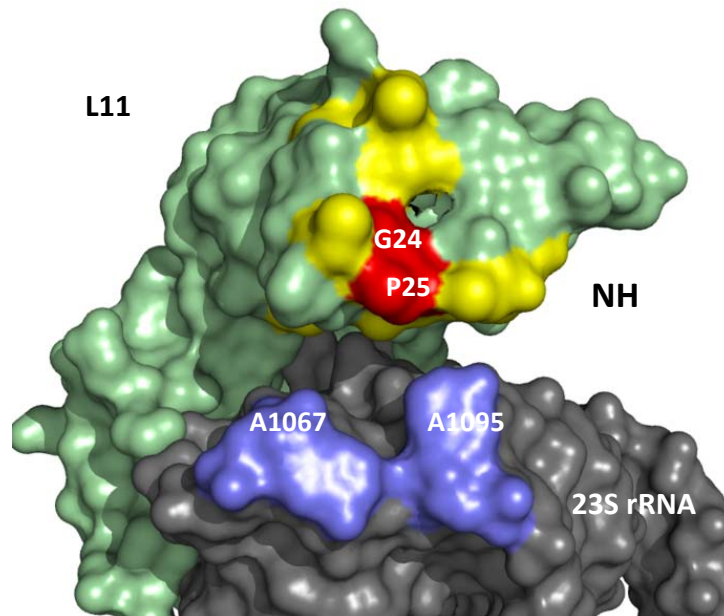


Abbildung 6.8: Visualisierung PICC-reaktiver Einzel-Cysteinmutanten von *Tth*L11 bei der PICC-Analysen von Thiostrepton (TS, **1**, A) und Nosiheptid (**2**, B) auf Basis der Kristallstruktur des L11-23S rRNA-Komplexes (PDB: 1mms).^[1] rot: starke Reaktivität; orange: schwache Reaktivität; gelb: unreaktive Mutanten. Die Positionen der beiden für die Thiopeptidbindung essentiellen RNA-Basen A1067 und A1095 sind blau dargestellt

Um eine genaue Zuordnung der PICC-reaktiven Positionen G24C (P25), Q29C und I34C, zu den drei unterschiedlichen Dehydroaminosäuren von Thiostrepton (**1**) zu ermöglichen, wurden PICC-Experimente mit trunkierten Derivaten von **1** durchgeführt, bei denen eine (**12**)

oder beide (**13**) Dehydroalanin-Einheiten des azyklischen Molekülschwanzes fehlten (Abbildung 6.4).^[5b, 14] Die Entfernung des ersten Dehydroalanins (DHA1, Abbildung 6.9 B) führte zu einem Verlust von PICC-Reaktivität an Position I34C und ließ somit die genaue Lokalisierung von DHA1 an dieser Position zu (Abbildung 6.9). Die Entfernung des zweiten Dehydroalanins (DHA2, Abbildung 6.9 B) führte dann zu einem zusätzlichen Reaktivitätsverlust an Position G24C und Q29C (vgl. Abbildung 6.8). DHA2 befand sich im ternären Komplex somit zwischen diesen beiden Positionen. Diese Resultate lieferten ein auf die Aminosäure genaues Bild über die Lage des azyklischen Molekülschwanzes von **1**. Darüberhinaus konnten weitere wichtige Parameter für die Gesamtorientierung von **1** entnommen werden. Das Dehydroalanin im B-Ring von **1** (DHA3) zeigte keine PICC-Reaktivität (obwohl generell *Sulfa*-Michael-Additionen an diese Position möglich sind, vgl. Kapitel 4.2.2)^[14] und musste somit weit entfernt von Protein, wahrscheinlich zum Lösungsmittel ausgerichtet, liegen. Darüberhinaus müsste sich der Bismakrozyklus von **1** (auf Basis der Kristallstruktur des L11-RNA-Komplexes)^[1] somit in der Spalte zwischen der prolinreichen Helix des L11-N-Terminus^[3] und der 23S rRNA befinden (Abbildung 6.8).

Die Aminosäureumgebung eines Cysteins im Kontext eines Proteins, kann einen Einfluss auf den pK_a -Wert des Cysteins und somit auch dessen Reaktivität haben. Vor allem Cysteine in katalytische Zentren von Enzymen zeigen, im Vergleich zu einem simplen Peptid-internen (8,5 – 9,1)^[15] oder freien Cysteins (8,3), deutlich erniedrigte pK_a -Werte (bis zu 5 pH-Stufen), welche ihre hohe Reaktivität erst ermöglichen.^[16] Um auszuschließen, dass die erhaltenen PICC-Reaktivitätsmuster das Resultat unterschiedlicher pK_a -Werte der einzelnen Cysteine der L11-Mutanten sind, wurden die pK_a -Werte aller Mutanten UV-spektroskopisch bestimmt. Hierzu wurde die charakteristische Absorption des Thiolatanions bei 240 nm genutzt (Abbildung 6.10, Tabelle 6.1).^[17] Da sich die für die Protein-Reinigung installierte His₆-Markierung als störend für die Messungen erwies, wurde dieser proteolytisch entfernt. Alle L11-His₆-Fusionskonstrukte enthielten die Erkennungssequenz der Faktor Xa-Protease, welche eine spurlose Entfernung der His₆-Markierung ermöglichte (vgl. Kapitel 2.9.4.1). Die pK_a -Werte der PICC-reaktiven Positionen G24C, P25C, Q29C und I34C zeigten keine signifikanten Unterschiede zu denen der PICC-unreaktiven Positionen. Dieses Resultat unterstrich somit die Selektivität und Spezifität der PICC-Methode zu räumlichen Kartierung der reaktiven Thiopeptid-Dehydroaminosäuren auf der Oberfläche von L11. Darüberhinaus könnten die pK_a -Werte der Mutanten-Cysteine (8 - 8,3) auch eine Erklärung für die mäßigen

PICC-Adduktausbeuten (max. 50%) sein, da die PICC-Reaktion, aufgrund unspezifischer Reaktionen bei pH-Werten > 8.5, standardmäßig bei pH 8.0 durchgeführt wurde.^[18]

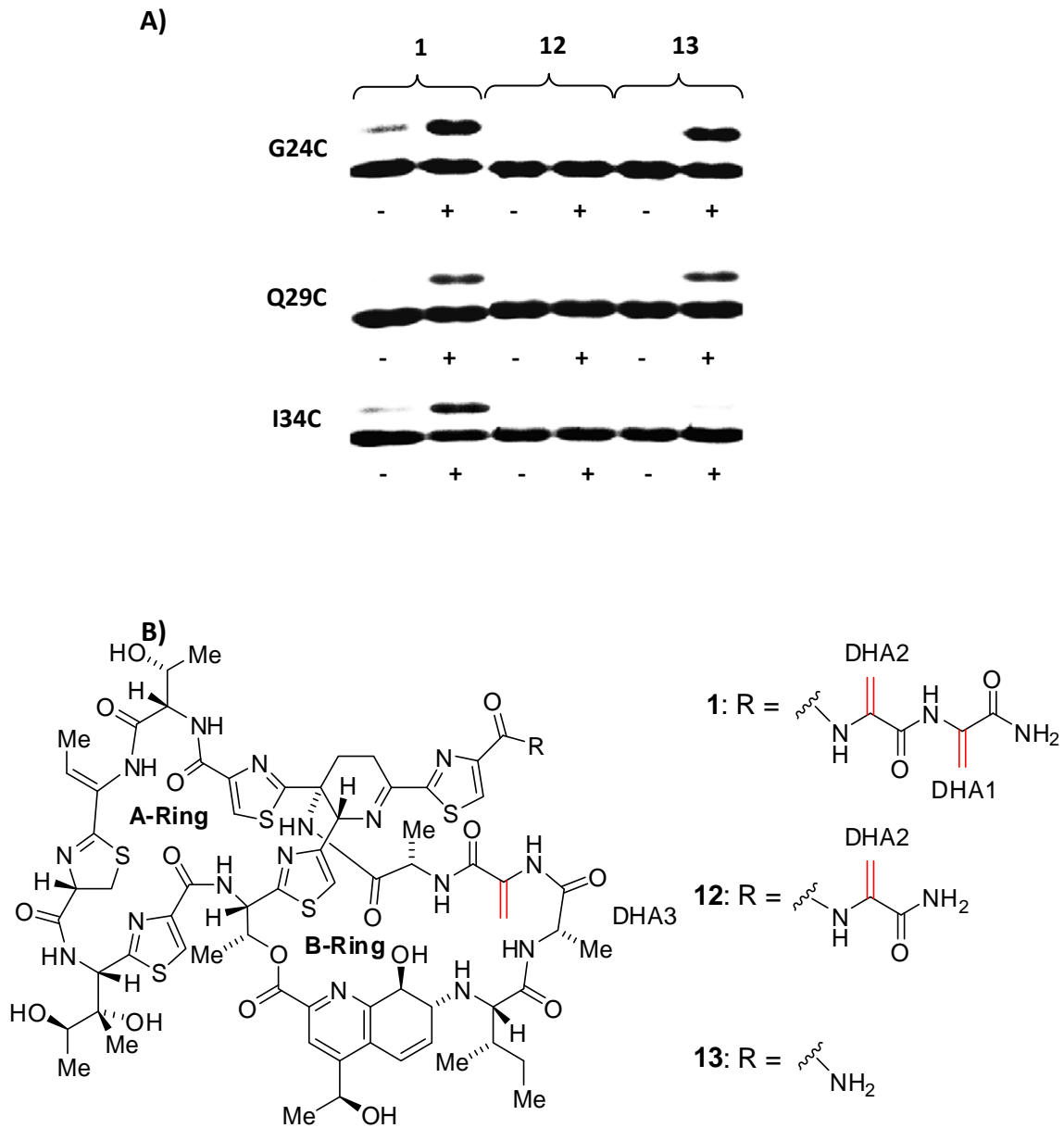


Abbildung 6.9: A) PICC-Analyse der verkürzten Thiostrepton-Derivate **12** und **13** (Abbildung 6.4) mit den *TthL11* Mutanten G24C, Q29C und I34C in An- (+) oder Abwesenheit (-) der *E. coli* 23S rRNA (1051-1109). Als Kontrolle wurde **1** verwendet. B) Chemische Struktur von **1**. Die Dehydroalanin-Einheiten (DHA1-3) sind rot markiert.

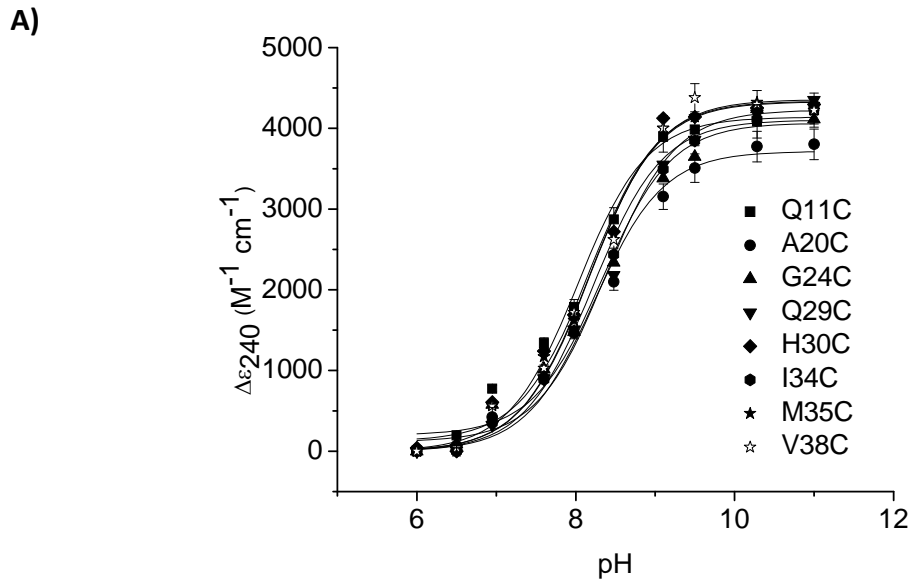


Abbildung 6.10: pK_a -Werte verschiedener *TthL11*-Cysteinmutanten: A) Graphische Darstellung der Extinktionskoeffizienten unterschiedlicher *TthL11*-Cysteinmutanten bei 240 nm als Funktion des pH-Werts ($\Delta\epsilon_{240} = \epsilon_{240}(\text{pH } 11) - \epsilon_{240}(\text{pH } 6)$). Die pK_a -Werte wurden durch die Anpassung der sigmoidalen Kurven an die Henderson-Hasselbalch-Gleichung bestimmt (vgl. 2.9.10).^[17]

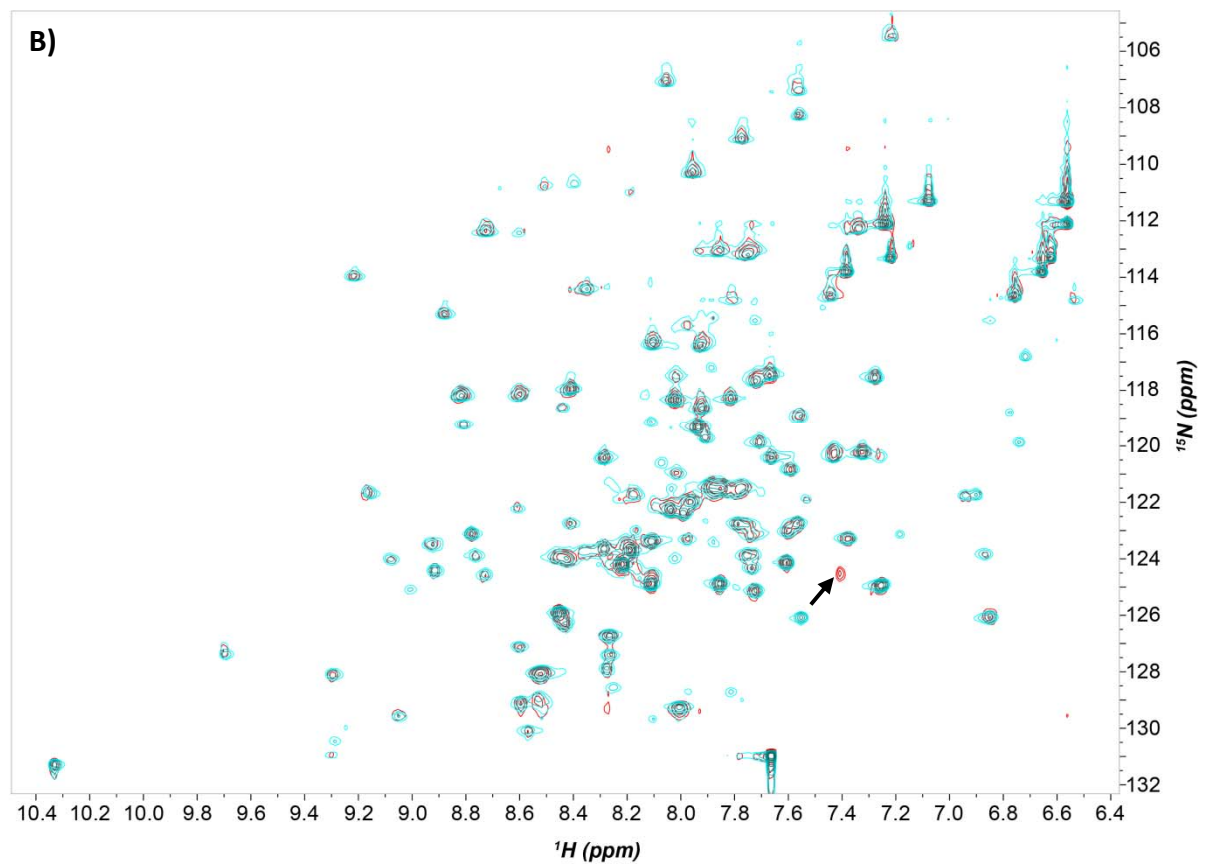
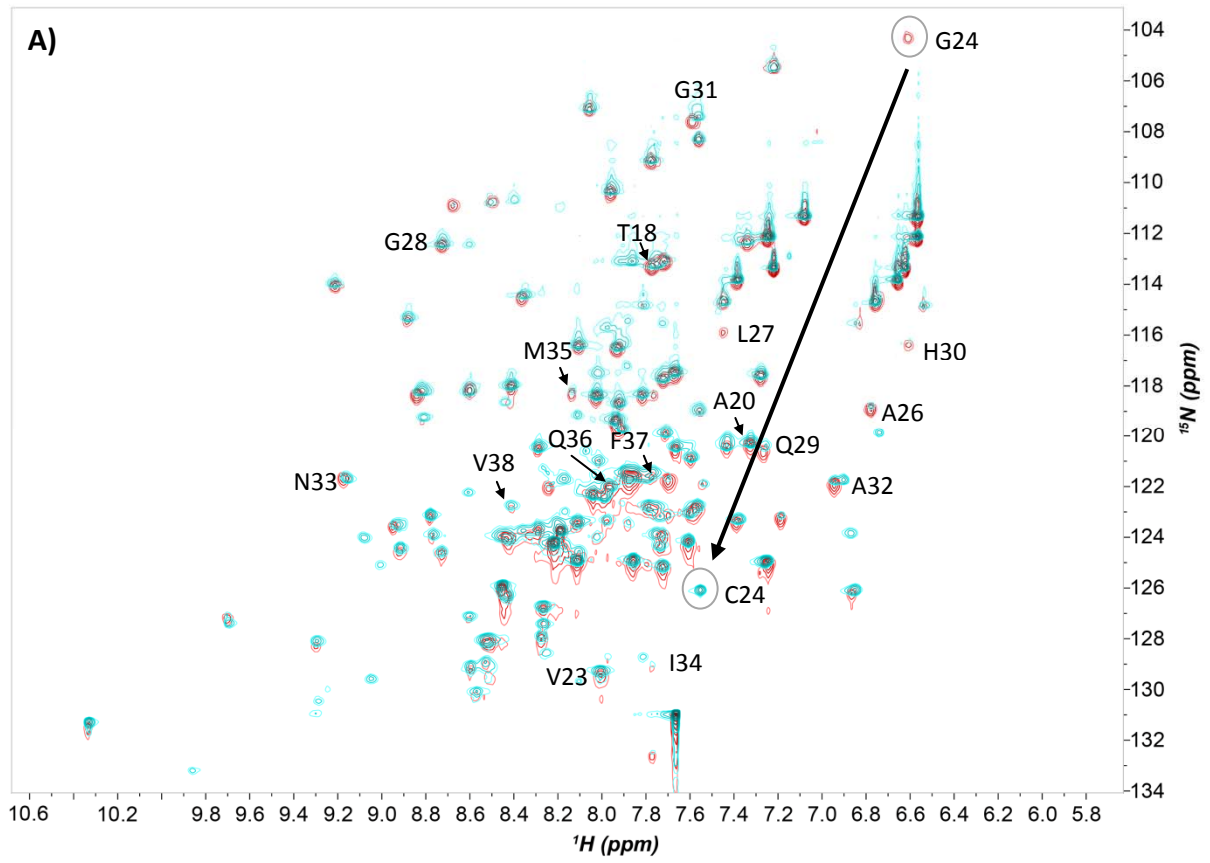
Mutante	pK_a
Q11C	$8,02 \pm 0,08$
A20C	$8,23 \pm 0,08$
G24C	$8,33 \pm 0,08$
Q29C	$8,37 \pm 0,05$
H30C	$8,17 \pm 0,1$
I34C	$8,22 \pm 0,05$
M35C	$8,17 \pm 0,09$
V38C	$8,18 \pm 0,07$

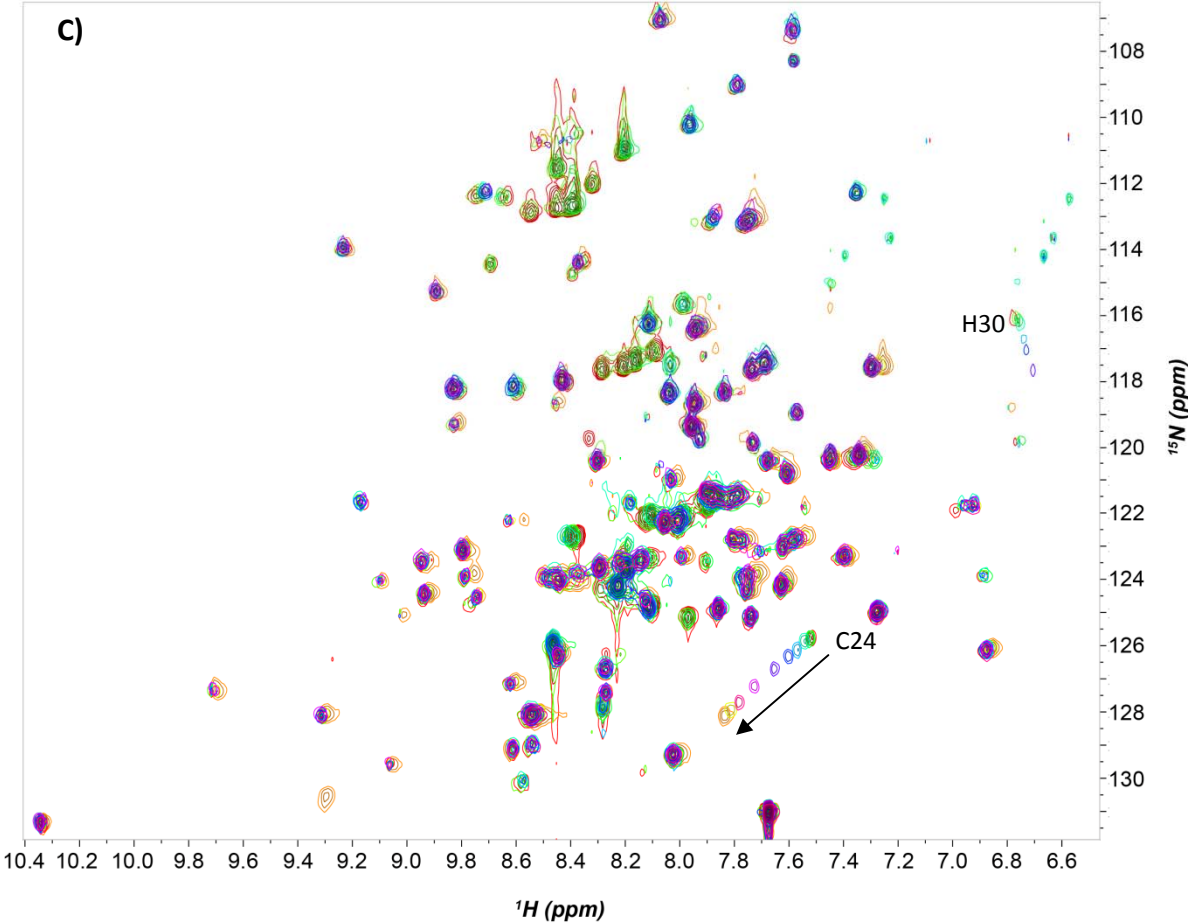
Tabelle 6.1: pK_a -Werte der *TthL11*-Mutanten (jeweils Dreifachbestimmungen)

Die *TthL11*-Mutante G24C gehörte sowohl bei **1** als auch **2** zu den reaktivsten Positionen im PICC-Experiment. Zur genaueren Überprüfung potentieller, durch diese Mutation verursachte, Strukturänderungen, wurden ^{15}N -HSQC-NMR-Experimente mit dem *TthL11* Wildtyp und der Mutante G24C durchgeführt. Glücklicherweise, war eine Vollzuordnung der $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -Korrelationssignale für das *Thermus thermophilus* L11 Protein bereits publiziert (BMRB Eintrag 4965).^[19] Eine Zuordnung der Signale aus den eigenen Experimenten war so vergleichsweise einfach. Alle Korrelationssignale der Vollzuordnung des Wildtypproteins^[19]

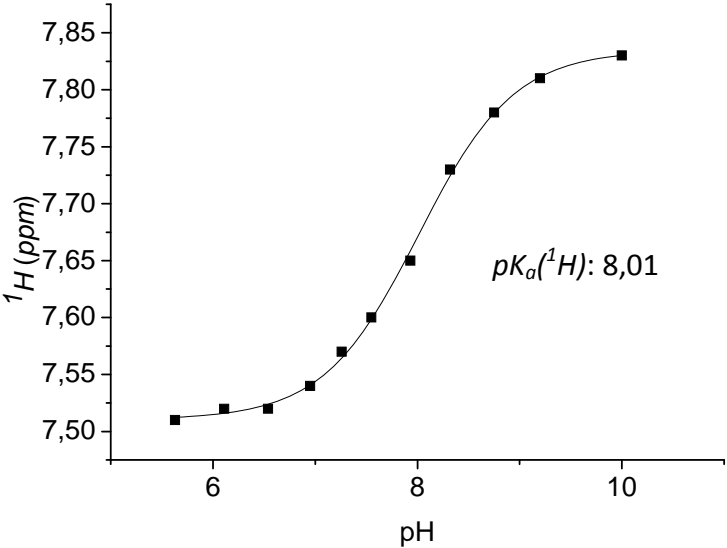
konnten auch für das selbsthergestellte Wildtyp-Protein und die Mutante G24C identifiziert werden. Die ^{15}N -HSQC-Spektren (298,1 K) waren für G24C und Wildtyp generell identisch. Ein signifikanter Unterschied war jedoch das fehlende Signal für G24 bei ^1H : 6,77 ppm ^{15}N :102,35 ppm, welches durch ein neues Signal bei ^1H : 7,55 ppm ^{15}N :126,00 ppm ersetzt wurde (Abbildung 6.11 A). Alle anderen Signale wiesen keine oder nur minimale Veränderungen auf, so dass die Mutation als Struktur-invariant angesehen werden kann. Die Umsetzung des Mutanten-Proteins mit dem Cystein-alkylierenden Reagenz Iodoacetamid bewirkte eine Verschiebung des ^1H : 7,55 ppm ^{15}N :126,00 ppm Signals zu ^1H : 7,41 ppm ^{15}N :124,5 ppm und erlaubte so eine Zuordnung dieses Signals als Cystein24 (Abbildung 6.11 B).

Die Änderung des pH-Werts des NMR-Puffers induzierte interessanterweise Änderungen der chemischen Verschiebung des C24 Korrelationssignals auf der ^1H - und ^{15}N -Ebene. Das Signal änderte hierbei seine Position von einem Sättigungsbereich bei ^1H : 7.51 ppm; ^{15}N : 125.78 ppm im Sauren (pH 5.63) zu einem zweiten Sättigungsbereich bei ^1H : 7.83 ppm; ^{15}N : 128.11 ppm im Basischen (pH 10.0) ($\Delta^1\text{H}$: 0.32 ppm; $\Delta^{15}\text{N}$: 2,33 ppm) (Abbildung 6.11 C). ^{15}N -HSQC-pH-Titrations von Cysteinen sind in der Literatur bisher nicht beschrieben. In ^{13}C -HSQC-pH-Titrations zeigt die Deprotonierung eines Cystein-Thiols jedoch im Allgemeinen eine charakteristische Verschiebung des ^{15}N -Signals von $\Delta^{13}\text{C}$: $\sim 2,5$ ppm.^[20] Der für C24 bestimmte $\Delta^{15}\text{N}$ - Wert von 2,33 ppm ist mit einer solchen Verschiebung sehr gut vergleichbar und könnte ein Indiz für die Deprotonierung des C24-Thiols sein. Die Auftragung der ^1H - bzw. ^{15}N -chemischen Verschiebung als Funktion des pH-Werts ergab in beiden Fällen sigmoidale Kurven. Die Anpassung dieser Kurven an die Henderson-Hasselbalch-Funktion lieferte die pKa-Werte $pK_a(^1\text{H})$: 8,01 und $pK_a(^{15}\text{N})$: 8,11 (Abbildung 6.11 D). Der pKa-Wert für C24 aus der NMR-Analyse stimmte somit sehr gut mit dem UV-spektroskopischen Ergebnis von 8,33 überein (Abbildung 6.10 B). Überraschend war in diesem Zusammenhang, dass der Protonierungszustand des C24-Thiols über ein ^{15}N -HSQC-Experiment messbar war. Im ^{15}N -HSQC-Experiment werden die chemischen Verschiebungen des Amid-Protons sowie des Amid-Stickstoffs detektiert und korreliert. Eine plausible Erklärung dieses Sachverhalts wäre der Aufbau einer möglichen, intramolekularen H-Brücke zwischen dem Amid-Proton und der Thiolat-Funktion des Cysteins, wie sie bereits in Proteinen^[21] oder kleinen organischen Molekülen wie N-Acyl Glycinethyldithioestern^[22] beschrieben wurde. Die Sequenzumgebung scheint für den Effekt darüberhinaus von Wichtigkeit zu sein. Bei der Analyse weiterer L11-





D)



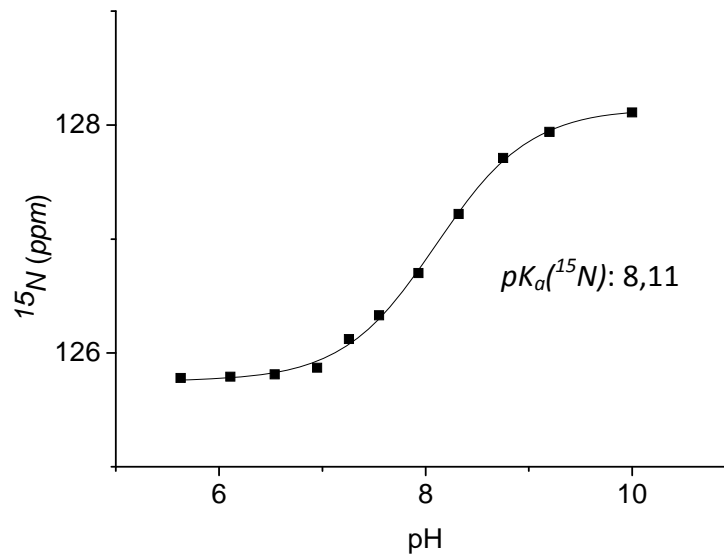


Abbildung 6.10: A) (vorherige Seite) Überlagerung der ^{15}N -HSQC-Spektren (298,1 K) für *TthL11* G24C (blau) und Wildtyp (rot). Wichtige Korrelationspunkte wurden nach Markus *et al.*^[19] zugeordnet. B) Überlagerung der ^{15}N -HSQC-Spektren für *TthL11* G24C vor (blau) und nach (rot) der Reaktion mit Iodoacetamid. Die Verschiebung des Korrelationssignals der Aminosäure C24 ist durch einen Pfeil markiert. C) Überlagerung der ^{15}N -HSQC-Spektren (298,1 K) der pH-Titration von *TthL11* G24C: Rot (pH 5.63), Hellgrün (pH 6.11), Dunkelgrün (6.54), Mint (pH 6.95), Hellblau (pH 7.26), Dunkelblau (pH 7.55), Lila (pH 7.93), Rosa (pH 8.32), Dunkelrosa (pH 8.75), Gelb (pH 9.2), Orange (pH 10.0). C24 ist durch einen Pfeil markiert. Der pH-Wert nimmt in Pfeilrichtung zu. D) Graphische Auftragung der chemischen Verschiebung von ^1H und ^{15}N als Funktion des pH-Werts (siehe C). Zur Ermittlung des pK_a -Werts wurden die sigmoidalen Kurven an die Henderson-Hasselbalch-Funktion angepasst.

Mutanten (V7C, Q29C und V38C) wurde keine vergleichbare pH-abhängige Änderung der Cystein-Signale beobachtet (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise spielt in diesem Zusammenhang die hohe Dichte an Prolinen im Sequenzbereich oder die direkte Nachbarschaft von G24C zu P25 eine wichtige Rolle.

Wie in Kapitel 5 beschrieben, hatte die Transversionsmutation der, für die Thiopeptid-Zielstruktur-Interaktion wichtigen Nukleobasen A1067 und A1095, einen z.T. drastischen Einfluss auf die Zielstruktur-Affinität der Thiopeptide. Um zu prüfen ob die eingeführten Mutationen neben der Affinitätsreduktion auch zu einer Änderung der Thiopeptidbindegeometrie führen, wurden PICC-Experimente für **1** und **2** mit den beiden RNA-Mutanten A1067C und A1095C durchgeführt (Abbildung 6.11). Die gefundenen PICC-Muster für **1** und **2** bei Verwendung der beiden RNA-Mutanten, zeigten keine Unterschiede zur Wildtyp-RNA

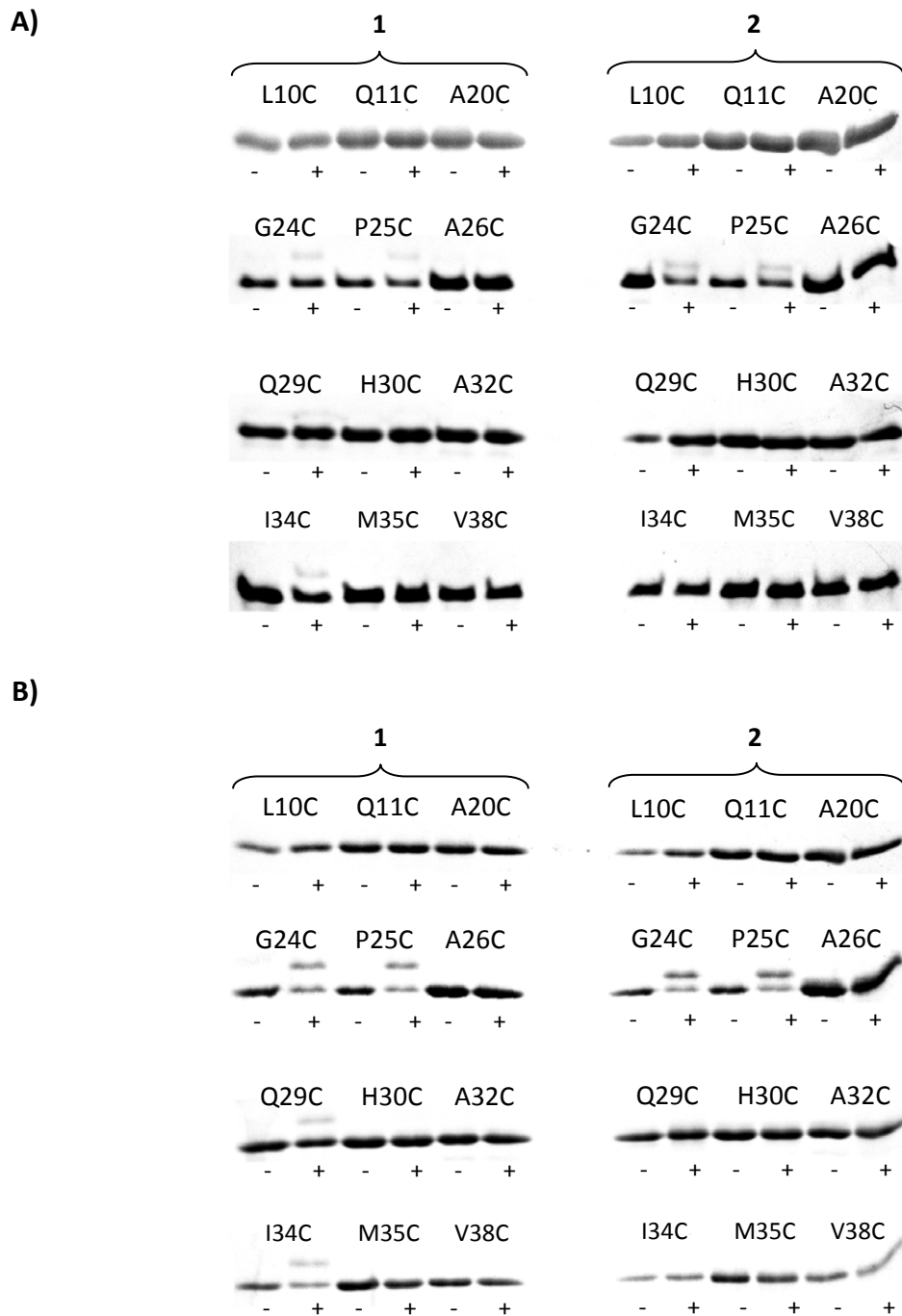


Abbildung 6.11: PICC-Analyse der 23S rRNA-Mutanten A1067C und A1095C. Hierzu wurden stöchiometrische Mengen der *Tth*L11-Cysteinmutanten und der Thiopeptide **1** bzw. **2** (10 μ M) in An- (+) oder Abwesenheit (-) der *E. coli* 23S rRNA (1051-1109) Mutanten A1067C (A) und A1095C (B) reagiert und die Bildung kovalenter Addukte mittels 15%iger SDS-PAGE (Coomassie gefärbt) analysiert.

und zeigten somit, dass die RNA-Mutationen keinen Einfluss auf die Thiopeptidbindegeometrie hatten. Auffällig waren nur die deutlich niedrigeren PICC-Addukt-Intensitäten im PAGE-Gel (trotz 10 μ M Komplekonzentration), welche mit der niedrigeren Thiopeptid-Affinitäten der Mutanten im Einklang stehen. Entsprechend der extrem niedrigen Thiopeptidaffinitäten zeigte Mutante A1067C die schwächste PICC-Reaktion.

Der nächste Schritt war die Anwendung der PICC-Methodologie auf weitere Thiopeptidnaturstoffe (Abbildung 6.12). Die beiden Thiopeptide Promoinducin (**4**) und Thiotipin (**8**) zeichnen sich im Vergleich zu **1** und **2** durch einen deutlich vergrößerten A-Ring aus (35 vs. 26 Atome) und zeigten eher mäßige Affinitäten an den 23S rRNA-L11-Komplex (100-200 nM, vgl. Abbildung 4.3).^[23] Bemerkenswert ist für beide Verbindungen jedoch der Besitz von acht Dehydroaminosäuren im Grundgerüst, wobei sich jeweils vier im A-Ring und vier im azyklischen Molekülschwanz befinden. Die PICC-Analyse dieser beiden Verbindungen zeigte ein zu Thiostrepton (**1**) vergleichbares PICC-Muster (Abbildung 6.13 A+B). Neben den charakteristischen Positionen G24C, P25C, Q29C und I34C zeigten hier auch die Positionen A20C und M35C erkennbare PICC-Reaktionen, obwohl die Reaktionsstärke bedingt durch die niedrigeren Zielstrukturaffinitäten von **4+8** deutlich schwächer waren. Unter Voraussetzung eines zu **1** und **2** vergleichbaren Bindungsmodus (vgl. auch Kapitel 5.2.4), ist dieser breitere Reaktivitätsradius durch den im Vergleich zu **1** um zwei Dehydroalanin-Einheiten reicheren und somit längeren azyklischen Molekülschwanz zu erklären.

Die beiden Thiopeptide Micrococcin (**3**) und Promothiocin B (**9**), zeigen eine mit **1** und **2** vergleichbare A-Ring-Struktur, besitzen jedoch keinen B-Ring (vgl. auch 5.2.4). PICC-Analysen dieser beiden Verbindungen zeigten interessanterweise an keiner getesteten Position eine PICC-Adduktbildung (Abbildung 6.13). Beide Verbindungen besitzen Dehydroaminosäuren im azyklischen Molekülschwanz und sollten demnach *per se* zu Thiol-Michael-Additionen (azyklischer Molekülschwanz) fähig sein. Beide Verbindungen binden an die 23S rRNA-L11-Komplexe (vgl. Kapitel 3-5). In Anbetracht der hohen Konzentrationen im PICC-Experiment, können auch niedrigere Zielstrukturaffinitäten (vgl. Abbildung 4.3) nicht der Grund für die fehlende PICC-Reaktivität sein. Ein plausibler Grund wäre ein von den anderen Thiopeptidnaturstoffen abweichender Bindungsmodus am 23S rRNA-L11-Komplex. In der Tat wurde für **3** ein von Thiostrepton (**1**) abweichender Bindungsmodus auf Basis biochemischer^[2b, 4a, 24] und auch kristallographischer Daten^[25] mehrfach nahegelegt.

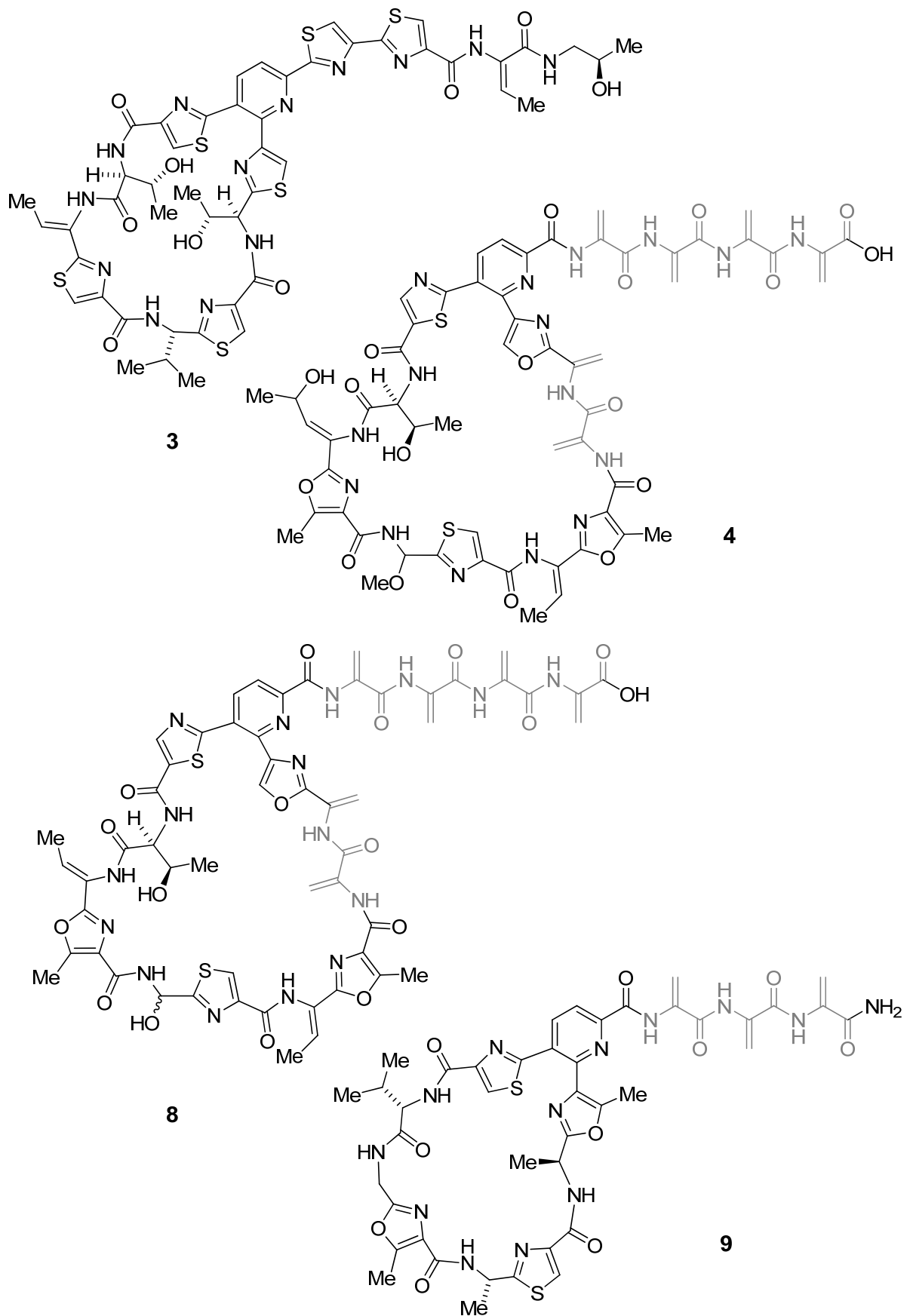


Abbildung 6.12: Chemische Strukturen der Thiopeptidnaturstoffe Micrococцин (3), Promoinducin(4), Thiotipin (8) und Promothiocin B (9). Dehydroalanin-Einheiten sind grau markiert.

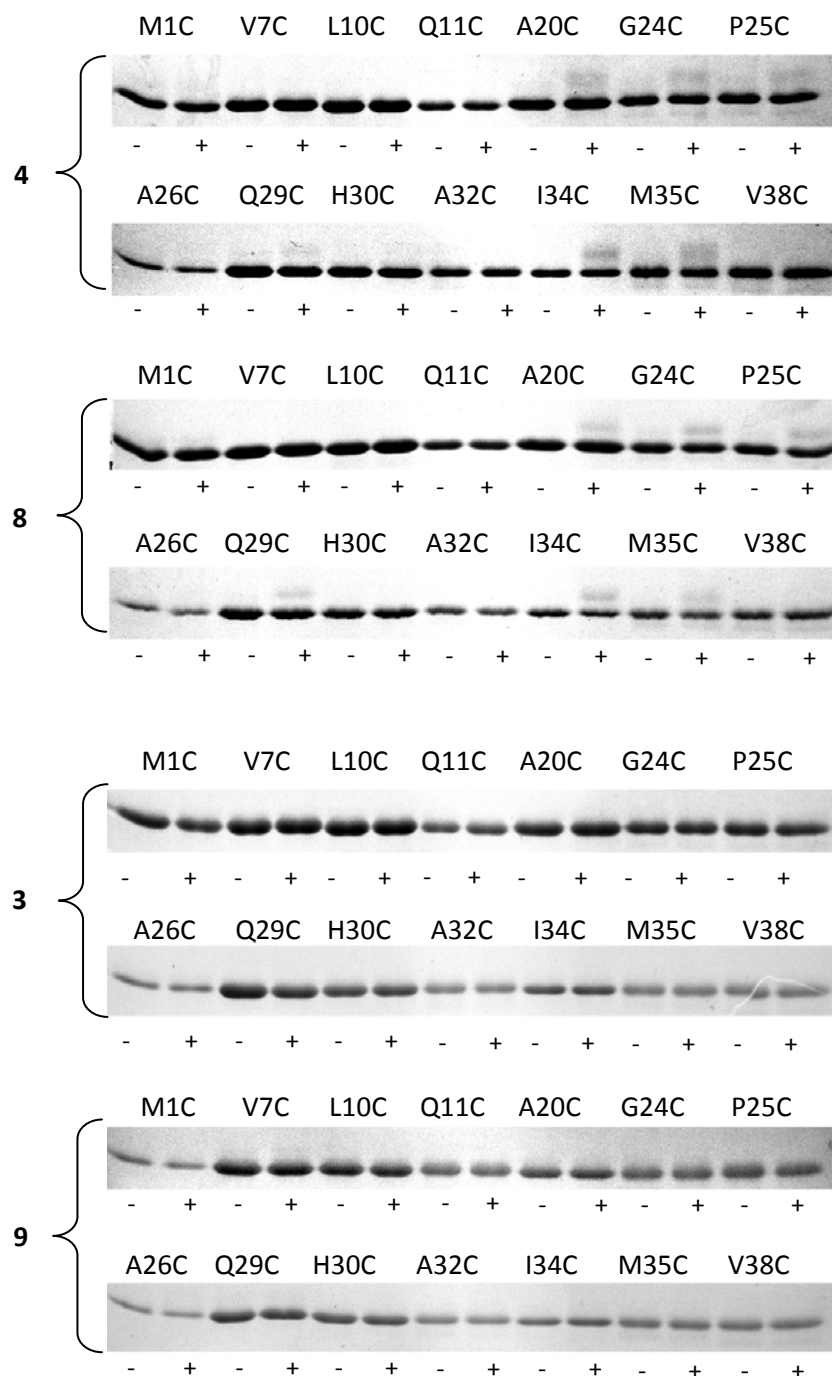


Abbildung 6.13: PICC-Analyse der Thiopeptidnaturstoffe Promoinducin (**4**), Thiotipin (**8**), Micrococcin (**3**) und Promothiocin B (**9**). Hierzu wurden stöchiometrische Mengen der *TthL11*-Cysteinmutanten und der Thiopeptide (10 μ M) in An- (+) oder Abwesenheit (-) der *E. coli* 23S rRNA (1051-1109) inkubiert und die Bildung kovalenter Addukte mittels 15%iger SDS-PAGE (Coomassie gefärbt) analysiert.

Auch die in Kapitel 5.2.4 beschriebenen Resistenzstudien zeigen einen von **1** und **2** abweichenden Bindungsmodus für **3** und **9**. In der Kristallstruktur von **3** im Komplex mit der ribosomalen 50S Untereinheit (vgl. Abbildung 5B aus Harms *et al.*,^[25] die Strukturdaten sind bis heute nicht in der PDB hinterlegt), befindet sich der azyklische Molekülschwanz nicht in der Nähe des L11-Proteins und könnte somit in einem PICC-Experiment nicht reagieren.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bindungsstudien mit dem Thiostrepton-Epimer (**28**) (Thiazolin-Einheit L-konfiguriert, vgl. Abbildung 4.8) zeigten eine, im Vergleich zum Naturstoff **1**, deutlich verschlechterte Bindungsaffinität an 23S rRNA-L11-Komplexe. NMR-Strukturstudien von **28** wiesen darüberhinaus eine deutlich veränderte Struktur des Molekül-A-Rings aus (Abbildung 4.9).^[26] Diese Strukturänderung hatte zur Folge, dass in *in silico* „Docking“-Studien ein, von **1** und somit auch von dessen Kristallstruktur im Komplex mit der ribosomalen 50S Untereinheit,^[25] abweichender Bindungsmodus für **28** im Rahmen des besten „Cluster Scores“ des „Dockings“ vorhergesagt wurde. Charakteristisch für diesen Bindungsmodus war, dass der Dehydroaminosäureschwanz von **28** tief in die Spalte zwischen dem L11-Protein und der 23S rRNA eindrang (Abbildung 4.9 C). Ein solcher von **1** abweichender Bindungsmodus sollte eindeutig über PICC-Experimente detektierbar sein, da die Dehydroaminosäuren (DHA1+2, Abbildung 6.3) sehr weit von den reaktiven Oberflächencysteinen (G24C, P25C, Q29C und I34C) entfernt wären.

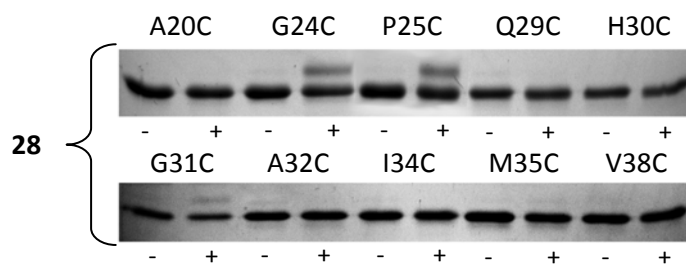


Abbildung 6.14: PICC-Analyse des Thiostrepton-Epimers **28** (Abbildung 4.6). Hierzu wurden stöchiometrische Mengen der *Tth*L11-Cysteinmutanten und des Thiopeptids (5 μ M) in An- (+) oder Abwesenheit (-) der *E. coli* 23S rRNA (1051-1109) inkubiert und die Bildung kovalenter Addukte mittels 15%iger SDS-PAGE (Coomassie gefärbt) analysiert.

	A20C	G24C	P25C	Q29C	G31C	I34C	M35C
1	+	++	++	++	n.b.	++	-
12	-	++	++	++	n.b.	-	-
13	-	-	-	-	n.b.	-	-
2	-	++	++	-	n.b.	-	-
3	-	-	-	-	n.b.	-	-
4	+	+	+	+	n.b.	+	-
8	+	+	+	+	n.b.	+	+
9	-	-	-	-	n.b.	-	+
28	-	++	++	-	+	-	+

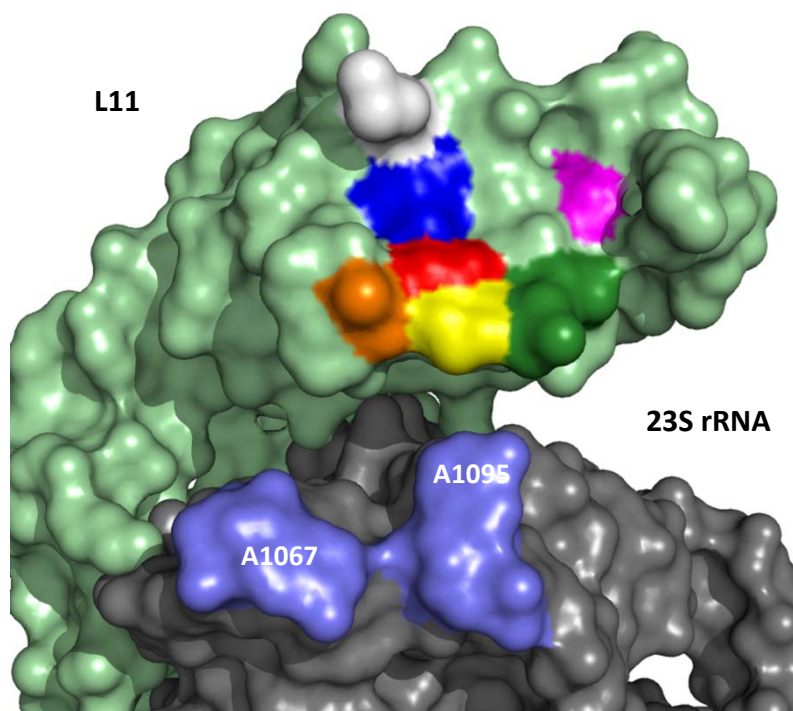


Abbildung 6.15: Zusammenfassung der PICC-Resultate für verschiedene Thiopeptidnaturstoffe und Derivate. Die genaue Position der reaktiven Positionen ist entsprechend des Farbcodes auf Basis der Kristallstruktur des Komplexes von **1** und der ribosomalen 50S-Untereinheit (PDB: 3cf5)^[25] dargestellt (Ligand nicht gezeigt). Starke PICC-Reaktivität (++), mäßige PICC-Reaktivität (+), keine Reaktivität (-), nicht bestimmt (n.b.).

PICC-Experimente mit **28** (Abbildung 6.14) zeigten jedoch eine starke Reaktivität der beiden Positionen G24C und P25C und legten nahe, dass der für **28** postulierte Bindungsmodus ein Artefakt der *in silico* Anpassung ist. Interessanterweise waren die zwei sonst für die PICC-Reaktion mit **1** typischen Positionen Q29C und I34C nicht reaktiv und deuten so

möglicherweise eine von **1** verschiedene Bindegeometrie an. Schwache bis sehr schwache Reaktivität war für die Positionen G31C und M35C sichtbar. Der Verlust der PICC-Reaktivität an Position Q29C erinnert hierbei an das PICC-Muster von Nosiheptid (**2**). **2** besitzt an Stelle des in **1** epimerisierenden Thiazolins (Abbildung 6.4), ein gesättigtes Thiazol. Für **1** bewirkt die Oxidation dieses Thiazolins bereits eine signifikante Konformationsänderung des Moleküls im Bereich des A-Rings (Abbildung 4.9), welche sich möglicherweise in einer Reorientierung des Molekülschwanzes im ternären Komplex manifestiert. Ist dies der Fall, wäre auch für Nosiheptid (**2**) ein von **1** abweichender Bindemodus denkbar, der aufgrund des kurzen Molekülschwanzes von **2** durch PICC-Experimente nicht detektierbar wäre. Eine Zusammenfassung sämtlicher PICC-Resultate für die verschiedenen getesteten Thiopeptid-naturstoffe und deren Derivaten ist in Abbildung 6.15 dargestellt.

6.2.2 PICC mit intakten Ribosomen

Der 23S rRNA-L11-Komplex befindet sich auf der Außenseite der ribosomalen 50S Untereinheit und bildet die Basis des so genannten L7-L12-Stiels, welcher von der 23S rRNA, und den Proteinen L7, L10, L11 und L12 gebildet wird. Dieser Komplex stellt am Eingang des Ribosoms den Hauptteil der Bindestelle für Translationsfaktoren, welche in jeder Stufe der Translation beteiligt sind (Initiation, Elongation, Termination). Die bisher beschriebenen PICC-Experimente wurden zunächst mit Hilfe isolierter 23S rRNA (1051-1109 nt)-L11-Komplexe durchgeführt. Um den Einfluss zusätzlicher ribosomaler Proteine auf die Thiopeptid-Bindegeometrie zu überprüfen, war es von Wichtigkeit, PICC-Studien mit vollständig intakten Ribosomen durchzuführen. Die Herstellung genomischer L11-Cystein-Mutanten in einer für die PICC-Experimente notwendigen Anzahl, erschien jedoch unverhältnismäßig aufwendig. Darüberhinaus ist eine Detektion von PICC-Addukten in komplexen Proteingemischen, wie isolierten Ribosomen oder bakteriellen Lysaten nur indirekt möglich, z.B. über Immuno-„Western“-blots mit spezifischen L11-Antikörpern. Bereits vor mehr als 40 Jahren konnten Nomura *et al.*^[27] zeigen, dass es möglich ist, translationsaktive Ribosomen durch eine Assemblierung ribosomaler Proteine und rRNAs unterschiedlicher bakterieller Spezies zu erzeugen. Zum Einbringen von L11-Mutanten in das bakterielle 70S Ribosom, wurde daher ein entsprechender Ansatz gewählt.

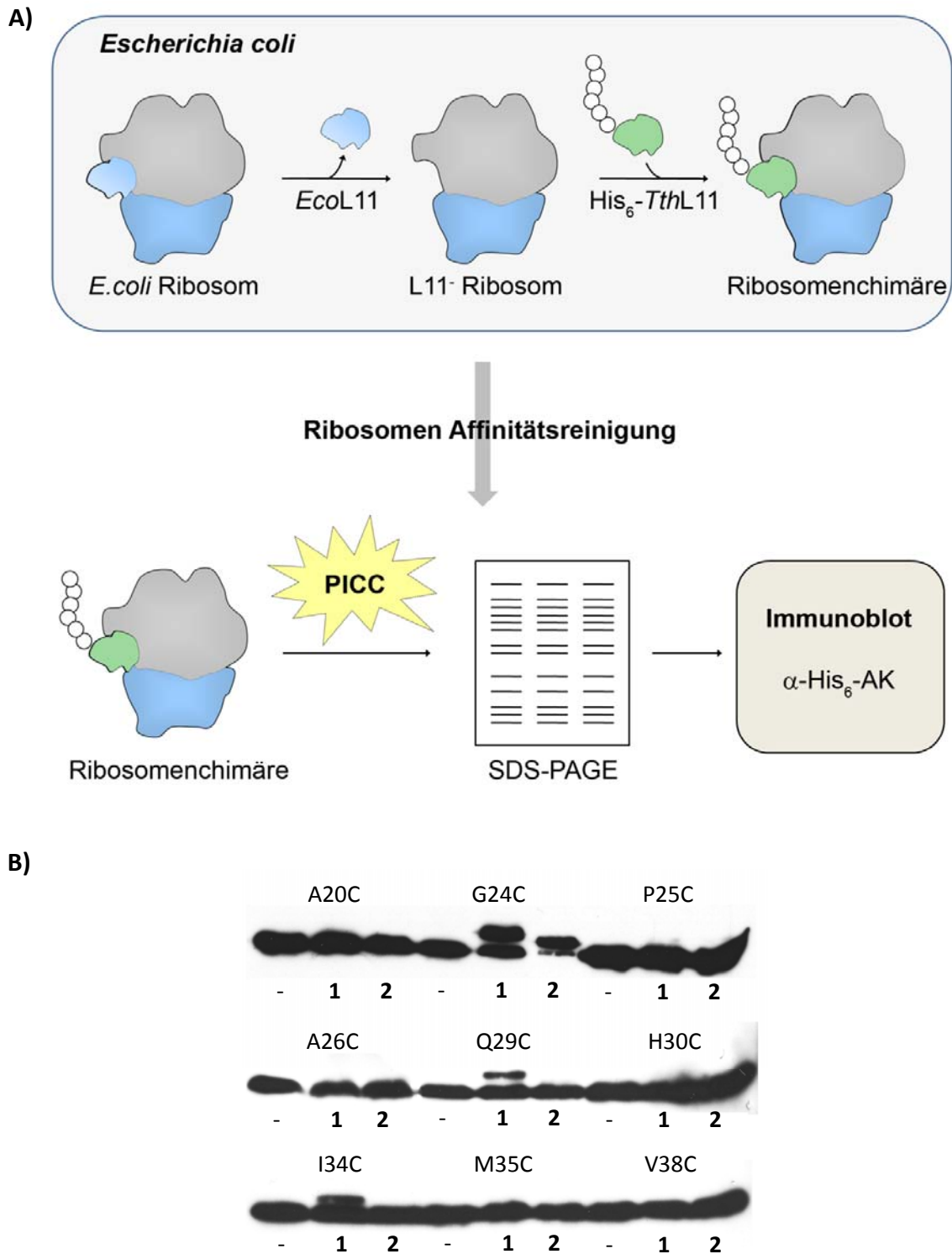


Abbildung 6.16: A) Schematische Darstellung der Ribosomen-PICC-Methodologie. B) Immunoblot (α -His₆-Antikörper) der PICC-Reaktionen verschiedener *TthL11*-Mutanten-*E. coli*-Ribosomenchimären (5 μ M) mit den Thiopeptidnaturstoffe Thiostrepton (1) und Nosiheptid (2) (5 μ M) nach der Auftrennung mittels 15%iger SDS-PAGE. Das jeweilige chimäre Ribosom ohne Thiopeptid (-) wurde als Kontrolle verwendet.

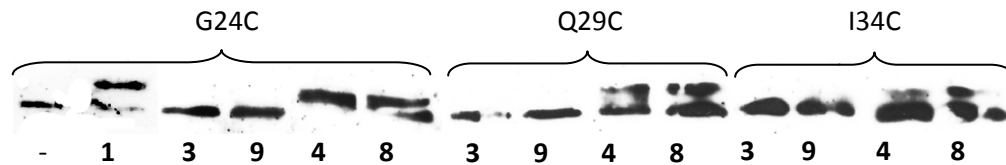


Abbildung 6.17: Immunoblot (α -His₆-Antikörper) der PICC-Reaktionen verschiedener *TthL11*-Mutanten-*E. coli*-Ribosomenchimären (5 μ M) mit den Thiopeptidnaturstoffe Micrococcin (**3**), Promoinducin (**4**), Thiotipin (**8**) und Promothiocin B (**9**) (5 μ M) nach der Auftrennung mittels 15%iger SDS-PAGE. Für die *TthL11* G24C Ribosomenchimäre sind zusätzlich die Kontrollreaktionen ohne Thiopeptid (-) sowie mit Thioestrepton (**1**) gezeigt.

Die bereits hergestellten His₆-*Thermus thermophilus* L11 Cysteinmutanten wurden hierzu zunächst in *E. coli* L11-„Knockout“-Zellen^[28] zur Expression gebracht (vgl. hierzu auch Kapitel 5.2.2; Abbildung 5.5). Die Nutzung des „Knockout“-Stamms, sowie der Überexpressionsplasmide sollte hierbei einen möglichst vollständigen Einbau der Mutantenproteine in die 70S Ribosomen ermöglichen. Darüberhinaus ermöglicht die His₆-Markierung der Fusionsproteine eine leichte Detektion von L11 sowie dessen PICC-Addukten in Immuno-„Western“-blots. Eine schematische Darstellung eines Ribosomen-PICC-Experiments ist in Abbildung 6.16 A dargestellt. Die im lebenden Organismus hergestellten *TthL11-E. coli*-Ribosomenchimären wurden zunächst unter Nutzung der milden Affinitätsreinigungsmethode^[29] (vgl. Kapitel 3.4.2) isoliert und im Anschluss mit einer äquimolaren Menge von Thioestrepton (**1**) bzw. (**2**) versetzt. Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung des Protein-RNA-Gemischs (SDS-PAGE) wurden die L11-Mutanten bzw. entsprechende PICC-Addukte in Immuno-„Western“-blots mittels His₆-Antikörpern nachgewiesen (Abbildung 6.16 B).

1 zeigte starke PICC-Reaktivität an Position G24C, sowie etwas schwächere Reaktivität an den Positionen Q29C und I34C. **2** zeigte eine starke Reaktivität an Position G24C. Das für **1** und **2** gefundene Ribosomen-PICC-Reaktivitätsmuster entsprach somit grundsätzlich dem des Standard-PICC-Experiments (Abbildung 6.7+6.15). Ein markanter Unterschied war jedoch die fehlende Reaktivität der Position P25C für **1** und **2** im Ribosomen-PICC-Experiment. Darüberhinaus zeigten die sonst im Fall von **1** mäßig reaktiven Positionen A20C und H30C keine Adduktbanden (Abbildung 6.16 B). Die Ribosomen-PICC-Experimente mit den Thiopeptidnaturstoffen Micrococcin (**3**), Promoinducin (**4**), Thiotipin (**8**) und Promothiocin B (**9**) an den Positionen G24C, Q29C und I34C zeigten Resultate, welche im Einklang mit den

PICC-Experimenten am isolierten Komplex waren (Abbildung 6.7+15). Auch hier zeigten die Verbindungen mit 35 Atomen im A-Ring (**4+8**) mit allen getesteten Cysteinmutanten Reaktivität, wobei die Reaktivität an Position G24C am stärksten war. Die Verbindungen mit kleinen A-Ring-Strukturen (**3+9**) zeigten keine Reaktivität (Abbildung 6.17 und 6.18).

	A20C	G24C	P25C	Q29C	I34C
1	-	++	-	+	+
2	-	++	-	-	-
3	n.t.	-	n.t.	-	-
4	n.t.	++	n.t.	++	+
8	n.t.	++	n.t.	++	+
9	n.t.	-	n.t.	-	-

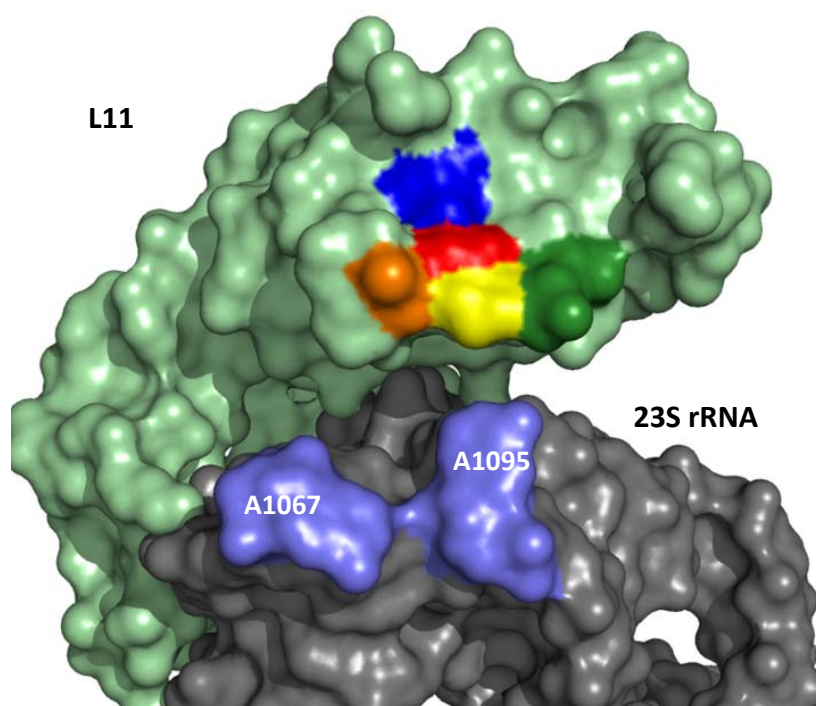


Abbildung 6.18: Zusammenfassung der Ribosomen-PICC-Resultate für verschiedene Thiopeptidnaturstoffe und Derivate. Die genaue Position der reaktiven Positionen ist entsprechend des Farbcodes auf Basis der Kristallstruktur des Komplexes von **1** und der ribosomalen 50S-Untereinheit (PDB: 3cf5)^[25] dargestellt (Ligand nicht gezeigt). Starke PICC-Reaktivität (++), mäßige PICC-Reaktivität (+), keine Reaktivität (-), nicht getestet (n.t.).

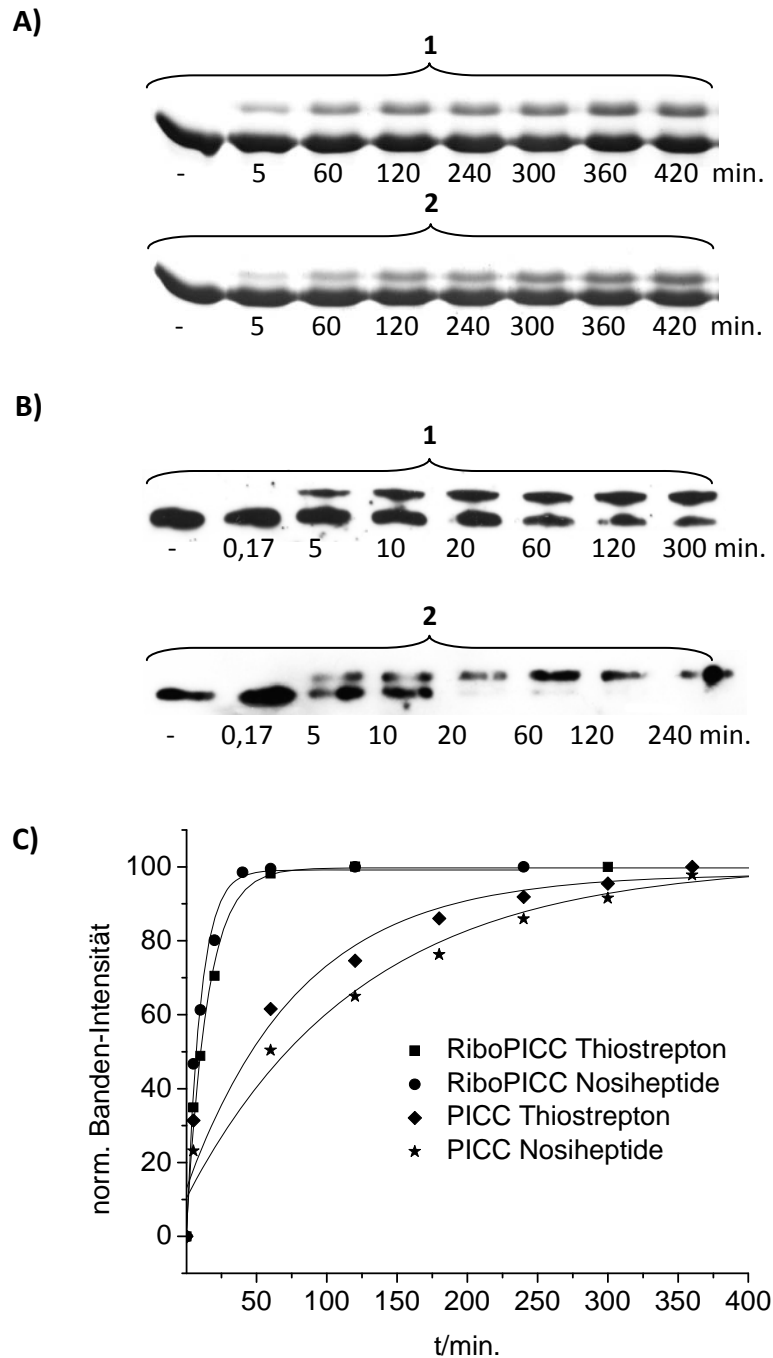


Abbildung 6.19: Analyse der PICC-Umsetzungsraten von Thiostrepton (**1**) und Nosiheptid (**2**) in 23S rRNA-*TthL11*-Komplexen (A) bzw. *TthL11-E. coli* Ribosomenchimären. Die Thiopeptide (5 μ M) wurden hierzu mit stöchiometrischen Mengen der *E. coli* 23S rRNA (1051-1109)-*TthL11*-Komplexe bzw. der Ribosomenchimären gemischt und Reaktionsproben zeitabhängig durch Denaturierung der Komplexe abgestoppt. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE (A) und Immunoblots mit α -His₆-Antikörpern (B). C) Graphische Auftragung der normierten PICC-Addukt-Bandenintensitäten der kinetischen Messungen von **1** und **2** in PICC- und Ribosomen-PICC-Experimenten als Funktion der Zeit (t). Zur Analyse wurden die Messdaten an eine Exponentialgleichung 1.Ordnung angepasst.

D)

Thiopeptid	Experiment	$t_{1/2}$ (min)
1	PICC	81 ± 20
	Ribosomen-PICC	15 ± 1
2	PICC	124 ± 27
	Ribosomen-PICC	10 ± 1

Tabelle 6.2: Ermittelte Reaktions-Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) für PICC und Ribosomen-PICC-Experimente.

Das Studium der PICC-Reaktionskinetik von G24C im Gesamtribosom bzw. 23S rRNA-L11-Komplexen zeigte, dass PICC-Reaktionen am Ribosom ca. 10-fach schneller stattfanden (Abbildung 6.19, Tabelle 6.2). **1** und **2** zeigten im jeweiligen Experiment vergleichbare Reaktionsgeschwindigkeiten. Die Ribosomen-PICC-Reaktion konnte für Nosiheptid (**2**) sogar zu einem Vollumsatz von *TthL11* G24C zum PICC-Addukt, gebracht werden. Die Ribosomen-PICC-Resultate zeigten somit zusammenfassend, eine Fokussierung der PICC-Reaktivität im Ribosom auf die Position G24C, gepaart mit deutlich höheren Umsatzraten. Zur Analyse der Selektivität der PICC-Methodologie sowie der Thiopeptidbindegeometrie in noch komplexeren Proteingemischen, wurden PICC-Reaktionen mit den *TthL11-E. coli*-Ribosomenchimären in Zelllysaten d.h. ohne eine Reinigung der Ribosomen durchgeführt. Diese Experimente sollten die Detektion eines möglichen Einflusses von ribosomalen Faktoren auf die Thiopeptidbindung ermöglichen. Die Experimente mit **1** und **2** und Lysaten von *TthL11* G24C, Q29C und I34C exprimierenden *E. coli* rplK (L11⁻) Zellen lieferte ein, mit dem Ribosomen-PICC vergleichbares, Reaktivitätsmuster und vergleichbare PICC-Addukt mengen (Abbildung 6.20). Dieses Resultat unterstreicht die Selektivität von PICC auch in komplexen Proteingemischen, wobei sich die hohe Zielstrukturaffinität der Thiopeptide hier sicher vorteilhaft wirkt.

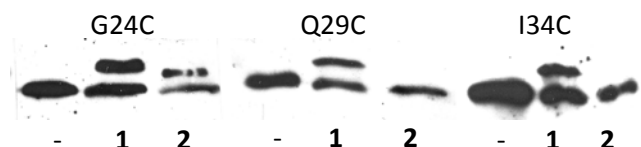


Abbildung 6.20: Immunoblot (α -His₆-Antikörper) der PICC-Reaktionen verschiedener *TthL11*-Mutanten-*E. coli*-Ribosomenchimären (5 μ M) mit den Thiopeptidnaturstoffe Thiostrepton (**1**) und Nosiheptid (**2**) in bakterielle Zelllysaten (*E. coli*) nach der Auftrennung mittels 15%iger SDS-PAGE. Das jeweilige chimäre Ribosom ohne Thiopeptid (-) wurde als Kontrolle verwendet.

6.3 Kristallographische Studien

Wie bereits in Kapitel 6.1 erwähnt, wurden kristallographische Studien der Interaktion von Thiopeptiden mit ihrer ribosomalen Zielstruktur durch die extrem schlechte Wasserlöslichkeit der Liganden erschwert. Die genaue Kenntnis der molekularen Details der Interaktion ist jedoch zum exakten Verständnis der hohen Affinitäten wie auch zur gezielten Entwicklung semi- bzw. vollsynthetischer Derivate, Analoga, *etc.* von fundamentaler Bedeutung. Die von Harms *et al.*^[25] im Laufe dieser Arbeit publizierten Kristallstrukturen der Komplexe von Thiostrepton (**1**) und Nosiheptid (**2**) mit der ribosomalen 50S Untereinheit stellen in diesem Zusammenhang einen großen Fortschritt dar. Sie wurden mittels der sogenannten „Soaking“-Methode an der ribosomalen 50S Untereinheit von *Deinococcus radiodurans* erhalten.^[30] In Anbetracht der Flexibilität des L11-Proteins, sowie einer möglichen „induced-fit“-Bindung^[31] des Liganden, beantwortet diese statische Struktur allerdings nicht alle offenen Fragen. Darüberhinaus lässt die maximale Auflösung der ribosomalen „Soaking“-Strukturen von 3-4 Å nur Aussagen über die Bindestelle, jedoch nicht über die exakte chemische Natur der Interaktion (Wechselwirkungen, exakte Geometrie, *etc.*) zu.^[25] Eine Optimierung der Wasserlöslichkeit von Thiopeptiden, könnte der Schlüssel zur Herstellung hochaufgelöster Kristallstrukturen von Zielstruktur-gebundenen Thiopeptiden sein. In Kapitel 3 dieser Arbeit wurde die Thiopeptid-Semisynthese als eine Methode vorgestellt, die es ermöglicht, die Wasserlöslichkeit von Thiostrepton (**1**) gezielt zu erhöhen.^[5b] Die im Rahmen dieses Kapitels (Kapitel 6) vorgestellte Methode des „Proximity-Induced Covalent Capture“ (PICC), könnte die schlechte Löslichkeit von Thiopeptidliganden durch die direkte kovalente Knüpfung der Moleküle an das ribosomale L11-Protein überwinden. Zudem wäre Einblick in die durch PICC eintretenden Strukturveränderungen sehr wichtig. Beide Methoden, Semisynthese und PICC, sollten eine geeignete Grundlage für die Herstellung hochkonzentrierter L11-23S rRNA-Thiopeptid-Komplexe und somit auch homogener Kristalle sein. Die dabei erhaltenen Ergebnisse werden im Folgenden beschrieben.

6.3.1 Optimierung der PICC-Reaktion für Kristallisationszwecke

Aufgrund seiner zentralen Position in der prolinreichen Helix des L11-N-Terminus (Abbildung 6.3 A), seiner Reaktivität mit den meisten Thiopeptiden (Abbildung 6.15), sowie der

stärksten Reaktion im Ribosomen-PICC (Abbildung 6.16), wurde die *TthL11*-Mutanten G24C für die Studien ausgewählt. Das kommerzielle Thiopeptid Thiostrepton (**1**) sollte zunächst zur Optimierung der Versuchsbedingungen dienen. Als Grundlage für die Kristallisation sollten die ternären Komplexe von *TthL11* G24C, des Thiopeptids und der *E. coli* 23S rRNA (1051-1109) sein. Ein vergleichbares RNA-Fragment wurde bereits von Wimberly *et al.* zur Kristallisation von L11-23S rRNA-Komplexen verwendet.^[1] Die Standard-PICC-Experimente mit Thiostrepton (**1**) zeigten, dass während der PICC-Reaktion, unter den verwendeten Bedingungen, maximal ca. 50% des PICC-Addukts gebildet wurden. Es wurde daher versucht,^[32] die PICC-Adduktausbeute zu erhöhen, oder, im Idealfall, zum die Reaktion zum Vollumsatz zu bringen. Folgende Parameter der Reaktion wurden hierbei variiert: a) Lösungsmittelkonzentration bis max. 10% (v/v) TFE erlaubten die Erhöhung der Konzentration von **1** in wässrigen Lösungen bis 200 μM . In einem Verhältnis von 5-10 μM Komplex zu 200 μM **1** konnte die PICC-Reaktion so auf ca. 70-80% Ausbeute gesteigert werden. Höhere Lösungsmittelkonzentrationen waren nicht möglich, da die RNA bei >10% (v/v) TFE denaturierte (CD-Spektroskopie)^[32] oder ausfiel. b) Die Verwendung von 50 mM Tricin-Puffer (pH 8.0) erlaubte 80%ige Ausbeuten bei einem Thiopeptid:Komplex-Verhältnis von 10:1.^[32] c) Die Erhöhung der Reaktionstemperatur (max. 50°C) hatte keinen Einfluss. d) Die Erhöhung des pH-Werts erhöhte unspezifische Hintergrundreaktionen (Daten nicht gezeigt). e) Eine Übertitration mit RNA führte zu einer Abnahme der Produktbildung, welche durch eine Restaffinität der Thiopeptide an proteinfreie RNA zu begründen ist. Der Versuch der chromatographischen Trennung (Gelfiltration) kovalenter PICC-Komplexe, von den verbleibenden 20% nicht kovalenter ternärer Komplexe war nicht möglich.^[32] Es war somit trotz der beschriebenen Optimierungsschritte nicht möglich, die für die Kristallisation notwendige Reinheit und Homogenität des ternären PICC-Komplexes herzustellen.

6.3.2 Thiostreptonsondenkomplexe

Die semisynthetische Addition hydrophiler Gruppen an das Grundgerüst von Thiostrepton (**1**) wurde bereits in Kapitel 4 als effiziente Methode zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit des Thiopeptids beschrieben.^[5b, 33] Insbesondere zeigte die Addition hydrophiler Gruppen an den azyklischen Molekülschwanz von **1** hierbei keinen wesentlichen Einfluss auf die Zielstrukturaffinität und sollte somit die natürlichen Wechselwirkungen zwischen Thiopeptid und Zielstruktur nicht verändern. Semisynthetische, wasserlösliche Derivate von **1** könnten somit

als wertvolle Werkzeuge für die Herstellung hochaufgelöster Kristallstrukturen der ternären Komplexe dienen. Für die Kristallisation dieser Komplexe ist darüberhinaus deren Reinheit und Homogenität essentiell. Die fluoreszente Thiostreptonsonde **5** bietet in diesem Zusammenhang neben ihrer erhöhten Wasserlöslichkeit zusätzlich den Vorteil einen guten Detektierbarkeit. Ternäre Sondenkomplexe mit **5** ermöglichen eine direkte Detektion der Komplexe in der Vielzahl der benötigten Reinigungsschritten über die Bestimmung der spezifischen Fluoreszenz von **5**, sowie auch eine Analyse der generellen Intaktheit der Komplexe über Fluoreszenzanisotropieexperimente. Die pikomolare Affinität von **5** an die den RNA-L11-Komplexe (Kapitel 4) sollte darüberhinaus eine hohe Stabilität der gereinigten ternären Komplexe ermöglichen.

Die zur Affinitätsreinigung angebrachte His₆-Markierung des *TthL11*-Wildtyp-Fusionsproteins kann aufgrund ihrer Flexibilität bei der Kristallisation störend wirken. Sie wurde deshalb proteolytisch entfernt (Faktor Xa) und das Protein durch eine Kombination von Affinitätsreinigung und Gelfiltration von der Protease, unverdaulichem Fusionsprotein sowie den freien His₆-Markierung-Faktor Xa-Erkennungssequenzkonstrukten befreit (vgl. 2.11.4.1). Die Reinheit des Proteins wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abbildung 6.21).

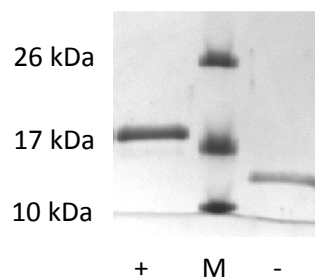


Abbildung 6.21: 15%ige SDS-PAGE des *TthL11* Wildtypproteins vor (+) und nach (-) der proteolytischen Entfernung der His₆-Markierung. M_{calc} (Fusionskonstrukt): 17704 Da; M_{calc} (Wildtypprotein): 15661 Da. M: Marker.

Das *TthL11*-Wildtypprotein wurde mit einem leichten Überschuss der Thiostreptonsonde (**5**) und *E. coli* 23S rRNA Fragment komplexiert (vgl. Kapitel 2.11.8) und die ternären Komplexe mittels Gelfiltration gereinigt. Bei den 23S rRNA Fragmenten handelte es sich neben dem über *in vitro* Transkription hergestellten *E. coli* 23S rRNA Wildtypfragment (Kapitel 2.10.1.1 und Abbildung 3.2) um die zwei totalsynthetische Konstrukte (Konstrukte 1+2, vgl. Kapitel 2.13.8). Die Gelfiltrationsläufe (Abbildung 6.22) zeigten typischerweise drei „Peaks“, von

denen der erste sowohl Protein, RNA sowie die 5 enthielt. Bei dem zweiten bzw. dritten „Peak“ handelte es sich um die überschüssige RNA bzw. die überschüssige Sonde 5 (Abbildung 6.22). Die Intaktheit der ternären Komplexe wurde zusätzlich durch Fluoreszenzanisotropie-Messungen der Gelfiltrationsfraktionen verifiziert (Abbildung 6.22).

Die Komplexfraktionen wurden im Anschluss auf eine Komplexkonzentration von ca. 1,2 mM (~18 mg/ml Proteinkonzentration) konzentriert. Zur Bestimmung der Kristallisationsbedingungen wurden in Kooperation mit M. Sc. Qiang Li und Dr. Wulf Blankenfeld (MPI Dortmund) Primärscreens des ternären Komplexes auf Basis kommerzieller Screening Kits (JCSG Core Suite I-III + Protein Complex Suite (*In vitro* Transkriptionsprodukt) sowie Nucleix Suite (synthetische RNAs)) im 96 Well-Plattenformat (0,2 µl, „sitting drop“)^[30] bei Raumtemperatur durchgeführt. Eine vielversprechende Kristallbildung wurde hierbei nur in zwei Bedingungen der JCSG Core Suite II beobachtet (Abbildung 6.22).

Nach vier Tagen wurden erste Kristallbildungen in 0,16 M Ammoniumsulfat, 0,08 M Natriumacetat (pH 4.6), 20% (w/v) PEG 4000 und 20% (v/v) Glycerol beobachtet (Abbildung 6.22 A). Es handelte sich hierbei um blattartig orientierte Bündel dünner Kristallnadeln (50×10×10 µm), einer für RNA-Proteinkristalle relativ vielversprechende Kristallform.^[34] Zur Herstellung größerer Kristalle und zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurden die Kristallisationsansätze im 24-Well-Plattenformat (1-2 µl, „hanging drop“) unter Variierung der PEG-Konzentration sowie des pH-Werts wiederholt. Die Kristallisation war unter diesen Bedingungen zwar reproduzierbar, jedoch die Kristallform sowie -größe (>2 Monate Wachstumszeit) nicht signifikant optimierbar. Gängige Strategien zur Vergrößerung der Kristalle wie „Microseeding“ oder „Macroseeding“ konnten aus Zeitgründen nicht durchgeführt werden.^[34] Nach ca. 21 Tagen war in 1M LiCl, 0,1 M Zitronensäure (pH 5.0), 20% (w/v) PEG 6000 die Formation von drei Kristallen zu beobachten. Es handelte sich hierbei um eine sehr homogene, augenscheinlich orthorhombische Kristallform, welche eine Kristallgröße bis max. 90×50×50 µm (Abbildung 6.22) ermöglichte. Eine Reproduktion dieser Kristalle war selbst im original „Screeningpuffer“ (Qiagen) nicht möglich. Die drei Kristalle wurden daher direkt aus den Primärscreens präpariert und in Kryolösung (Screeningpuffer + 20% (v/v) Glycerol) schockgefroren. Zur Datenaufnahme wurden Synchrotronmessungen (Dr. Christian Grütter, CGC Dortmund) am SLS (Villingen, Schweiz, Beamline X10SA) durchgeführt. Keiner der drei vermessenen Kristalle zeigte ein für eine Strukturlösung ausreichendes Beugungsmuster.

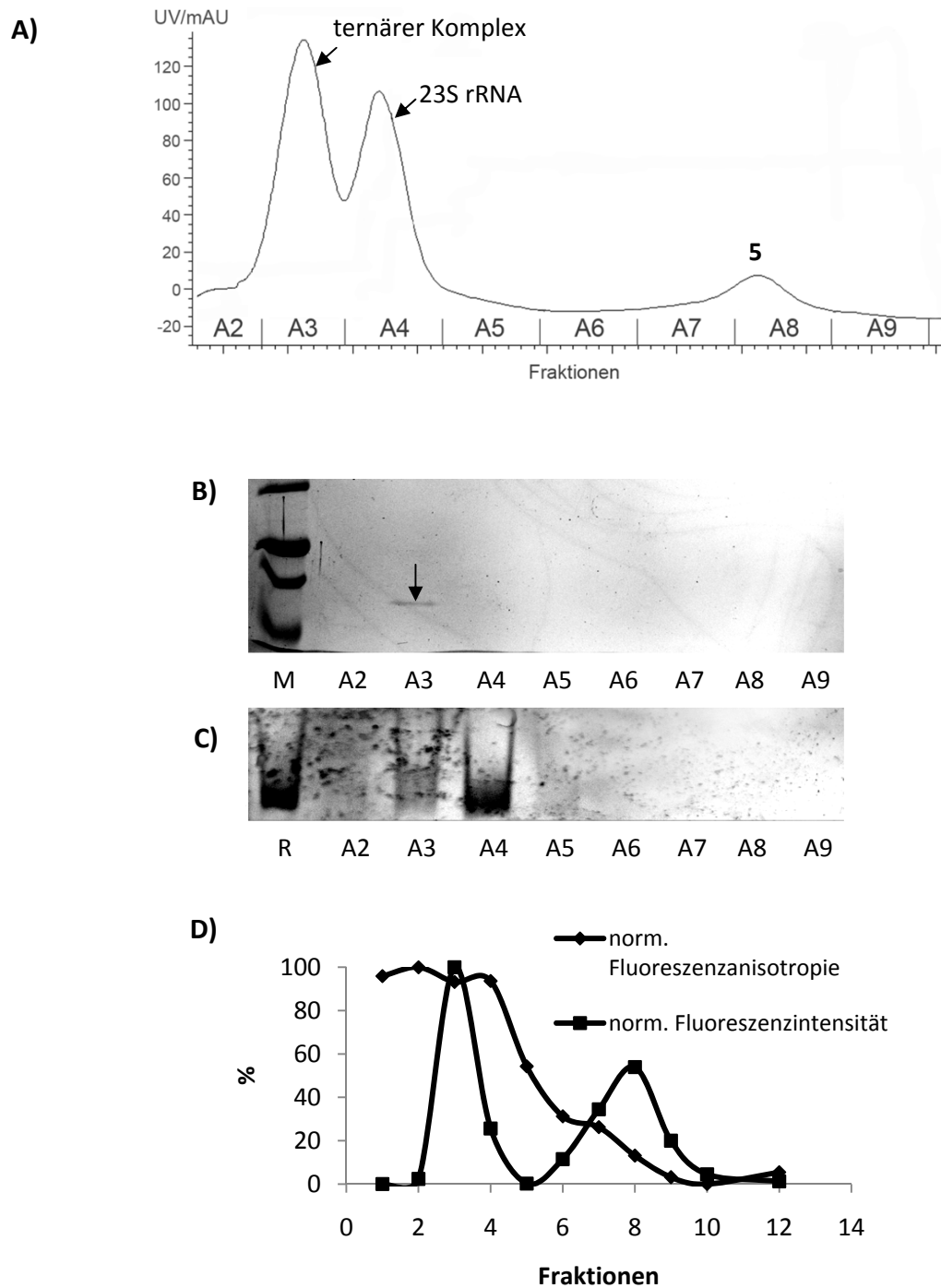


Abbildung 6.21: A) Exemplarisches Chromatogramm des Gelfiltrationslaufs (semipräparativ, Highload 16/60 Sephadex 200, GE Healthcare) eines Gemisches von *TthL11* Wildtyp, 23S rRNA (*In vitro* Transkription) und der Thiostreptonsonde (**5**) in 50 mM Tricin, 100 mM KCl und 10 mM MgCl₂, pH 8.0. Die Fraktionen A2-A9 wurden mittels SDS-PAGE (B, Coomassie-gefärbt; M: Marker) sowie nativer PAGE (C, Ethidiumbromid-gefärbt; R: 23S rRNA-Referenz) auf den Gehalt von Protein bzw. RNA überprüft. Die Sonde **5** wurde mittels der Fluoreszenzspektroskopie (D) detektiert. Intakte ternäre Komplexe wurden über die Analyse der Fluoreszenzanisotropie (D) in den Fraktionen detektiert. Zur Vergleichbarkeit wurden Fluoreszenzintensität und Fluoreszenzanisotropie normiert (%).

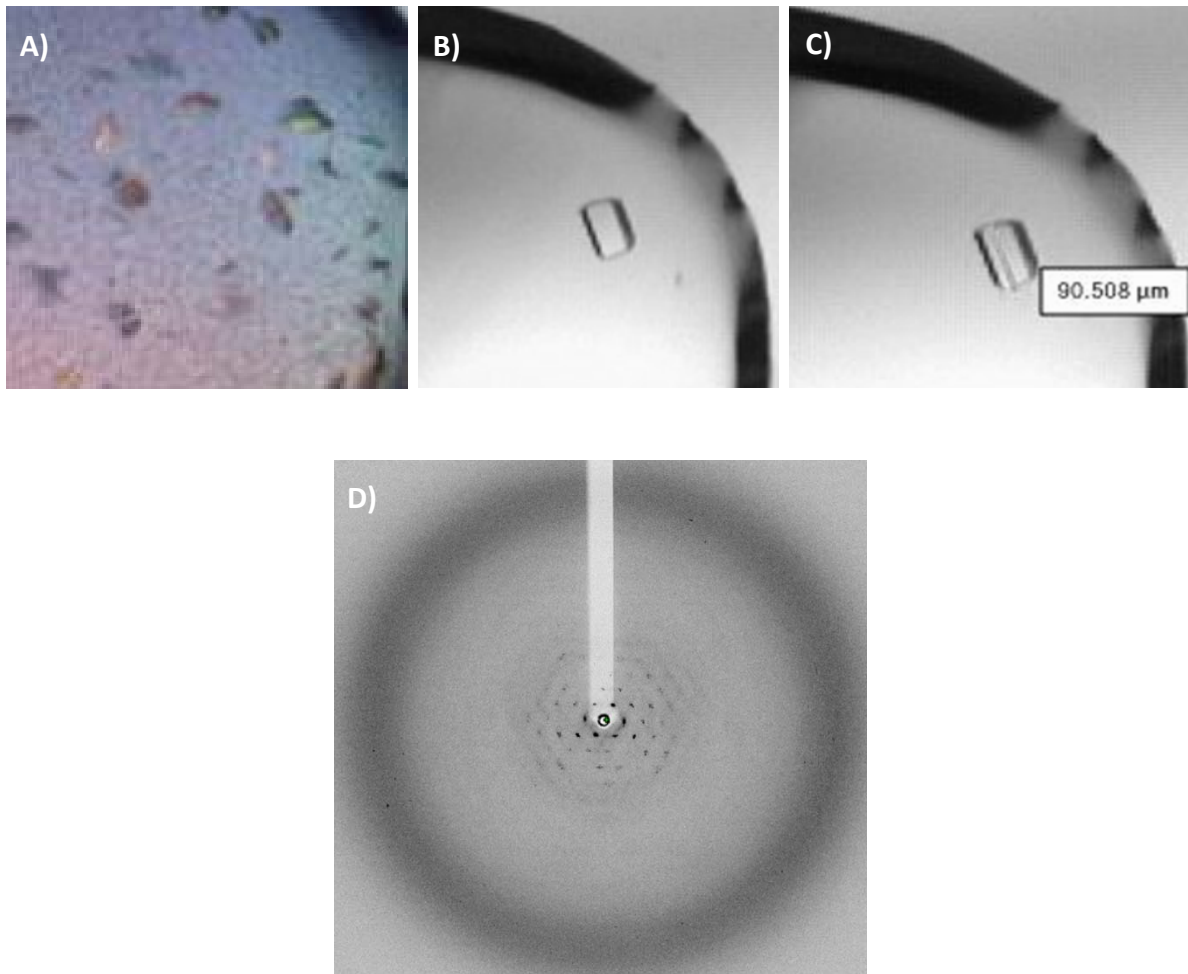


Abbildung 6.22: Kristall des ternären Komplexes von TthL11 Wildtyp, *E. coli* 23S rRNA (1051-1109) und der Thiostreptonsonde **5** im Primärscreen bei Raumtemperatur in (A) 0,16 M Ammoniumsulfat, 0,08 M Natriumacetat (pH 4.6), 20% (w/v) PEG 4000 und 20% (v/v) Glycerol und (B) 1M LiCl₂, 0,1 M Zitronensäure (pH 5.0), 20% (w/v) PEG 6000. B: 21 Tage; C: 42 Tage (90×50×50 µM Endgröße). D) Beugungsmuster des Kristalls aus C).

Die Kristallisation von Protein-RNA-Komplexen ist aufwendig und die Kristallqualität hängt i.A. sehr stark von der Flexibilität der RNA ab.^[34-35] Das *in vitro* transkribierte RNA-Fragment zeigte, bedingt durch die gewählte Klonierungsstrategie (vgl. 2.12.1.1), einen 3'-Überhang von drei Nukleotiden (Abbildung 3.2). Im Fall der publizierten L11-23S rRNA-Strukturen von Wimberly *et al.*^[1] und Conn *et al.*^[36] wurden jeweils überhangsfreie RNA-Konstrukte verwendet. Möglicherweise kann durch die Entfernung oder Verkürzung des Überhangs an der zur Kristallisation verwendeten RNA in Zukunft die Kristallqualität optimiert werden.^[37]

6.4 Diskussion

Auf der Basis einer Vielzahl biochemischer Untersuchungen konnte die Thiopeptidbindestelle am Ribosom auf einen Komplex des ribosomalen Proteins L11 und der 23S rRNA eingegrenzt werden.^[1-3] Für die Bindung spielen vor allem eine prolinreiche Helix im L11 N-Terminus, sowie die nahegelegenen Nucleobasen A1067 und A1095 eine wesentliche Rolle (siehe auch Kapitel 5). Diese Erkenntnisse führten zu dem Postulat, dass Thiopeptide wie Thiostrepton (**1**) und Micrococcin (**3**) in der Spalte zwischen dem Protein N-Terminus und der 23S rRNA binden und so die Interaktion und somit Aktivität ribosomaler GTPasen bzw. subsequente Schritte beeinflussen.^[1-3, 24, 38] Postulate der Thiopeptidbindegeometrie von Thiostrepton (**1**) basierten ausschließlich auf *in silico* „Docking“ Studien auf Basis der Kristallstruktur von **1**^[39] sowie Kristall-^[1] bzw. NMR-Strukturen^[4] des L11-23S rRNA-Komplexes. Die „Proximity-Induced Covalent Capture“-Methodologie^[10] erlaubte in diesem Zusammenhang zum ersten Mal eine biochemische Analyse der geometrischen Orientierung unterschiedlicher Thiopeptidliganden in L11-23S rRNA-Komplexen sowie vollständig intakten Ribosomen unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen. Der azyklische Molekülschwanz bizyklischer Thiopeptide wie Thiostrepton (**1**) und Nosiheptid (**2**), sowie monozyklischer Thiopeptide mit vergrößerten A-Ringen wie Promoinducin (**4**) und Thiotipin (**8**), erscheint hierbei dem L11-Protein zugewandt und ermöglicht so erst die charakteristischen PICC-Reaktionen. Die unterschiedlichen Reaktivitätsradien sind hierbei sehr gut mit der Länge des jeweiligen flexiblen Molekülschwanzes korrelierbar. Im Fall von **1** und **2** ist hier sogar eine Aminosäuregenaue Lokalisierung jedes Dehydroalanins möglich. Die vergleichbaren PICC-Resultate von **1**, **2**, **4** und **8** suggerieren die Annahme ähnlicher Bindungsmodi. Die PICC-Resultate für das Thiostreptonepimer **28** (Abbildung 6.15) legen nahe, dass die Konfigurierung des Thiazolins möglicherweise einen Einfluss auf die genaue Bindegeometrie des Thiopeptids und somit auch auf die Ausrichtung des Molekülschwanzes ausüben kann. Der charakteristische Wegfall der PICC-Reaktivität an Position Q29C, welcher sonst nur bei Nosiheptid (**2**) beobachtet wird, könnte in diesem Zusammenhang aufzeigen, dass diese Reorientierung nicht nur bei der Epimerisierung des Thiazolins, sondern auch bei der Oxidation dieser Gruppe zum Thiazol stattfindet. Dies würde bedeuten, dass **1** und **2** zwar sehr ähnliche, jedoch nicht identische Bindungsmodi besitzen. Interessanterweise werden von Harms *et al.* auf Basis der Kristallstrukturen ebenfalls leicht unterschiedliche Bindungsmodi von **1** und **2** beschrieben, auch wenn diese nicht im vollen Einklang mit den PICC-Studien sind (*vide*

supra).^[25] Die in Kapitel 5 beschriebenen Studien zur Affinität von Thiopeptidnaturstoffen an unterschiedliche Thiopeptid-Resistenzmutanten des L11-Proteins (vgl. Abbildung 5.10)^[23] bestärken jedoch die generelle Ähnlichkeit der Bindungsmodi von **1**, **2**, **4** und **8**. Diese Studien weisen darüberhinaus für die beiden Monozyklen Micrococцин (**3**) und Promothiocin B (**9**), einen deutlich von Thiostrepton (**1**) abweichenden Bindungsmodus aus, manifestiert durch ein abweichendes Resistenzprofil.^[23] Zusätzlich finden sich in der Literatur eine Vielzahl von Hinweisen unterschiedlicher Bindemodi und auch Wirkungsweisen von **1** und **3**.^[2, 3b, 3d, 4a, 24] In der Tat konnten auch PICC-Studien von **3** und **9** einen von **1** abweichenden Bindungsmodus zeigen. Die fehlende PICC-Reaktivität von **3** und **9** positioniert deren azyklischen Molekülschwanz weit entfernt von L11.

Relevanz der PICC-Resultate und Bindemodelle

Anfang 2008 gelang es Harms *et al.* die Röntgenkristallstruktur von Thiostrepton (**1**), Nosiheptid (**2**)(3-4 Å) und Micrococцин (**3**) im Komplex mit der ribosomalen 50S Untereinheit zu lösen.^[25] Aufgrund der schlechten Auflösung des Komplexes von **3** sind jedoch nur Kristallstrukturdaten für **1** und **2** in der PDB hinterlegt. Zur Kontrolle der Validität der PICC-Reaktivitätsmuster, wurden diese mit der Lage von **1** und **2** in der Kristallstruktur verglichen (Abbildung 6.23). Das PICC-Reaktivitätsmuster und die daraus resultierende Orientierung des azyklischen Molekülschwanzes von **1**, korrelierten hierbei grundsätzlich gut mit der Bindegeometrie des Liganden in der Kristallstruktur und positioniert so den Thiopeptidmakrozyklus in der Spalte zwischen L11 N-Terminus und 23S rRNA. Eine genaue Übereinstimmung der Lage einzelner Dehydroalanin-Einheiten von **1** und der reaktiven L11-Cysteine ist jedoch nicht gegeben. Ein Grund für das relativ breite, PICC-reaktive Areal für **1** ist die Flexibilität des Molekülschwanzes (Modell 1 C). Trotz dieser Flexibilität wären die Positionen P25C und Q29C in der Kristallstruktur von den Dehydroalanin-Einheiten nur schwer zu erreichen. Noch drastischer sind die Abweichungen von Kristallstruktur und PICC im Fall von **2**. Die Bindegeometrie in der Kristallstruktur ist nicht mit den PICC-Ergebnissen vereinbar (Abbildung 6.23 B). Der Dehydroaminosäureschwanz von **2** könnte in der Kristallstruktur die PICC-reaktiven Positionen G24C und P25C zwar erreichen, jedoch müsste in diesem Fall auch die Position Q29C reaktiv sein. Die Kristallstruktur positioniert den Molekülschwanz von **2** in direkter Nähe von Q29C (Abbildung 6.23 B). PICC positionierte den Molekülschwanz von **2** hingegen exakt bei G24C. Q29C war nicht reaktiv. Die im Vergleich zu

1 erhöhte Reaktivität von **2** an G24C zeigt darüber hinaus, dass sich die korrespondierende Dehydroalanin-Einheit von **2** sogar noch näher am eingeführten Cystein situiert befinden muss, als im Fall von **1**. Ein grundlegender Unterschied von PICC und den Kristallstrukturen ist, dass die PICC-Reaktionen mit isolierten RNA-L11-Komplexen durchgeführt und im Fall der Kristallstrukturen intakte ribosomale 50S Untereinheiten genutzt wurden.^[25] PICC-Reaktionen in intakten Ribosomen verstärkten jedoch sogar noch den Fokus der Reaktivität von **1** und **2** auf Position G24C (Abbildung 6.23 C+D, Modell 1 B). Da PICC-Reaktionen auf der Basis von Proteinmutanten durchgeführt werden, besteht die Möglichkeit, dass diese ein verzerrtes Bild der Thiopeptid-Bindegeometrie aufgrund mutationsinduzierter Strukturänderungen des N-Terminus von L11 liefern. Die in Abbildung 6.10 A dargestellten ¹⁵N-*HSQC*-Spektren zeigen jedoch sehr genau, dass bei der Einführung einer G24C Mutation im PICC-Reaktivitätsbereich (A20-V38, *T. thermophilus* Nummerierung) keine signifikanten Änderungen der Struktur ausgelöst wurden. Die im PICC-Experiment ermittelte Orientierung des Molekülschwanzes von **1** und **2** erscheint somit valide. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei den von Harms *et al.* publizierten Kristallstrukturen um „Soaking“-Komplexe der Thiopeptide an die 50S Untereinheit aus *Deinococcus radiodurans*.^[25] Die Auflösung von 4 Å erlaubt in diesem Zusammenhang nur begrenzt genaue Einpassung der ribosomalen RNA, der ribosomalen Proteine und des Thiopeptidliganden. Darüberhinaus können mögliche Schäden der Makromoleküle und daraus resultierende Inhomogenitäten bei 4 Å nicht aufgelöst werden. Als Grundlage für die Einpassung der Thiopeptidliganden in die Elektronendichte der Komplexe wurden jeweils deren Kristallkonformationen verwendet.^[25] Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kristallstruktur von Thiostrepton (**1**) gut mit dessen Lösungsstruktur übereinstimmt (Kapitel 4). Für Nosiheptid (**2**) ist es jedoch möglich, dass Lösungsstruktur und Kristallstruktur deutlich voneinander abweichen und so zu einem verfälschten Modell der Orientierung in der Komplex-Kristallstruktur führen können. Zum Ausschluss dieser Möglichkeit wäre die Bestimmung der Lösungsstruktur von **2** in Zukunft von Wichtigkeit. Weiter zeigt der L11 N-Terminus eine sehr hohe Flexibilität.^[1, 4c, 40] Konformationsänderungen von L11 sind in vorgeformten Kristallen der 50S Untereinheit jedoch nur noch bedingt möglich. Dieser Sachverhalt könnte zur Folge haben, dass der in der Komplex-Kristallstruktur vom jeweiligen Thiopeptid eingenommene Bindungsmodus zwar nahe an der realen Situation (im Bezug auf die Bindestelle), jedoch nicht mit dieser identisch ist (im Bezug auf die Bindegeometrie).

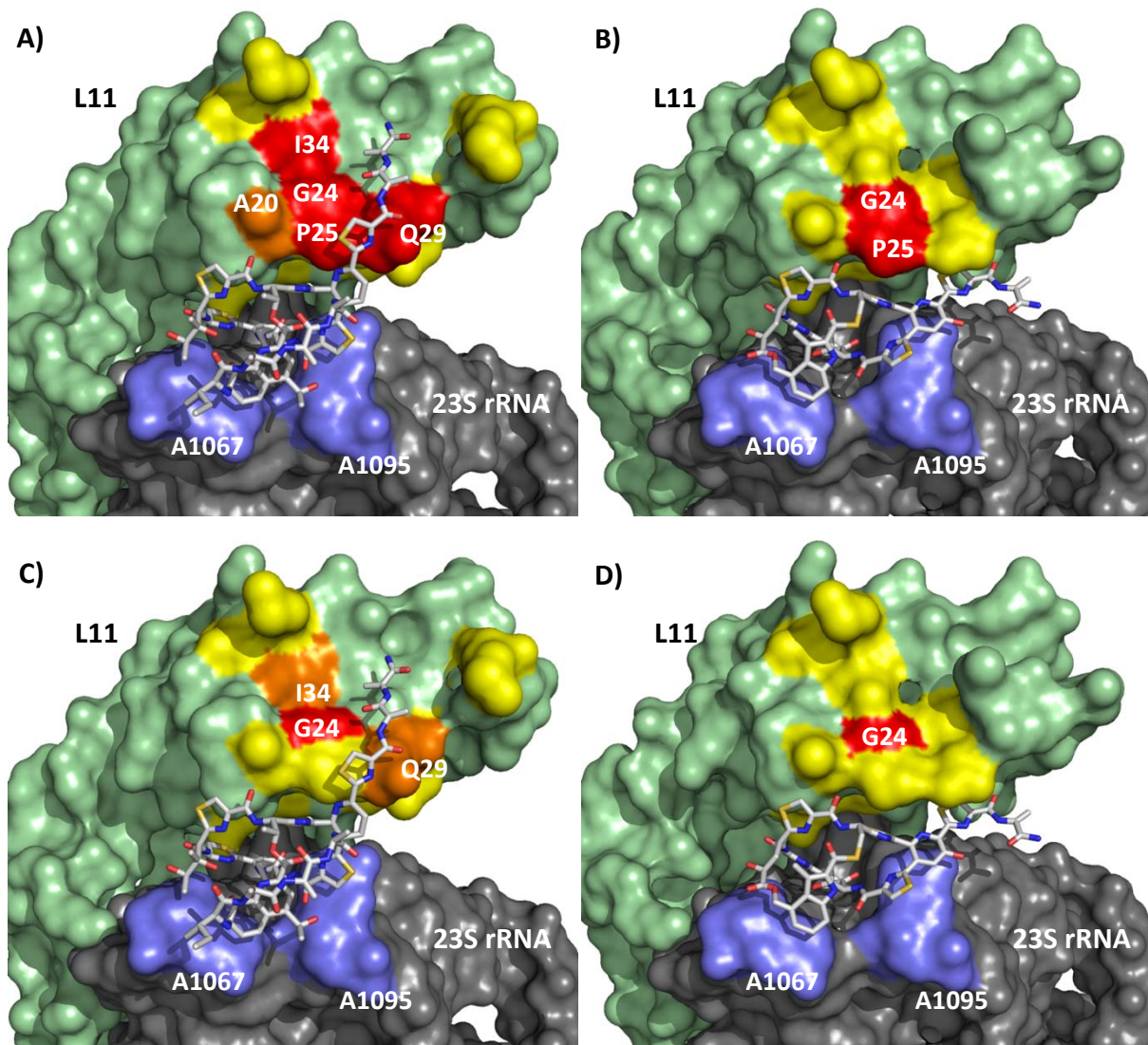


Abbildung 6.23: Visualisierung der PICC und Ribosomen-PICC-Reaktivitätsmuster von Thiostrepton (**1**) und Nosiheptid (**2**) auf Basis der Kristallstrukturen der Komplexe von **1** und **2** mit der ribosomalen 50S Untereinheit.^[25] A) PICC-Muster von **1** visualisiert auf PDB: 3cf5. B) PICC-Muster von **2** visualisiert auf PDB: 3zjp. C) Ribosomen-PICC-Muster von **1** visualisiert auf PDB: 3cf5. D) Ribosomen-PICC-Muster von **2** visualisiert auf PDB: 3zjp. Farbcode: starke Reaktivität (Rot); mäßige Reaktivität (Orange); keine Reaktivität (gelb).

NMR-Studien von Jonker *et al.* mit isolierten 23S rRNA-L11-Komplexen wiesen auf eine Annäherung des L11 N-Terminus sowie der 23S rRNA in Anwesenheit von **1** in Lösung hin.^[4c] Vergleichbare NMR-Studien von Lee *et al.* zeigten thiopeptidinduzierte Strukturänderungen in der Linker-Region zwischen dem L11 N- und C-Terminus, sowie der prolinreichen Helix im N-Terminus.^[4d] „RNA-Footprinting“-Studien mit intakten Ribosomen zeigten darüberhinaus thiopeptidinduzierte Annäherung der Spitzen von Helix 43+44 der 23S rRNA und des L11 N-

Terminus.^[38m] In der Kristallstruktur induziert die Bindung von **1** bzw. **2** nur minimale Konformationsänderungen am C-terminalen Ende der prolinreichen Helix, welche jedoch, wenn überhaupt, eher einer Entfernung von N-Terminus und RNA entsprechen.^[25]

In einer kürzlich publizierten Studie wurden die strukturellen Signaturen der Bindestellen von Antibiotika auf dem bakteriellen Ribosom verglichen.^[41] Charakteristisch für eine Vielzahl dieser Bindestellen ist der Besitz relativ ungewöhnlicher Konformationen der involvierten Nucleobasen. Interessanterweise wurde eine Präferenz von, im Bezug auf den glykosidischen Drehwinkel χ *syn*-konfigurierte und im Bezug auf den Zucker C2-endo, konfigurierten Nucleobasen gefunden.^[41] Das Auftreten dieser Konfigurationen wurde darüberhinaus mit einer stark erhöhten Flexibilität der rRNA in Ligandenbindedomänen assoziiert.^[42] Eine weitere Gemeinsamkeit solcher Ligandenbindedomänen ist eine, mit der Ligandenbindung assoziierte, induzierte Anpassung („induced-fit“) der Bindedomäne.^[43] Die Thiopeptidbindestelle erscheint im Gegensatz hierzu vergleichsweise unflexibel. Die involvierten Nucleotide sind *anti* sowie C3-endo konfiguriert.^[1, 25, 40, 44] Ein „induced-fit“-Bindung von Thiopeptiden auf der RNA-Seite ist somit nur bedingt wahrscheinlich, solange eine adäquate Ionenumgebung (Mg^{2+}), sowie Proteinassoziiierung gegeben ist (Modell 1 B+C).^[45] Für das L11-Protein scheint dies jedoch nicht der Fall zu sein (Modell 1 A+B).^[4c, 4d, 38m] Ein bemerkenswerter Unterschied der Standard-PICC- und Ribosomen-PICC-Studien ist der vollständige Rückgang der Reaktivität der sonst sehr PICC-reaktiven *Tth*L11 Mutante P25C, sowie eine generelle Fokussierung der PICC-Reaktivität auf die Position G24C, möglicherweise bedingt durch einen Flexibilitätsverlust des Dehydroaminosäureschwanzes der Thiopeptide (Abbildung 6.23 C+D).^[25] Darüberhinaus ist die Reaktionsgeschwindigkeit im Ribosomen-PICC ca. 10-fach höher als im Standard-PICC-Experiment. Diese Resultate weisen in Richtung einer Rigidifizierung des L11-23S rRNA-Komplexes im Gesamtribosom, welche möglicherweise zu einer Art präformierter Bindestelle für Thiopeptide führt (Modell 1 C). Dieser Sachverhalt entspräche eher der Situation in den Thiopeptid-50S Untereinheit-Kristallstrukturen.^[25] Die fokussierte Reaktivität von G24C im Ribosomen-PICC würde beispielsweise eine Annäherung von L11 N-Terminus und 23S rRNA entsprechend der NMR-Studien des ternären Komplexes,^[4c] nicht erlauben, da diese eine Positionierung des Thiopeptid-Makrozyklus zwischen RNA und L11 N-Terminus ausschließt (vgl. Abbildung 6.24).

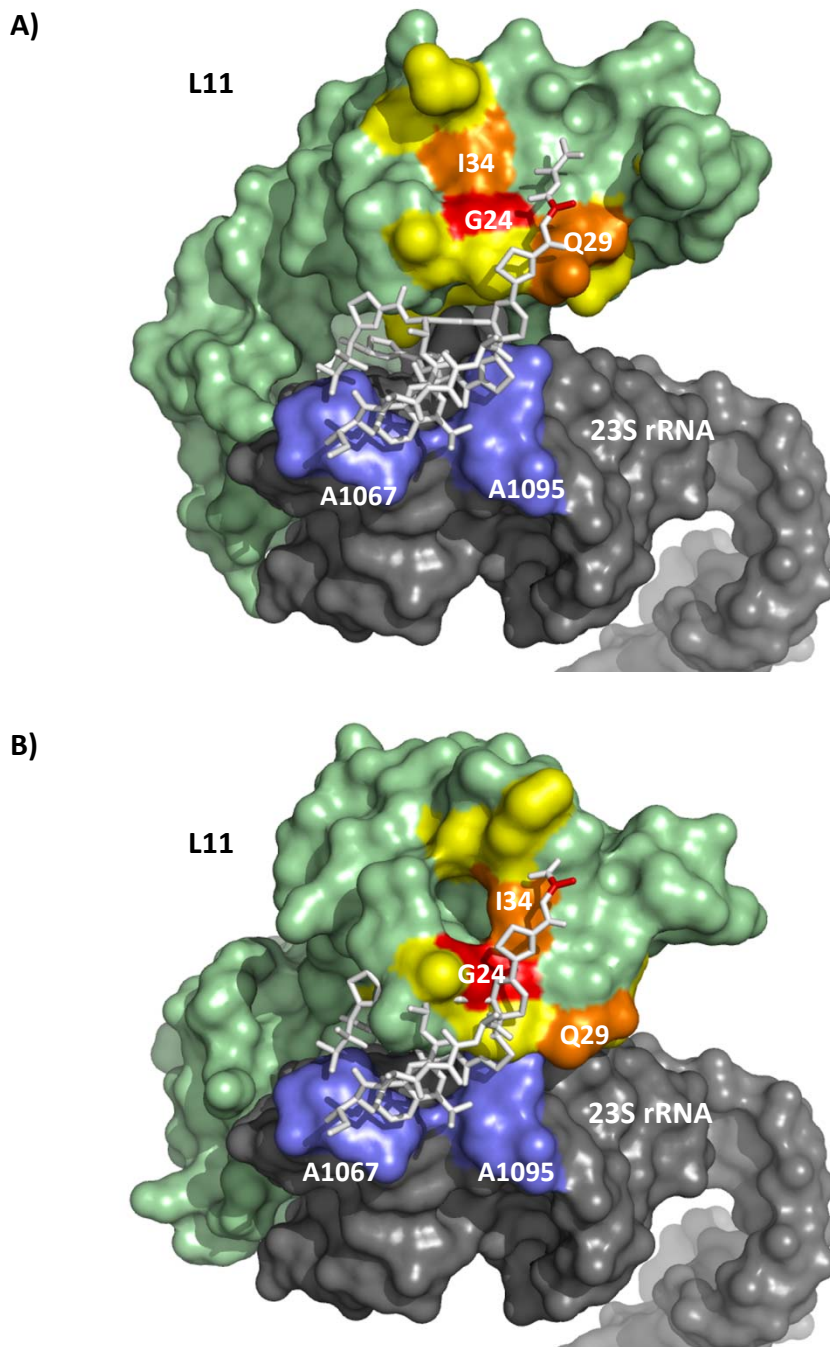
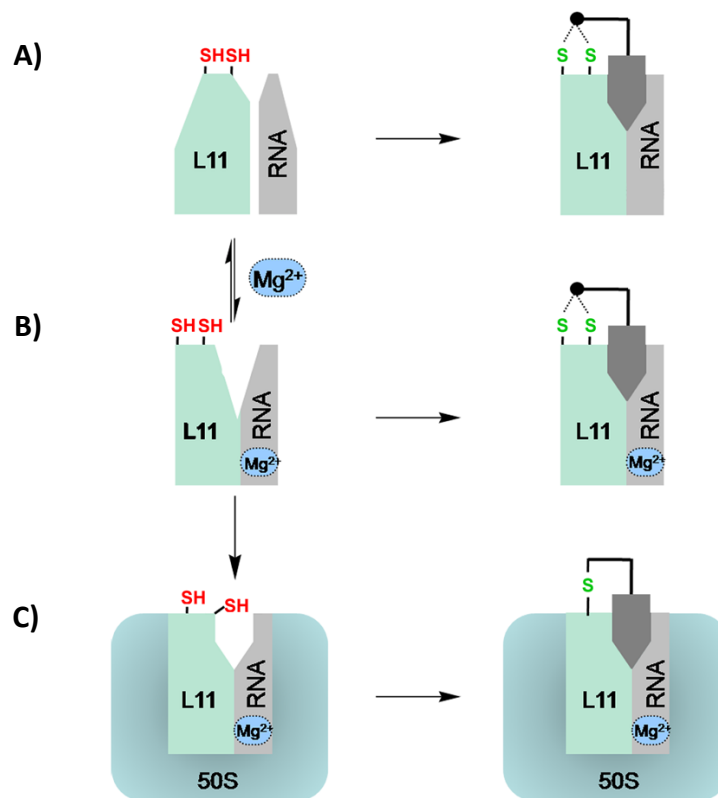


Abbildung 6.24: Visualisierung des Ribosomen-PICC-Reaktivitätsmusters von Thiostrepton (**1**) auf Basis (A) der Kristallstruktur des Komplexes der 23S rRNA, L11 und **1** aus Harms *et al.*^[25] (PDB: 3cf5) sowie auf Basis (B) eines Hybrids der Kristallstruktur der 23S rRNA und **1** aus Harms *et al.* und der NMR-Struktur des L11-Proteins aus Jonker *et al.*^[4c] (PDB: 2jq7, Modell 1). Hierzu wurde der C-Terminus von L11 aus 3cf5 an die Koordinaten des C-Terminus L11 in 2jq7 angepasst (PyMol, DeLano Scientific). Farbcode: starke Reaktivität (Rot); mäßige Reaktivität (Orange); keine Reaktivität (gelb). Die PICC-reaktive Dehydroalanin-Einheit von **1** ist rot markiert.



Modell 1: Determinanten der Thiopeptid-Zielstruktur-Interaktion am Beispiel von Thiostrepton (**1**). A) L11-23S rRNA-Komplexe in Abwesenheit von Mg²⁺: nicht präformiert, breites PICC-Areal, „induced-fit“-Bindung, niedrige Thiopeptidaffinität, evt. veränderte Geometrie B) L11-23S rRNA-Komplexe in Anwesenheit von Mg²⁺: ausreichend präformiert, breites PICC-Areal, semi-„induced-fit“-Bindung, hohe Thiopeptidaffinität, C) intakte Ribosomen: optimal präformiert, fokussiertes PICC-Areal, keine „induced-fit“-Bindung, hohe Thiopeptidaffinität.

Ein Nachteil dieser L11-NMR-Studien^[4c] ist die Tatsache, dass die Experimente ausschließlich mit isolierten 23S rRNA-L11-Thiopeptidkomplexen und darüberhinaus in Abwesenheit des für strukturelle RNAs und ribosomale RNA-Proteinkomplexe^[45c, 46] wichtigen Mg²⁺ durchgeführt wurden. Bindungsstudien der fluoreszenten Thiostreptonsonde (**6**) an 23S rRNA-L11-Komplexe unter Verwendung der in der NMR-Studie beschriebenen Pufferbedingungen,^[4c] führten zu einer ca. 100-fach reduzierten Zielstrukturaffinität (vgl. Abbildung 3.16).^[23] Thiostrepton (**1**) ist dabei in der Lage die Faltung der 23S rRNA in einem gewissen Maße zu stabilisieren.^[45a] Bei der Bildung ternärer RNA-L11-Thiopeptidkomplexe in Abwesenheit von Mg²⁺ könnte die Thiopeptidbindung so artifizielle Konformationsänderungen von L11 und RNA, vergleichbar mit einer „induced-fit“ Situation, verursachen

(Modell 1 A). Der Thiopeptidligand würde den Komplex so jedoch nur in seine „natürliche“ Konformation bringen. Der L11-RNA-Komplex ist jedoch nur in Anwesenheit von Mg^{2+} für eine hochaffine Bindung ausreichend präformiert (Modell 1 B). Studien von Draper et al. wiesen in diesem Zusammenhang darauf hin, dass die RNA möglicherweise spezifische Bindestellen für Mg^{2+} aufweist.^[47] Weitere ribosomale Proteine würden zu einer optimalen Präformierung der Bindestelle durch eine zusätzliche Stabilisierung der 23S rRNA-Tertiärstruktur beitragen (Modell 1 C).

„Proximity-induced covalent capture“ (PICC) stellt eine hochempfindliche Methode zur Analyse der Bindegeometrie von Thiopeptidliganden am 23S rRNA-L11-Komplex dar. Eine wertvolle Eigenschaft der Methode ist, dass diese unter physiologischen Bedingungen in Lösung (mikromolare Konzentration; auch in bakteriellen Lysaten) auch mit vollständigen Ribosomen, ohne die Anwendung technischer Tricks funktioniert und konsistente Ergebnisse liefert. Die durch PICC ermittelte Lage der Dehydroaminosäuren des azyklischen Molekülschwanzes von Thiostrepton (**1**) sowie die daraus resultierende Bindegeometrie, ist komplementär zur Lage und Bindegeometrie in der Kristallstruktur des Komplexes von **1** mit der ribosomalen 50S Untereinheit.^[25] Für Nosiheptid (**2**) lieferte PICC jedoch ein von der Kristallstruktur signifikant abweichendes Bild. Die hier aufgezeigte Lage des Molekülschwanzes von **2** ist auf Basis der PICC-Ergebnisse nicht möglich. In Anbetracht der mäßigen Auflösung der Kristallstruktur, könnte die postulierte Orientierung von **2** fehlerhaft sein. Ein Gegenargument wäre, dass PICC auf der Einführung von Mutationen in den N-Terminus von L11 basiert und die damit verbundene Flexibilitätserhöhung der Domäne möglicherweise zu einem verfälschten Bild der Molekülorientierung führen können. Entgegen dieser Möglichkeit zeigten die ¹⁵N-HSQC-NMR-Studien keine strukturellen Veränderungen der Mutanten im Vergleich zum Wildtypprotein. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls über MD-Simulationen ternärer (L11-Mutanten-)Komplexe (Dr. Karl Kirschner, persönliche Mitteilung) abgesichert werden. Die PICC-Resultate lieferten darüberhinaus ein in sich sehr konsistentes Bild der Thiopeptidbindegeometrie und ermöglichte das Detektieren subtiler Veränderungen der Bindegeometrie, wie z.B. im Fall des Thiostreptonepipimers **28** und den unterschiedlichen Thiopeptidnaturstoffen, ein Sachverhalt der die Korrektheit der mittels PICC gesammelten Informationen über die Thiopeptidbindegeometrie nochmals hervorhebt.

Die Rolle von L11

Verwunderlich ist die Tatsache, dass das L11-Protein zwar essentiell für eine hochaffine Bindung von Thiopeptiden, jedoch für bityklische Vertreter wie **1** und **2** in sehr indifferenter Weise an der Bindung beteiligt ist.^[3a, 3c, 23, 45a, 48] Punktmutationen der prolinreichen Helix des L11 N-Terminus verleihen dem prokaryotischen Organismus Thiopeptidresistenz, was eine effektive Interaktion des Ribosoms mit ribosomalen Faktoren voraussetzt.^[3e] Die Zielstrukturaffinität bleibt für die meisten Thiopeptide unverändert hoch.^[3b, 3d, 23] Der Verlust der N-terminalen Domäne von L11 führt hingegen zu drastischen Affinitätsverlusten.^[3c] Wie bereits in Kapitel 5 erwähnt, könnte die Rolle des L11 N-Terminus in der Bereitstellung eines hydrophoben Gegenstücks zur RNA bestehen. Punktmutationen in der prolinreichen Helix von L11 würden an dieser Situation d.h. vor allem an der Grundkonformation von L11, nichts ändern. Solche Mutationen können jedoch eine Erhöhung der Flexibilität der prolinreichen Helix bewirken. Die Wirkungsweise von Thiopeptiden am bakteriellen Ribosom beruht auf einer Blockade einer fruchtbaren Interaktion der ribosomalen GTPase-assoziierten Region mit unterschiedlichen ribosomalen GTPasen wie Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren.^[2a, 38j-n, 49] Für eine erfolgreiche GTP-Hydrolyse scheint in diesem Zusammenhang vor allem die Wechselwirkung der Faktoren mit der 23S rRNA von Wichtigkeit zu sein,^[38j, 50] da L11-defiziente Organismen, trotz starker Einschränkungen, generell lebensfähig sind (Kapitel 5).^[51] Die Interaktion mit dem L11 N-Terminus scheint der Regulierung und Verstärkung der Aktivität zu dienen, wobei L11 wie eine Art molekularer Schalter fungiert.^[1, 25, 40, 45a, 49b, 52] Die hochaufgelöste Kristallstruktur des 70S Ribosoms im Komplex mit der GDP-gebundenen Form von EF-G (Post-Translokation) weist auf eine hauptsächliche Interaktion von EF-G mit der 23S rRNA, eine mögliche Wechselwirkung des C-terminalen Endes der prolinreichen Helix von L11 (P25, *T. thermophilus*, Abbildung 6.25) mit einer flexiblen Schleife der Domäne V von EF-G, sowie eine mögliche Wechselwirkung des N-terminalen β -Faltblatts mit der G'-Domäne von EF-G hin.^[40a] Interessanterweise zeigen diese Kontaktpunkt von L11 und EF-G in der Kristallstruktur des Komplexes von Thiostrepton (**1**) mit der ribosomalen 50S Untereinheit, sowie der ligandenfreien 50S Untereinheit,^[25] charakteristische Unterschiede zur EF-G gebundenen Komplex, wobei sich die Gesamtkonformation der Komplexe sonst nur minimal unterscheidet (Abbildung 6.25). Die Prolin-reiche Helix scheint sich in Anwesenheit von EF-G partiell N-terminal zu entwinden und dafür C-terminal aufzuwinden und verschiebt so den rigiden Kernteil der Helix (Sequenz:

¹⁹PAPPVGP²⁵, *T. thermophilus*) relativ zum Rest des L11 N-Terminus. Neben dem möglichen direkten Kontakt der prolinreichen Helix von L11 und Domäne V von EF-G scheint die Konformationsänderung des L11-N-Terminus ebenfalls eine Wechselwirkung des N-terminalen β -Faltblatts (Schleife zwischen Strang 2 und 3) mit der G'-Domäne von EF-G und dem ribosomalen Protein L7 zu ermöglichen.^[25] L7 befindet sich in unmittelbarer Nähe zur G'-Domäne von EF-G und spielt eine wichtige Rolle für die Freisetzung anorganischen Phosphats nach der GTP-Hydrolyse ribosomaler Faktoren, jedoch nicht für die GTP-Hydrolyse selbst.^[53] Die Interaktion des L11 N-Terminus mit L7 könnte demnach von Wichtigkeit für die posthydrolytische Phosphatfreisetzung sein.

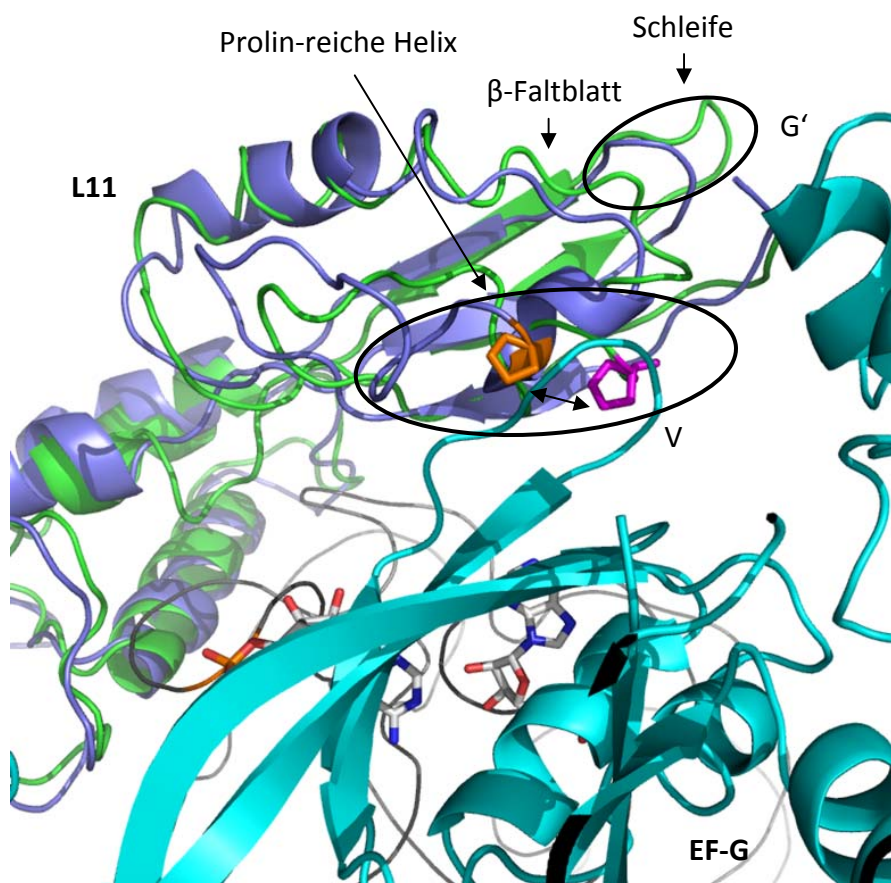


Abbildung 6.25: Überlagerung der L11-Proteine aus den Kristallstrukturen der 50S Untereinheit des bakteriellen Ribosoms im Komplex mit Thiostrepton (1)(Blau, PDB: 3cf5)^[25] bzw. EF-G-GDP (Grün, PDB: 2wri+2wrj).^[40a] Hervorgehoben ist jeweils die Aminosäure P25 (*T. thermophilus* Nummerierung): Orange (3cf5), Violett (2wri+2wrj). EF-G-GDP (Cyan, Domäne V und G' sind markiert). RNA (graues Band).

Wahrscheinlich ist die Blockade der Konformationsänderung der prolinreichen Helix von L11 sowie darauf basierende Interaktionen mit L7 ein Teil des inhibitorischen Mechanismus der Thiopeptide.^[25] Die Einführung von Punktmutationen, wie z.B. die Entfernung einzelner Prolin-Einheiten der Helix-Kerneinheit, wie im Fall von Resistenzmutationen,^[3e] könnte der Helix ein Maß von Flexibilität verleihen, welche eine Überwindung der Thiopeptid-Blockade ermöglicht. In Zukunft könnten PICC-Experimente mit Protein-Doppelmutanten (Cystein + Resistenzmutation) in diesem Zusammenhang zusätzliche Einsichten über die Dynamik des L11 N-Terminus liefern.

Zusammenfassend, stellt die „Proximity-Induced Covalent Capture“-Methodologie (PICC) eine effiziente und sensitive Methode zur biochemischen Kartierung der Thiopeptidbindegeometrie auf Protein-RNA-Komplexen bis hin zu intakten Ribosomen, dar und demonstriert eindrucksvoll die Effizienz von „affinity-labeling“-Strategien^[6] zur Analyse von Ligandenbindegeometrien selbst auf komplexen Makromolekül bzw. Komplex-Oberflächen. Die nächste Herausforderung wird die Übertragung der Methodologie auf andere Liganden-Rezeptor-Interaktionen oder Protein-Protein-Wechselwirkungen sein. Die *Sulfa*-Michael-Addition, vor allem von Dehydroalanin-Cystein-Paarungen, hat sich in diesem Zusammenhang als äußerst geeignet erwiesen, da sie keine Neigung zu unselektiven Reaktionen bei zellulär relevanten Konzentrationen zeigte (μM). Eine Einführung thiolreaktiver Gruppen in Liganden ist über semi- bzw. vollsynthetische Strategien leicht erreichbar. Zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen wäre eine Einführung reaktiver Gruppen in Form nicht-natürlicher Aminosäuren über semisynthetische Strategien (native chemical ligation, expressed protein ligation)^[54] oder die *amber*-Codon-Suppressionsstrategie möglich.^[55] Ein weiterer effizienter Ansatz wäre in diesem Zusammenhang die Einführung protein-interner Dehydroalanin-Einheiten über die milde oxidative Eliminierung von Cystein,^[9, 56] welches leicht über *in vitro* Mutagenese eingeführt werden kann.

6.5 Referenzen

- [1] B. T. Wimberly, R. Guymon, J. P. McCutcheon, S. W. White, V. Ramakrishnan, *Cell* **1999**, *97*, 491-502.
- [2] a) J. Egebjerg, S. Douthwaite, R. A. Garrett, *EMBO J.* **1989**, *8*, 607-611; b) G. Rosendahl, S. Douthwaite, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 357-363.
- [3] a) Y. Xing, D. E. Draper, *Biochemistry* **1996**, *35*, 1581-1588; b) B. T. Porse, I. Leviev, A. S. Mankin, R. A. Garrett, *J. Mol. Biol.* **1998**, *276*, 391-404; c) S. L. Bausch, E. Poliakova, D. E. Draper, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 29956-29963; d) B. T. Porse, E. Cundliffe, R. A. Garrett, *J. Mol. Biol.* **1999**, *287*, 33-45; e) D. M. Cameron, J. Thompson, S. T. Gregory, P. E. March, A. E. Dahlberg, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 3220-3227.
- [4] a) G. Lentzen, R. Klinck, N. Matassova, F. Aboul-ela, A. I. Murchie, *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 769-778; b) S. Ilin, A. Hoskins, O. Ohlenschlager, H. R. Jonker, H. Schwalbe, J. Wöhnert, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1611-1618; c) H. R. Jonker, S. Ilin, S. K. Grimm, J. Wöhnert, H. Schwalbe, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 441-454; d) D. Lee, J. D. Walsh, P. Yu, M. A. Markus, T. Choli-Papadopoulou, C. D. Schwieters, S. Krueger, D. E. Draper, Y. X. Wang, *J. Mol. Biol.* **2007**, *367*, 1007-1022.
- [5] a) M. C. Bagley, J. W. Dale, E. A. Merritt, X. Xiong, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 685-714; b) S. Schoof, S. Baumann, B. Ellinger, H. D. Arndt, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 242-245; c) R. A. Hughes, C. J. Moody, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 8076-8101; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 7930-7954; d) E. Cundliffe, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, *44*, 912-917.
- [6] F. Wold, *Methods. Enzymol.* **1977**, *46*, 3-14.
- [7] a) J. Taunton, C. A. Hassig, S. L. Schreiber, *Science* **1996**, *272*, 408-411; b) D. A. Campbell, A. K. Szardenings, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 296-303; c) D. A. Jeffery, M. Bogyo, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 87-95; d) C. Drahl, B. F. Cravatt, E. J. Sorensen, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5936-5958; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 5788-5809; e) M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3279-3301.
- [8] a) D. A. Erlanson, A. C. Braisted, D. R. Raphael, M. Randal, R. M. Stroud, E. M. Gordon, J. A. Wells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2000**, *97*, 9367-9372; b) K. Levitsky, M. D. Boersma, C. J. Ciolli, P. J. Belshaw, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 890-899; c) Y. Takaoka, H. Tsutsumi, N. Kasagi, E. Nakata, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3273-3280; d) L. J. Prins, P. Scrimin, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2324-2343; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, *48*, 2288-2306.
- [9] J. M. Chalker, G. J. Bernardes, Y. A. Lin, B. G. Davis, *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 630-640.
- [10] S. Baumann, S. Schoof, S. D. Harkal, H. D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5664-5666.
- [11] a) M. L. Chiu, M. Folcher, T. Katoh, A. M. Puglia, J. Vohradsky, B. S. Yun, H. Seto, C. J. Thompson, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20578-20586; b) Y. Zhu, W. A. van der Donk, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1189-1192.
- [12] C. K. Riener, G. Kada, H. J. Gruber, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *373*, 266-276.
- [13] M. L. Chiu, M. Folcher, P. Griffin, T. Holt, T. Klatt, C. J. Thompson, *Biochemistry* **1996**, *35*, 2332-2341.
- [14] S. Schoof, Dissertation, TU Dortmund (Dortmund), **2010**.
- [15] a) T. K. Harris, G. J. Turner, *IUBMB Life* **2002**, *53*, 85-98; b) R. L. Thurlkill, G. R. Grimsley, J. M. Scholtz, C. N. Pace, *Protein Sci.* **2006**, *15*, 1214-1218.
- [16] a) T. Gladysheva, J. Liu, B. P. Rosen, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 33256-33260; b) J. Liu, T. B. Gladysheva, L. Lee, B. P. Rosen, *Biochemistry* **1995**, *34*, 13472-13476; c) J. W. Nelson, T. E. Creighton, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5974-5983; d) M. M. Naor, J. H. Jensen, *Proteins* **2004**, *57*, 799-803.
- [17] A. C. Witt, M. Lakshminarasimhan, B. C. Remington, S. Hasim, E. Pozharski, M. A. Wilson, *Biochemistry* **2008**, *47*, 7430-7440.
- [18] B. D. Mather, K. Viswanathan, K. M. Miller, T. E. Long, *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 487-531.
- [19] M. A. Markus, D. Triantafillidou, T. Choli-Papadopoulou, D. A. Torchia, *J. Biomol. NMR* **2001**, *20*, 293-294.

- [20] a) N. A. Wilson, E. Barbar, J. A. Fuchs, C. Woodward, *Biochemistry* **1995**, *34*, 8931-8939; b) M. F. Jeng, A. Holmgren, H. J. Dyson, *Biochemistry* **1995**, *34*, 10101-10105.
- [21] K. Nordstrand, F. Aslund, S. Meunier, A. Holmgren, G. Otting, K. D. Berndt, *FEBS Lett.* **1999**, *449*, 196-200.
- [22] A. C. Storer, Y. Ozaki, P. R. Carey, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 199-209.
- [23] S. Baumann, S. Schoof, M. Bolten, C. Haering, M. Tagaki, K. Shin-Ya, H. D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6973-6981.
- [24] E. Cundliffe, J. Thompson, *Eur. J. Biochem.* **1981**, *118*, 47-52.
- [25] J. M. Harms, D. N. Wilson, F. Schluenzen, S. R. Connell, T. Stachelhaus, Z. Zaborowska, C. M. Spahn, P. Fucini, *Mol. Cell.* **2008**, *30*, 26-38.
- [26] H. R. A. Jonker, S. Baumann, A. Wolf, S. Schoof, F. Hiller, K. W. Schulte, K. K. Kirschner, H. Schwalbe, H. D. Arndt, *eingereicht* **2010**.
- [27] M. Nomura, P. Traub, H. Bechmann, *Nature* **1968**, *219*, 793-799.
- [28] T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, H. Mori, *Mol. Syst. Biol.* **2006**, *2*, 1-11.
- [29] B. A. Maguire, L. M. Wondrack, L. G. Contillo, Z. Xu, *RNA* **2008**, *14*, 188-195.
- [30] D. E. McRee, P. R. David, *Practical protein crystallography*, 2nd ed., Academic Press, San Diego, Calif., **1999**.
- [31] D. E. Koshland, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1958**, *44*, 98-104.
- [32] M. Bolten, Bachelor-Arbeit, TU Dortmund (Dortmund), **2009**.
- [33] H. D. Arndt, S. Schoof, S. Baumann, *PCT/EP2009/001949*.
- [34] A. Ke, J. A. Doudna, *Methods* **2004**, *34*, 408-414.
- [35] a) M. Garber, G. Gongadze, V. Meshcheryakov, O. Nikonov, A. Nikulin, A. Perederina, W. Piendl, A. Serganov, S. Tishchenko, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2002**, *58*, 1664-1669; b) E. Obayashi, C. Oubridge, D. Pomeranz Krummel, K. Nagai, *Methods Mol. Biol.* **2007**, *363*, 259-276.
- [36] G. L. Conn, D. E. Draper, E. E. Lattman, A. G. Gittis, *Science* **1999**, *284*, 1171-1174.
- [37] S. R. Holbrook, E. L. Holbrook, H. E. Walukiewicz, *Cell Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 234-243.
- [38] a) J. W. Bodley, L. Lin, J. H. Highland, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1970**, *41*, 1406-1411; b) J. H. Highland, L. Lin, J. W. Bodley, *Biochemistry* **1971**, *10*, 4404-4409; c) J. Modolell, B. Cabrer, A. Parmeggiani, D. Vazquez, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1971**, *68*, 1796-1800; d) R. Mazumder, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1973**, *70*, 1939-1942; e) P. Sarkar, E. A. Stringer, U. Maitra, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1974**, *71*, 4986-4990; f) N. Naaktgeboren, A. Vermaas, H. O. Voorma, *Eur. J. Biochem.* **1975**, *57*, 493-451; g) N. Naaktgeboren, P. Schrier, W. Moller, H. O. Voorma, *Eur. J. Biochem.* **1976**, *62*, 117-123; h) N. Naaktgeboren, K. Roobol, J. Gubbens, H. O. Voorma, *Eur. J. Biochem.* **1976**, *70*, 39-47; i) E. Cundliffe, J. Thompson, *J. Gen. Microbiol.* **1981**, *126*, 185-192; j) D. Moazed, J. M. Robertson, H. F. Noller, *Nature* **1988**, *334*, 362-364; k) D. M. Cameron, J. Thompson, P. E. March, A. E. Dahlberg, *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 27-35; l) L. Brandi, S. Marzi, A. Fabbretti, C. Fleischer, W. E. Hill, C. O. Gualerzi, J. Stephen Lodmell, *J. Mol. Biol.* **2004**, *335*, 881-894; m) W. S. Bowen, N. Van Dyke, E. J. Murgola, J. S. Lodmell, W. E. Hill, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 2934-2943; n) R. L. Gonzalez, Jr., S. Chu, J. D. Puglisi, *RNA* **2007**, *13*, 2091-2097.
- [39] a) B. Anderson, D. C. Hodgkin, M. A. Viswamitra, *Nature* **1970**, *225*, 233-235; b) C. S. Bond, M. P. Shaw, M. S. Alphey, W. N. Hunter, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2001**, *57*, 755-758.
- [40] a) Y. G. Gao, M. Selmer, C. M. Dunham, A. Weixlbaumer, A. C. Kelley, V. Ramakrishnan, *Science* **2009**, *326*, 694-699; b) T. M. Schmeing, R. M. Voorhees, A. C. Kelley, Y. G. Gao, F. V. t. Murphy, J. R. Weir, V. Ramakrishnan, *Science* **2009**, *326*, 688-694.
- [41] H. David-Eden, A. S. Mankin, Y. Mandel-Gutfreund, *Nucleic Acids Res.* **2010**.
- [42] a) P. Nissen, J. A. Ippolito, N. Ban, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2001**, *98*, 4899-4903; b) Y. Xin, C. Laing, N. B. Leontis, T. Schlick, *RNA* **2008**, *14*, 2465-2477.
- [43] C. Davidovich, A. Bashan, T. Auerbach-Nevo, R. D. Yaggie, R. R. Gontarek, A. Yonath, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2007**, *104*, 4291-4296.

- [44] A. Weixlbaumer, S. Petry, C. M. Dunham, M. Selmer, A. C. Kelley, V. Ramakrishnan, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 733-737.
- [45] a) L. B. Blyn, L. M. Risen, R. H. Griffey, D. E. Draper, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 1778-1784; b) G. L. Conn, A. G. Gittis, E. E. Lattman, V. K. Misra, D. E. Draper, *J. Mol. Biol.* **2002**, *318*, 963-973; c) D. E. Draper, D. Grilley, A. M. Soto, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 221-243.
- [46] a) D. E. Draper, *Biophys. J.* **2008**, *95*, 5489-5495; b) T. Yamamoto, Y. Shimizu, T. Ueda, Y. Shiro, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 5646-5652.
- [47] Y. V. Bukhman, D. E. Draper, *J. Mol. Biol.* **1997**, *273*, 1020-1031.
- [48] P. C. Ryan, M. Lu, D. E. Draper, *J. Mol. Biol.* **1991**, *221*, 1257-1268.
- [49] a) M. V. Rodnina, A. Savelsbergh, N. B. Matassova, V. I. Katunin, Y. P. Semenov, W. Wintermeyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1999**, *96*, 9586-9590; b) H. S. Seo, M. Kiel, D. Pan, V. S. Raj, A. Kaji, B. S. Cooperman, *Biochemistry* **2004**, *43*, 12728-12740.
- [50] S. E. Skold, *Nucleic Acids Res.* **1983**, *11*, 4923-4932.
- [51] S. Zhang, J. M. Scott, W. G. Haldenwang, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 2316-2321.
- [52] a) X. Yang, E. E. Ishiguro, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 6532-6537; b) R. K. Agrawal, J. Linde, J. Sengupta, K. H. Nierhaus, J. Frank, *J. Mol. Biol.* **2001**, *311*, 777-787; c) W. Li, J. Sengupta, B. K. Rath, J. Frank, *RNA* **2006**, *12*, 1240-1253; d) H. Stark, M. V. Rodnina, H. J. Wieden, M. van Heel, W. Wintermeyer, *Cell* **2000**, *100*, 301-309; e) J. M. Kavran, T. A. Steitz, *J. Mol. Biol.* **2007**, *371*, 1047-1059.
- [53] A. Savelsbergh, D. Mohr, U. Kothe, W. Wintermeyer, M. V. Rodnina, *EMBO J.* **2005**, *24*, 4316-4323.
- [54] a) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776-779; b) T. W. Muir, D. Sondhi, P. A. Cole, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1998**, *95*, 6705-6710.
- [55] a) T. L. Hendrickson, V. de Crecy-Lagard, P. Schimmel, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 147-176; b) C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**.
- [56] a) T. J. Holmes, Jr., R. G. Lawton, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 1984-1986; b) G. J. Bernardes, J. M. Chalker, J. C. Errey, B. G. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5052-5053.

Kapitel 7

Zielstrukturen von Thiopeptiden in Eukaryoten

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

S. Schoof, G. Pradel, M. N. Aminake, B. Ellinger, S. Baumann, M. Potowski, Y. Najajreh, M. Kirschner, H. -D Arndt, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3389-3393; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2010**, *49*, 3317-3321.

7.1 Einleitung

Neben ihrer starken Wirkung gegen Gram-positive Prokaryoten (vgl. Kapitel 3-6),^[1] zeigen einige Thiopeptide eine bemerkenswerte Wirksamkeit gegen eukaryotische Zellen, z.B. im Rahmen von Immunomodulation,^[2] der Krebszellproliferation^[3] sowie einer Wachstumsinhibierung des Malaria-Erregers *Plasmodium falciparum*.^[4] Für Thiostrepton (**1**) konnte in diesem Zusammenhang eine starke inhibitorische Aktivität gegen den Translationsapparat von Mitochondrien nachgewiesen werden und identifizierte so diese Organellen prokaryotische Ursprungs,^[5] als eine eukaryotische Zielstruktur von Thiopeptiden.^[6] Eine vergleichbare Aktivität konnte auch gegen die Ribosomen des Apicoplasten (rudimentäre Plastiden) von *P. falciparum* gezeigt werden.^[4c, 4d, 7] Die Blockierung der apicoplastidären Translation durch Antibiotika wie z.B. Clindamycin, ist ein effektiver Ansatzpunkt in der Antimalariatherapie.^[4a] Charakteristisch für die Wirkungsweise Ribosomen-gerichteter Antibiotika, ist deren relative spät einsetzende antiplasmodiale Wirkung, welche ca. vier Tage nach der Infektion der roten Blutzellen einsetzt („delayed death effect“).^[7a, 8] Beim Einsatz von Thiostrepton (**1**) wurde ein solcher „delayed death effect“ nie beobachtet und die Gründe für diesen abweichenden Wirkmechanismus blieben lange unverstanden.^[7a] Im Rahmen der Dissertation von Dipl. Biochem. Sebastian Schoof (TU- Dortmund) konnte eine Vielzahl semisynthetischer Derivate von **1**, mittels einer Sulfa-Michael-Additionsstrategie an den azyklischen Molekülschwanz, hergestellt werden.^[9] Beim Einsatz dieser Verbindungen gegen *P. falciparum* zeigte sich, dass Derivate mit lipophilen Seitenketten, eine im Vergleich zum Naturstoff, stärkere Wirkung aufwiesen.^[10] Interessanterweise, zeigten dieselben Verbindungen bei der antibakteriellen Analyse deutlich niedrigere Affinitäten als der Naturstoff.^[9b] Diese Diskrepanz, sowie der ausbleibende „delayed death effect“ wiesen auf eine mögliche zweite Thiopeptid-Zielstruktur in *P. falciparum* und anderen Eukaryoten hin. Beiträge zur Identifizierung und Charakterisierung dieser Zielstruktur werden in diesem Kapitel dargelegt.

7.2 Ergebnisse

Die biochemischen Studien zur eukaryotischen Zielstruktur von Thiopeptidantibiotika wurden in enger Kooperation mit Dipl. Biochem. Sebastian Schoof und Dipl. Biochem. Bernhard Ellinger durchgeführt.

Zur Detektion möglicher Zielstrukturen in eukaryotischen Zellen wurden im Rahmen dieser Studien Zellfärbungen von eukaryotischen BSC-1-Zellen mit der fluoreszenten Thiostreptonsonde^[9b] (Dipl. Biochem. Bernhard Ellinger) durchgeführt (Abbildung 7.1).^[10] Die parallele Färbung der Zellen mit einem Mitochondrien-spezifischen Farbstoff zeigte eine Kollokalisierung von Farbstoff und Sonde und bestätigte die mitochondriale Zielstruktur.^[10a] Neben den Mitochondrien wurden jedoch noch weitere, leicht granuläre Zellbestandteile in Nukleus und Cytoplasma angefärbt. Gezielte Ko-Färbungsstudien mit fluoreszenten Antikörpern gegen verschiedene Zellbestandteile ergaben im Fall eines Antikörpers gegen das 20S Proteasom, die Detektion eines vergleichbaren Färbungsmusters.

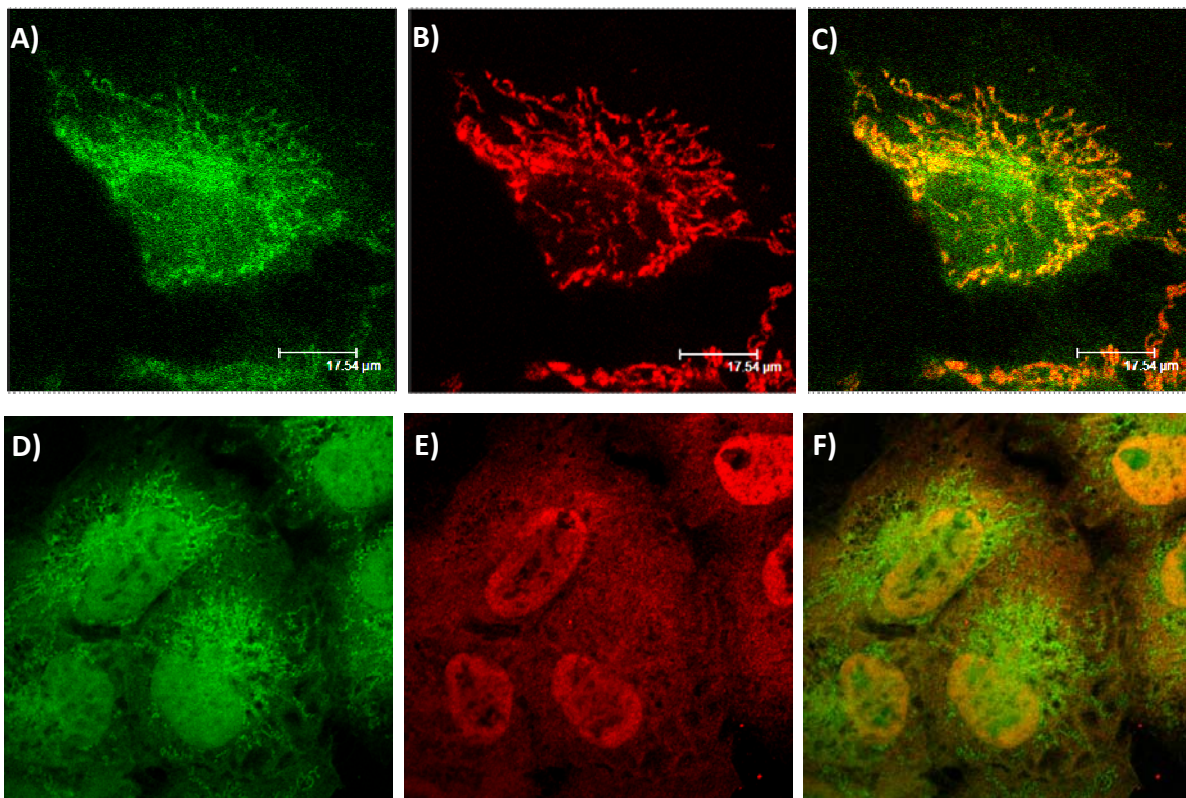


Abbildung 7.1: Lokalisierung von Thiostrepton in fixierten BSC-1-Zellen (Dipl. Biochem. Bernhard Ellinger). A) Thiostreptonsonde 5 (Grün), B) MitoTracker (Mitochondrien, Rot), C) Überlagerung von A und B. Ko-Lokalisierung (gelb), D) Thiostreptonsonde 5 (Grün), E) α -20S-Proteasomantikörper (Rot), F) Überlagerung von D und E. Ko-Lokalisierung (gelb).

Zur Validierung des 20S Proteasoms als Thiostrepton-Zielstruktur wurden Fluoreszenzpolarisations-Bindungsstudien (Kapitel 2.11.2.7) der fluoreszenten Thiostreptonsonde 5 an das 20S Proteasom aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, durchgeführt (Abbildung 7.2). Die Titration der Sonde mit dem Proteasom führte zu einem

konzentrationsabhängigen Anstieg des Polarisations signals und einer Sättigung ab ca. 10 μM Proteasom, mit einer scheinbaren Dissoziationskonstante K_{app} von $1,75 \pm 0,35 \mu\text{M}$. Titrations in Anwesenheit eines Fluorescein-Linker-Konstrukts ohne Thiostrepton, hatten keinen Einfluss auf das Polarisations signal (Daten nicht gezeigt).

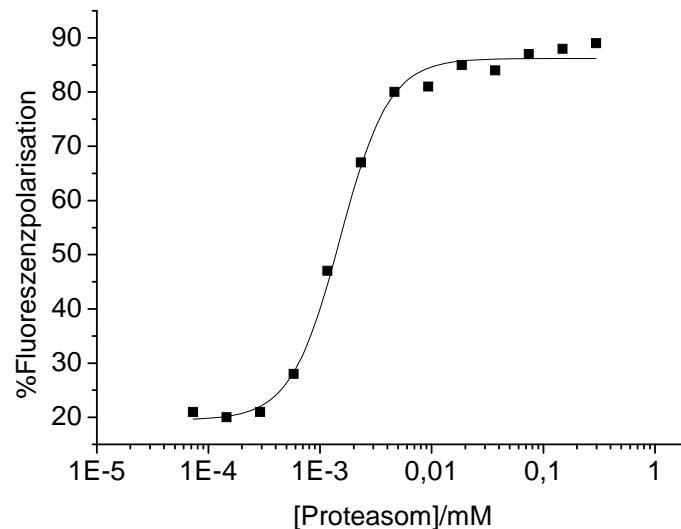


Abbildung 7.1: Fluoreszenzpolarisations-Bindungsstudien der fluoreszenten Thiostreptonsonde (5) an das 20S Proteasom aus *Saccharomyces cerevisiae*. Hierzu wurde konstante Mengen der Sonde (1 μM) mit variierenden Mengen des 20S Proteasoms titriert. Die Kurve wurde zur Analyse an die Hill-Funktion angepasst.

Die direkte Inhibition der proteolytischen Aktivität des 20S Proteasoms durch Thiopeptidnaturstoffe und semisynthetische Derivate wurde darüberhinaus in einem fluorogenen 20S Proteasom-(humane Erythrocyten)-Inhibitionssystem (Dipl. Biochem. Sebastian Schoof) vertieft untersucht und bestätigt.^[9a, 10a]

7.3 Diskussion

Neben der Wirksamkeit von Thiopeptidantibiotika als Inhibitoren der prokaryotischen Translation (vgl. Kapitel 3-6),^[1] inhibieren Thiopeptide zusätzlich den Translationsapparat eukaryotischer Organellen wie Mitochondrien und Plastiden.^[4, 6] Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte das 20S Proteasom als zweite eukaryotische Zielstruktur von Thiopeptiden identifiziert werden. Wie bereits in Kapitel 1 erwähnt zeigen Thiopeptide wie Thiostrepton (1) und Siomycin auch eine Wirksamkeit auf den onkogenen

Trankriptionsfaktor FoxM1. Sie inhibieren hier sowohl dessen Expression als auch die Transkriptionsaktivität.^[3c] Darüberhinaus induzieren sie Apoptose in humanen Krebszellen.^[3d, 11] Interessanterweise wurde dasselbe Aktivitätsprofil für verschiedene bekannte Proteasomeninhibitoren beschrieben.^[12] Dieser Sachverhalt legt die Vermutung nahe, dass die Thiopeptid-induzierte Inhibition der FoxM1-Expression sowie die Auslösung der Apoptose in Krebszellen, direkte Folgeeffekte der Inhibition des Proteasoms sind.^[12-13] Bindungsmodus, Bindungsstöchiometrie der Thiopeptide am Proteasom, so wie die genaue Analyse der Wirkung auf molekularer und zellulärer Ebene sind Gegenstand laufender Studien. Diese zusätzliche Wirksamkeit von Thiopeptiden liefert einen wichtigen Beitrag zur spezifischen Aktivität dieser Stoffklasse gegen Krebszellen sowie den Malariaerreger *Plasmodium falciparum*.^[3c-e, 10a, 11-14]

7.4 Referenzen

- [1] a) R. Donovan, J. F. Pagano, H. A. Stout, M. J. Weinstein, *Antibiot. Annu.* **1955**, *3*, 554-559; b) W. P. Jambor, B. A. Steinberg, L. O. Suydam, *Antibiot. Annu.* **1955**, *3*, 562-565; c) G. H. Nesbitt, P. R. Fox, *Vet. Med. Small Anim. Clin.* **1981**, *76*, 535-538; d) M. C. Bagley, J. W. Dale, E. A. Merritt, X. Xiong, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 685-714.
- [2] M. Ueno, S. Furukawa, F. Abe, M. Ushioda, K. Fujine, S. Johki, H. Hatori, H. Ueda, *J. Antibiot.* **2004**, *57*, 590-596.
- [3] a) K. C. Nicolaou, M. Zak, S. Rahimpour, A. A. Estrada, S. H. Lee, A. O'Brate, P. Giannakakou, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15042-15044; b) B. D. Bowling, N. Doudican, P. Manga, S. J. Orlow, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2008**, *63*, 37-43; c) U. G. Bhat, M. Halasi, A. L. Gartel, *PLoS One* **2009**, *4*, e5592; d) U. G. Bhat, P. A. Zipfel, D. S. Tyler, A. L. Gartel, *Cell Cycle* **2008**, *7*, 1851-1855; e) J. M. Kwok, S. S. Myatt, C. M. Marson, R. C. Coombes, D. Constantinidou, E. W. Lam, *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 2022-2032.
- [4] a) M. Schlitzer, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 944-986; b) G. A. McConkey, M. J. Rogers, T. F. McCutchan, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 2046-2049; c) M. Sullivan, J. Li, S. Kumar, M. J. Rogers, T. F. McCutchan, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2000**, *109*, 17-23; d) S. Chaubey, A. Kumar, D. Singh, S. Habib, *Mol. Microbiol.* **2005**, *56*, 81-89.
- [5] L. Margulis, M. F. Dolan, *Sciences* **1997**, *37*, 20-25.
- [6] L. Zhang, N. C. Ging, T. Komoda, T. Hanada, T. Suzuki, K. Watanabe, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 6423-6427.
- [7] a) C. D. Goodman, V. Su, G. I. McFadden, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2007**, *152*, 181-191; b) B. Clough, M. Strath, P. Preiser, P. Denny, I. R. Wilson, *FEBS Lett.* **1997**, *406*, 123-125; c) M. J. Rogers, Y. V. Bukhman, T. F. McCutchan, D. E. Draper, *RNA* **1997**, *3*, 815-820.
- [8] a) A. A. Divo, T. G. Geary, J. B. Jensen, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1985**, *27*, 21-27; b) M. E. Fichera, M. K. Bhopale, D. S. Roos, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 1530-1537.
- [9] a) S. Schoof, Dissertation, TU Dortmund (Dortmund), **2010**; b) S. Schoof, S. Baumann, B. Ellinger, H. D. Arndt, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 242-245; c) H. R. A. Jonker, S. Baumann, A. Wolf, S. Schoof, F. Hiller, K. W. Schulte, K. K. Kirschner, H. Schwalbe, H. D. Arndt, *eingereicht* **2010**.

- [10] a) S. Schoof, G. Pradel, M. N. Aminake, B. Ellinger, S. Baumann, M. Potowski, Y. Najajreh, M. Kirschner, H. D. Arndt, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3389-3393; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 3317-3321.
- [11] M. Halasi, H. Zhao, H. Dahari, U. G. Bhat, E. B. Gonzalez, A. V. Lyubimov, D. A. Tonetti, A. L. Gartel, *Cell Cycle* **2010**, *9*.
- [12] A. L. Gartel, *Expert Opin. Investig. Drugs.* **2010**, *19*, 235-242.
- [13] U. G. Bhat, M. Halasi, A. L. Gartel, *PLoS One* **2009**, *4*, e6593.
- [14] a) A. L. Gartel, *Expert. Opin. Ther. Targets* **2008**, *12*, 663-665; b) S. K. Radhakrishnan, A. L. Gartel, *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, c1; author reply c2; c) M. Halasi, A. L. Gartel, *Cell Cycle* **2009**, *8*, 1966-1967; d) B. Pandit, A. L. Gartel, *Prostate* **2010**, *70*, 825-833; e) J. M. Kwok, B. Peck, L. J. Monteiro, H. D. Schwenen, J. Millour, R. C. Coombes, S. S. Myatt, E. W. Lam, *Mol. Cancer Res.* **2010**, *8*, 24-34.

Kapitel 8

Zusammenfassung

8. Zusammenfassung

Die Klasse der Thiopeptidantibiotika ist eine Gruppe hochmodifizierter makrozyklischer Polythiazolylpeptide. Sie zeigen nanomolare antibiotische Aktivität gegen eine Vielzahl Gram-positiver Pathogene, wie z.B. den multiresistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA). Trotz ihrer hochpotenten antibakteriellen Wirksamkeit, wird bisher keines der Thiopeptide in der Humantherapie eingesetzt. Thiopeptide inhibieren das bakterielle Translationsystem durch die Störung der 70S ribosomalen GTPase-assoziierten Region (GAR). Thiopeptidantibiotika, mit ihrem berühmtesten Vertreter Thiostrepton (**1**), binden an einen konservierten und hoch-dynamischen Komplex des ribosomalen Proteins L11 (rplK) und der 23S rRNA. Die Beeinflussung der Konformation von L11 führt hierbei entweder zu einer Blockade oder Stimulierung der Aktivität ribosomaler GTPasen. Die bemerkenswerte Aktivität gegen eine klinisch bisher ungenutzte, bakterielle Zielstruktur sowie das genaue Verständnis dieser Kleinmolekül-RNA-Protein-Interaktion war die Triebfeder zur detaillierten Analyse dieser vielversprechenden Naturstoffe.

Thiostrepton-basierter Bindungsassay

Zu Beginn dieser Arbeit lagen keine quantitativen Daten zur Affinität von Thiopeptiden an ihre ribosomale Zielstruktur vor. Zur Bestimmung von Bindekonstanten wurde daher ein auf Fluoreszenzpolarisation basierender Bindungs-(Kompetitions)-Assay für den Gebrauch im Mittel- bis Hochdurchsatzformat entwickelt.^[1] Dafür wurden semisynthetische Thiostrepton-FITC-Konjugate entwickelt (Dipl Biochem. Sebastian Schoof), welche als molekulare Sonden, die quantitative Analyse der Thiopeptid-Zielstruktur-Affinität im mikromolaren bis pikomolaren Konzentrationsbereich an isolierte 23S rRNA-L11-Komplexen als auch an intakten Ribosomen, erlaubten.^[2] Das zum Patent angemeldete System^[2b] ermöglichte u.a. zum ersten Mal:

1. Die Bestimmung **quantitativer Bindedaten** für eine Vielzahl unterschiedlicher **Thiopeptidnaturstoffe**. Einige der Thiopeptide wie Thiostrepton und Nosiheptid, zeigten hierbei bemerkenswerte Zielstrukturaffinitäten im **pikomolaren** Bereich (**Kapitel 3**).^[1]
2. Die Bestimmung der **Zielstrukturaffinitäten** einer Vielzahl (>50) von **semisynthetischen** (z.T. physikochemisch-optimierten) **Thiostrepton-Derivaten** und **totalsynthetischen Nosiheptid-Derivaten**. Das System lieferte so wertvolle Information bezüglich der

molekularen Aspekte der Interaktion u.a. im Sinne einer Struktur-Affinitäts-Relation. (**Kapitel 4**).^[1, 3]

3. Die Analyse der molekularen Determinanten von Thiopeptid-Resistenzen.^[4] Hierbei wurde der Einfluss von Punktmutationen in Protein und RNA auf die Affinität von Thiopeptiden untersucht. Interessanterweise zeigten die Studien, dass für Thiopeptide wie Thiostrepton Mutationen der RNA, aber nicht des L11-Proteins zu Affinitätsverlusten führen, obwohl Mutationen in beiden Makromolekülen *in vivo* zu Resistenzen führen. Dieser Sachverhalt legt eine mutationsbedingte Flexibilitätserhöhung des L11 Proteins nahe, welche die Thiostreptonbindung nicht beeinflusst. Darüberhinaus identifiziert sie die 23S rRNA als primäre Zielstruktur von Thiostrepton. Andere Thiopeptide wie Micrococcin hingegen, zeigten eine deutliche Reduktion der Affinität bei Mutationen im Protein. Vertreter dieser Thiopeptidklassen scheinen im Unterschied zu Thiostrepton direkt an das Protein zu binden, was einen unterschiedlichen Bindungsmodus vermuten lässt (**Kapitel 5**).

Die gesammelten Affinitätsdaten wurden zusätzlich mit der *in vitro* Wirksamkeit der Thiopeptidnaturstoffe bzw. Derivate auf die bakterielle Proteinbiosynthese, wie auch auf Gram-positive Prokaryoten, korreliert. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit ein ***in vitro* Translations-Inhibitions-System**, auf Basis eines kommerziellen zellfreien, gekoppelten Transkriptions-Translationssystems (*E. coli*), für Mitteldurchsatz-Analysen optimiert und etabliert (**Kapitel 3-5**).

Der entwickelte, hochempfindliche Bindungsassay wurde u.a. für die Verwendung in Mittel- bis Hochdurchsatzformaten konzipiert und hat somit das Potenzial zur Analyse großer Substanzbibliotheken. Für gezielte organischer Semi- und Totalsynthese wurde so eine wertvolle Plattform für die Suche und Analyse von Thiopeptid-Leitstrukturen und –Derivaten erarbeitet, die auch zur Auffindung neuer Modulatoren der 70S ribosomalen GTPase-assoziierten Region genutzt werden kann.

Nähe-induzierter kovalenter Einfang – Proximity-Induced Covalent Capture (PICC)^[5]

Trotz intensiver kristallographischer und NMR-spektroskopischer Analysen wurde die exakte Position und molekulare Struktur der Thiopeptidbindestelle kontrovers diskutiert, vor allem in Hinblick auf die geometrische Orientierung des Liganden. Um einen genauere Einblick in diese komplexe Wechselwirkung zu bekommen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die „**Proximity-Induced-Covalent-Capture**“ (PICC) Methodologie entwickelt.^[5] Dazu wurde die

klassischen **Affinitätsmarkierung**, zur genauen Analyse der Ligandenbindung an RNA-Proteinkomplexen ausgebaut. Die Technik basiert generell auf der Michael-Additions-Reaktivität der Thiopeptid-Dehydroaminosäuregruppen mit Cystein-Thiofunktionen. Durch das Einbringen von Cysteinresten in den N-Terminus von L11 in Kombination mit gezielter chemischer Modifizierung der Thiopeptide war es möglich, die genaue Lage der Thiopeptid-Dehydroaminosäurefunktionen auf der Oberfläche des L11 Proteins in isolierten **L11-23S rRNA Komplexen** wie auch **vollständigen Ribosomen** in **Aminosäureauflösung** zu kartieren. Die Technik erlaubte die Identifizierung unterschiedlicher Bindemodi verschiedener Thiopeptidklassen, sowie die Detektion möglicher Konformationsunterschiede des L11-Proteins, in Abhängigkeit der Ionen- als auch der Makromolekülumgebung (freier Komplex vs. Ribosom). Diese Resultate dieser wurden durch kürzlich publizierte kristallographische Studien bestätigt und untermauert (**Kapitel 6**).

Ein wesentlicher Vorteil der PICC-Methode ist, dass sie neben der Ligandenorientierung und auch einen „Schnappschuss“ der Konformation des L11 N-Terminus erlaubt. PICC könnte so in Zukunft z.B. bei der Analyse der L11-Konformation in Anwesenheit verschiedener ribosomaler Faktoren helfen, oder, durch die Einführung von Doppelmutationen in L11, auch eine eingehendere Analyse der L11-vermittelten Thiopeptidresistenz ermöglichen. Darüberhinaus zeigen diese Ergebnisse, dass dieses Vorgehen in Zukunft auch auf weitere Makromolekül-Ligand- wie auch Makromolekül-Makromolekül-Wechselwirkungen angewandt werden könnte.

Die eukaryotische Thiopeptid-Zielstruktur^[6]

Thiopeptide zeigen vielversprechende selektive Aktivitäten gegen verschiedene Krebszelllinien und den Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum*. In Kooperation mit Dipl. Biochem. Sebastian Schoof und Dipl. Biochem. Bernhard Ellinger konnte im Rahmen dieser Arbeit, das 20S Proteasom als eine eukaryotische Zielstruktur von Thiopeptiden identifiziert und im Bezug auf Bindung und Inhibitionsmechanismus charakterisiert werden (**Kapitel 7**). Die Kenntnis dieser Zielstruktur ebnet den Weg für die gezielte Synthese neuer Thiopeptid-basierter Proteasomen-Inhibitoren und möglicherweise auch neuer Krebs- und Malaria-Medikamente.

Publikationen

- [1] S. Schoof, S. Baumann, B. Ellinger, H. D. Arndt, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 242-245.
- [2] a) H. D. Arndt, S. Schoof, S. Baumann, *PCT/EP2009/001949*; b) H. D. Arndt, S. Schoof, S. Baumann, B. Ellinger, *PCT/EP2009/001948*.
- [3] H. R. A. Jonker, S. Baumann, A. Wolf, S. Schoof, F. Hiller, K. W. Schulte, K. K. Kirschner, H. Schwalbe, H. D. Arndt, *eingereicht* **2010**.
- [4] S. Baumann, S. Schoof, M. Bolten, C. Haering, M. Tagaki, K. Shin-Ya, H. D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6973-6981.
- [5] S. Baumann, S. Schoof, S. D. Harkal, H. D. Arndt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5664-5666.
- [6] S. Schoof, G. Pradel, M. N. Aminake, B. Ellinger, S. Baumann, M. Potowski, Y. Najajreh, M. Kirschner, H. D. Arndt, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3389-3393; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 3317-3321.

Kapitel 9

Anhang

9. Anhang

9.1 Formel-Herleitung

Für die gekoppelten Gleichgewichte $\text{RNA} + \text{L11} \rightleftharpoons [\text{RNA/L11}]$ und $[\text{RNA/L11}] + \text{TS}^* \rightleftharpoons [\text{RNA/L11/TS}]$ gilt (vgl. 2.13.2.2):

$$(1) \quad [\text{RNA}] = [\text{RNA}]_0 - y - \frac{[\text{RNA}] \times l}{k_1}$$

$$\Rightarrow [\text{RNA}] \times \left(1 + \frac{l}{k_1}\right) = [\text{RNA}]_0 - y \quad ([\text{RNA}]_0 = R)$$

$$\Rightarrow [\text{RNA}] = \frac{R-y}{1+\frac{l}{k_1}}$$

$$(2) \quad [T] = [T]_0 - y = T - y$$

$$(3) \quad \frac{k_1 \times k_2}{l} = \frac{[\text{RNA}] \times [T]}{y} = \frac{1}{y} \left(\frac{R-y}{1+\frac{l}{k_1}} \right) (T - y)$$

$$\Rightarrow \left(y \times \frac{k_1 \times k_2}{l} \right) = RT - Ry - Ty + y^2 = y^2 - y(R + T) + RT$$

$$\Rightarrow y^2 - y(R + T) + RT = y \left(\frac{k_1 \times k_2}{l} \right) + k_2$$

$$\Rightarrow y^2 - y \left(R + T + \frac{k_1 \times k_2}{l} + k_2 \right) + RT = 0$$

$$\Rightarrow y_{1,2} = \frac{R+T+\frac{k_1 \times k_2}{l}+k_2}{2} - \sqrt{\left(\frac{R+T+\frac{k_1 \times k_2}{l}+k_2}{2} \right)^2 - RT}$$

$$\Rightarrow \frac{A-A_0}{A_{max}-A_0} \times T = \frac{R+T+\frac{k_1 \times k_2}{l}+k_2}{2} - \sqrt{\left(\frac{R+T+\frac{k_1 \times k_2}{l}+k_2}{2} \right)^2 - RT}$$

$$\Rightarrow A = (A_{max} - A_0) \left(\frac{c_{RNA}+T^*+\frac{k_1 k_2}{l}+k_2}{2T^*} - \sqrt{\left(\frac{c_{RNA}+T^*+\frac{k_1 k_2}{l}+k_2}{2T^*} \right)^2 - \frac{c_{RNA}}{T^*}} \right) + A_0$$

mit A : Anisotropie/Polarisation; A_{max} und A_0 : max./min. Polarisationswerte; c_{RNA} : Konzentration des RNA-Fragments; T^* : Konzentration der fluoreszenten Thioestreptonsonde; l : Konzentration des L11-Proteins; k_1 : K_{D1} der RNA/L11-Komplex Bildung; k_2 : K_{D2} der Sonden + RNA/L11-Komplex-Bildung

9.2 Aminosäuresequenzen der verwendeten L11-Wildtyp-Proteine

EcoL11 (Escherichia coli)

MAKKVQAYVKLQVAAGMANPSPVGPALGQQGVNIMEFCKAFNAKTDSIEKGLPIPVVITVYADRSFTF
VTKTPPAAVLLKKAAGIKSGSGKPNKDKVKGISRAQLQEIAQTKAADMTGADIEAMTRSIEGTARSMGLV
VED

TthL11 (Thermus thermophilus)

MKKVVAVVKLQLPAGKATPAPPVGPALGQHGANIMEFVKAFNAAAANMGDAIVPVEITVYADRSFTFVTK
TPPASYLIRKAAGLEKGAHKPGREKVGRITWEQVLEIAKQKMPDLNTTDLEAAARMIAGSARSMGVEVV
GAPEVKDA

BsuL11 (Bacillus subtilis)

MAKKVVVVKLQIPAGKANPAPPVGPALGQAGVNVMGFCKEFNARTADQAGLIIPVEISVYEDRSFTFIT
KTPPAAVLLKKAAGIESGSGEPNRNKVATVKRDKVREIAETKMPDLNAADVEAAMRMVEGTARSMGIVI
ED

9.3 Bestimmung aktiver Sulfhydrylgruppen in *Thermus thermophilus* L11 Monocysteinmutanten mittels des Ellman'schen Tests

Mittelwerte von je drei Bestimmungen:

	[Protein]/ μM (A_{260})	[Sulhydryl]/ μM	intakte SH-Gruppen (%)
M1C	19,2 \pm 1,1	19,1 \pm 1,4	99,5
V7C	21,5 \pm 2,0	20,7 \pm 1,5	96,3
L10C	24,3 \pm 1,0	23,1 \pm 0,9	95,1
Q11C	21,7 \pm 1,3	20,9 \pm 1,3	96,3
A20C	13,9 \pm 0,9	14,0 \pm 1,6	100
G24C	10,9 \pm 0,7	10,4 \pm 1,2	95,4
P25C	13,8 \pm 1,2	14,2 \pm 1,3	102
A26C	17,7 \pm 0,9	17,1 \pm 1,4	96,6
Q29C	15,2 \pm 1,2	14,6 \pm 0,8	96,0
H30C	20,9 \pm 1,1	20,4 \pm 1,1	97,6
A32C	16,4 \pm 0,89	16,2 \pm 1,6	98,8
I34C	11,3 \pm 0,8	11,2 \pm 1,7	99,0
M35C	18,3 \pm 0,7	18,6 \pm 1,6	101,6
V38C	17,9 \pm 1,1	17,3 \pm 1,5	96,7

Danksagung

Die letzten viereinhalb Jahre meine Lebens waren in der Tat eine bemerkenswerte Zeit. Ich möchte an dieser Stelle einigen Leuten, die mich wissenschaftlich oder privat auf meiner Reise begleitet haben, meinen Dank aussprechen.

Zuerst möchte ich meinen Doktorvater, Dr. Hans-Dieter Arndt, erwähnen. Hans-Dieter, ich danke dir für die Möglichkeit, als erster Biologe, meine Doktorarbeit in deiner Gruppe anfertigen zu dürfen und auch für dein konstantes Interesse und Vertrauen in meine Arbeit. Die Thiopeptide waren eine Herausforderung...ich habe bei dir gelernt diese zu meistern. Darüberhinaus danke ich dir für deine Hilfsbereitschaft in allen Belangen.

Prof. Dr. Herbert Waldmann möchte ich für die Übernahme des Erstgutachtens sowie für die Bereitstellung der exzellenten Arbeitsbedingungen danken. Prof. Dr. Roger Goody danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt dem Arbeitskreis Arndt: Dr. Matthias Riedrich, Dr. Surendra Harkal, Dr. Bahar Kilitoglu, Dr. Jin-Yong Lu, Kirtikumar Jadhav, Dr. Roman Lichtenecker, Patrick Loos und natürlich Sebastian Schoof. Sebastian, ich möchte dir für die gute Zusammenarbeit danken. Ich glaube diese war eine wichtige Triebfeder unserer beiden Doktorarbeiten und hat es uns ermöglicht den Thiopeptiden einige Geheimnisse zu entlocken.

An dieser Stelle möchte auch ich meinen ehemaligen Studenten Arnab Kumar Kundu, Daniel Augner (Scherge!), Claudia Haering, Kathrin Schulte und Marcel Bolten danken. Ihr habt in besonderem Maße zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Mein Dank geht an alle Mitarbeiter im AK Waldmann und vor allem an die Biotruppe: Hier möchte ich Dr. Bernhard Ellinger, Dr. Sascha Menninger, Dr. Karin Warburg, Christine Nowak, Siegfried Rosin-Steiner und natürlich der Lab-Mutti Beate Schoelermann danken. Vielen Dank für jedes aufmunternde Gespräch und die stets positive Atmosphäre im Lab.

A big Thank You goes out to the „indian community“ in the AK Waldmann. Thanks for all the nice get-togethers we had, and the chance to experience the indian culture with all its colorful facettes. Fir milenge!!!

Ein riesiges Dankeschön geht ebenfalls an die Jungs in meiner Band „Daylight“. Matze, Markus, Albi, Marc, ich danke euch für die nötige „kreative Zerstreuung“. Daylight rocks !!!

An dieser Stelle möchte ich meiner Schwiegerfamilie Edelgard und Philipp danken. Ich danke euch dafür, dass ihr mich in euren Kreis aufgenommen habt. Ich freue mich darüber auch bald ein Teil eurer Familie zu sein.

Tiefempfundenen Dank möchte ich meiner ganzen Familie aussprechen. Ich danke euch allen für eure ständige Unterstützung, Liebe und all die Opfer, die ihr für mich gebracht habt. Ohne euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Sabine, die Liebe und Dankbarkeit die ich für dich empfinde ist nicht in Worte zu fassen. Ich danke dir für jeden Tag und dafür, dass du es geschafft hast, mich durch deine liebe Art immer wieder aufzubauen. Ich freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft in Kalifornien und wo auch immer uns der Wind hin weht. Zusammen schaffen wir alles! Ich liebe dich!

Sascha