

Zusammenfassung

Die aktuelle Antibiotikaforschung basiert trotz großer Fortschritte auf dem Gebiet der kombinatorischen, organischen Synthese immer noch zu einem großen Teil auf Naturstoffbibliotheken bakteriellen oder pilzlichen Ursprungs. Innerhalb dieser Naturstoffe sind nichtribosomale Peptide (NRPs) eine enorm wichtige bioaktive Substanzklasse. Neben antibiotischen Eigenschaften können sie weiterhin immunsuppressive, antifungale und tumorunterdrückende Aktivität entfalten. NRPs werden von Multi-Domänen Proteinen den so genannten nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) in einer Art Fließbandmechanismus aufgebaut. Zwar sind die individuellen NRPS-Domänen biochemisch und strukturell sehr gut untersucht, jedoch sind die für das detaillierte Verständnis der Naturstoffbiosynthese essentiellen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Domänen sowohl strukturell, als auch mechanistisch noch kaum verstanden.

In dieser Arbeit gelang der erste experimentelle Nachweis von Interaktionen zwischen einer Adenylierungs- mit einer *in cis* vorliegenden Peptidyl Carrier Protein-Domäne aus einem NRPS Initiationsmodul. Mit biochemischen Methoden, wie partiellen tryptischen Verdauen, Gelfiltrationschromatographie und chemischen Markierungsassays, wurde festgestellt, dass der 4'-Phosphopantetheinarm der PCP-Domäne sich in unterschiedlichen Positionen während des Katalysezyklus befindet und zwar abhängig vom Zustand der Adenylierungs-Domäne. Die produktive Wechselwirkung zwischen den beiden Domänen benötigt sowohl eine post-translational modifizierte holo-Peptidyl Carrier Protein-Domäne, als auch eine spezielle Konformation der Adenylierungs-Domäne, die Thioesterkonformation. Die hier durchgeführten Studien charakterisieren erstmalig die großen konformationellen Bewegungen in NRPS-Proteinen und sollten den Startpunkt für ein tiefgreifendes Verständnis des antibiotika-produzierenden Proteintemplats bilden.

Für die Untersuchung von Proteinstrukturen und -dynamiken mit spektroskopischen Methoden, wie der NMR- oder der Fluoreszenzspektroskopie, ist die Modifikation des zu untersuchenden Proteins mit biophysikalischen Sonden oft unvermeidlich. Für den gezielten Einbau dieser Sonden in Proteine sind, unter anderem, gespaltene Inteine ein wichtiges Werkzeug der Chemischen Biologie. Die von gespaltenen Inteinen vermittelte Protein *trans*-Spleißreaktion verbindet die N- und C-terminal zu den individuellen Inteinhälften vorliegenden Polypeptidsequenzen, die N- und C-Exteine, über eine native Peptidbindung und erlaubt damit den definierten Aufbau eines Proteins aus mehreren Segmenten.

Mit dem natürlich gespaltenen DnaE Intein aus *Nostoc punctiforme* (*Npu*) wurde in dieser Arbeit das bisher schnellste *trans*-spleißende Intein biochemisch mit gereinigten Proteinen charakterisiert. Neben der hohen monomolekularen Reaktionsrate von $1,1 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$ bei 37°C zeigte es mit verschiedenen Exteinsequenzen robuste Spleißausbeuten von 50 - 90 % in dem Temperaturbereich von 6 bis 37°C . Als ein Grund für verminderte Spleißausbeuten konnte die Bildung von löslichen Aggregaten der individuellen Inteinhälften nachgewiesen werden. NMR-Untersuchungen ergaben, dass sowohl die natürlich gespaltenen individuellen Hälften des *Npu* DnaE Inteins, als auch die des künstlich gespaltenen *Synechocystis* species PCC6803 DnaB Inteins keine definierte Faltung ohne das Partnerprotein aufwiesen. Für erstere konnte bei Komplexbildung der Hälften und nach der Spleißreaktion der Übergang in eine gefaltete Konformation nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde mit dem SPLICEFINDER-System eine Methode entwickelt, die es schnell und unkompliziert erlaubt parallel mehrere Insertionspositionen von gespaltenen Inteinen in Zielproteinen auf ihre Spleißaktivität zu überprüfen. Für eine Anwendung dieses Systems, der segmentellen Isotopenmarkierung von Proteinen für NMR-Untersuchungen, konnte ein einfaches Verfahren zur Bestimmung der Markierungseffizienz etabliert werden. Es ist anzunehmen, dass die in dieser Arbeit durchgeführten Studien zu gespaltenen Inteinen deren Einsatzbreite für die selektive Modifikation von Proteinen signifikant erhöhen werden.

Summary

Modern antibiotic research relies, despite great efforts in combinatorial organic synthesis, still strongly on compound libraries with bacterial or fungal origin. One of the most prominent bio-active substance classes consists of the so called nonribosomal peptides (NRPs). They can possess besides antibacterial properties various other activities, like immuno- or tumour-suppressive and antifungal activities. NRP-production is catalyzed by multidomain enzymes, the nonribosomal peptide synthetases (NRPS), in an assembly line fashion via a protein-template directed mechanism. In contrast to the well investigated and structurally characterized individual NRPS domains, the essential domain-interactions during the natural product biosynthesis remain largely elusive.

This work presents the first experimental evidence for conformational changes in the cross-talk between an adenylation and an *in cis* peptidyl-carrier protein domain from an NRPS initiation module. Using partial tryptic digests, gel filtration chromatography, native PAGE and chemical labeling experiments it could be shown, that the 4'-phosphopantethein moiety of the peptidyl-carrier protein domain changes its position as a result of a conformational change in the adenylation domain. The productive interaction between the two domains requires the post-translationally modified holo-form of the peptidyl-carrier protein domain and a distinct conformation of the adenylation domain, the thioester conformation. The conducted studies characterize for the first time the large conformational movements in NRPS proteins and are a good starting point for an in-depth understanding of the antibiotics-producing protein template.

Fluorescence and NMR spectroscopy serve as important tools for the elucidation of protein structure and dynamics. They often rely on the incorporation of biophysical markers into the protein of interest. Split inteins are one method out of the Chemical Biology's tools box to achieve these selective protein modifications. The split intein mediated protein *trans*-splicing reaction fuses the N- and C-terminal flanking regions of the intein, the N- and the C-extein, together through a native peptide bond. This ligation reaction therefore allows building up a protein from differently derived and/or treated segments.

The naturally split DnaE intein from *Nostoc punctiforme* (*Npu*) was characterized for the first time in this work with purified proteins *in vitro*. It surprisingly possessed the highest apparent first-order rate constant reported for the protein *trans*-splicing reaction so far - $(1.1 \pm 0.2) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ at 37°C. Furthermore, the reaction was high-yielding (50 - 90 %) with respect to different extein sequences and in the temperature range from 6 to 37°C. The formation of soluble aggregates of the individual *Npu* DnaE intein halves was identified as one reason for splicing yields below completion. NMR investigation established that the naturally split *Npu* DnaE as well as the halves of the artificially split *Synechocystis* species PCC6803 DnaB intein do not exhibit one defined folded structure and that they are intrinsically disordered without their partner protein. For the *Npu* DnaE intein it also could be shown via NMR that the individual halves fold into an ordered structure after the protein *trans*-splicing reaction, as well as upon complex formation. Additionally, the SPLICEFINDER system, a PCR-based method for the fast and easy screening of active split intein insertions in any target protein was developed. It shortens significantly the tedious cloning procedures to obtain the desired intein fusion genes. For one application of the SPLICEFINDER method, the segmental isotopical labeling of proteins for NMR studies, a new and easy procedure to determine the labeling efficiency was established. It is based on tryptic in-gel digests with subsequent MALDI-TOF MS analysis. In conclusion, the conducted studies on split inteins are expected to promote and strengthen the general use of these ligation catalysts in the area of selective protein modification.