

# Strukturelle Aufklärung der Bispezifität von A-Domänen als Basis für die Aktivierung nicht-natürlicher Aminosäuren\*\*

Heidi Kaljunen, Stephan H. H. Schiefelbein, Daniela Stummer, Sandra Kozak, Rob Meijers, Guntram Christiansen\* und Andrea Rentmeister\*

**Abstract:** Viele biologisch aktive, bakterielle Sekundärmetabolite werden durch modulare Enzymkomplexe, die sogenannten nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen, hergestellt. Die Substratauswahl erfolgt durch eine Adenylierungsdomäne (A-Domäne), die die entsprechende Aminosäure mit hoher Selektivität aktiviert. Die kürzlich entdeckte A-Domäne der Anabaenopeptin-Synthetase aus *Planktothrix agardhii* (*ApnA A<sub>1</sub>*) ist in der Lage, zwei chemisch sehr unterschiedliche Aminosäuren (Arg und Tyr) umzusetzen. Wir zeigen hier anhand von Kristallstrukturen dieser A-Domäne, wie sich diese beiden Substrate an die Bindungstasche des Enzyms anpassen. Die Analyse der Bindungstasche führte zur Identifizierung von drei Resten, die für die Substraterkennung essentiell sind. Durch systematischen Austausch dieser Reste konnten wir Enzymvarianten generieren, die monospezifisch waren oder Tryptophan spezifisch aktivierten. Die nicht-natürliche Aminosäure 4-Azidophenylalanin konnte ebenfalls effizient durch eine A-Domänenvariante aktiviert werden, sodass die Produktion von diversifizierten nicht-ribosomalen Peptiden für die bioorthogonale Markierung in greifbare Nähe rückt.

**C**yanobakterien sind bekanntermaßen eine Quelle für bioaktive Sekundärmetabolite, insbesondere Peptide, die durch nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) produziert werden. NRPS sind multimodulare Enzyme aus sich wiederholenden Modulen, die in verschiedenartige katalytische Domänen unterteilt werden und das Substrat sequenziell zum finalen Peptid umsetzen.<sup>[1]</sup> Aufgrund dieser Modularität

konnten bereits rekombinante Peptidsynthetasen geschaffen und neuartige antimikrobielle Peptide produziert werden.<sup>[2]</sup>

Basierend auf der Kristallstruktur von PheA (eine Phenylalanin-adenylierende Domäne der Gramicidin-Synthetase 1) konnten zehn Reste in der aktiven Tasche identifiziert werden, die für die Substratspezifität und Katalyse von besonderer Bedeutung sind – der sogenannte Spezifitäts- oder „Stachelhaus“-Code.<sup>[3]</sup> Dieser Code ermöglicht die Vorhersage der Substratspezifität vieler Adenylierungsdomänen (A-Domänen) ohne vorherige biochemische Charakterisierung<sup>[4]</sup> und kann dazu verwendet werden, die Spezifität von A-Domänen durch Substitution gezielt zu verändern.<sup>[5]</sup> Substratpromiskuität von A-Domänen kann auch zu Familien strukturell verwandter Peptide führen, was bereits für bestimmte Cyanobakterien gezeigt wurde.<sup>[2b]</sup>

Wir haben kürzlich von der ersten A-Domäne der Anabaenopeptin-Synthetase aus dem *Planktothrix agardhii*-Stamm PCC7821 (*ApnA A<sub>1</sub>*) berichtet, die bispezifisch für die zwei chemisch sehr unterschiedlichen Aminosäuren Arginin (Arg) und Tyrosin (Tyr) ist (Abbildung 1).<sup>[6]</sup> Um diese Bispezifität zu verstehen, haben wir die Kristallstruktur des Proteins gelöst und die Ligandenbindung nach Tränken der apo-Kristalle mit Lösungen verschiedener Ligandenzusammensetzung bestätigt (Suppl. Tabelle 2 in den Hintergrundinformationen).

Die Kristallstrukturen machen deutlich, dass *ApnA A<sub>1</sub>* sehr ähnlich zur Familie der Adenylat-bildenden Enzyme gefaltet ist und zwei Subdomänen aufweist: eine größere N-terminale Domäne (Reste 1–408) und eine kleinere C-ter-

[\*] H. Kaljunen, S. Kozak, Dr. R. Meijers

European Molecular Biology Laboratory Hamburg Outstation  
c/o DESY, Notkestraße 85, 22603 Hamburg (Deutschland)

S. H. H. Schiefelbein, Dr. D. Stummer, Prof. Dr. A. Rentmeister  
Universität Münster, Fachbereich Chemie und Pharmazie  
Institut für Biochemie  
Wilhelm-Klemm-Straße 2, 48149 Münster (Deutschland)

E-Mail: a.rentmeister@uni-muenster.de

Dr. D. Stummer, Prof. Dr. A. Rentmeister  
Cells-in-Motion Cluster of Excellence (EXC 1003–CiM)  
Universität Münster (Deutschland)

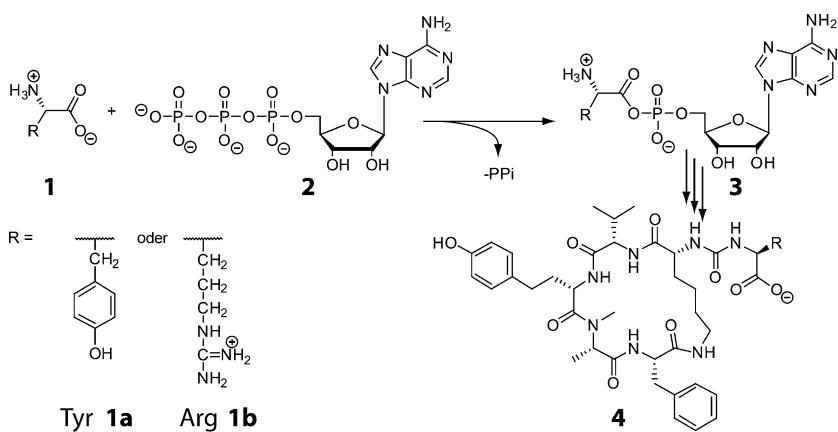
Dr. G. Christiansen  
Universität Innsbruck, Institut für Limnologie  
Mondseestraße 9, 5310 Mondsee (Österreich)

E-Mail: guntram.christiansen@uibk.ac.at

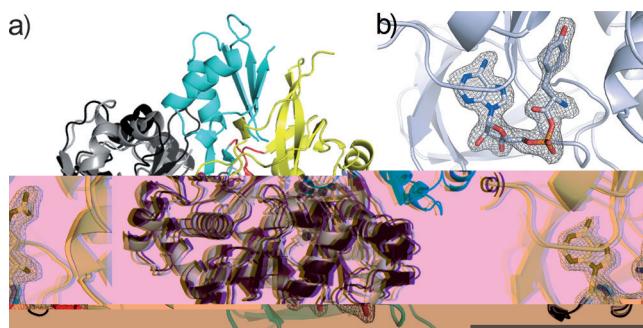
[\*\*] Wir danken Julia Sandberg-Meinhardt und Lucas Lang (beide Universität Hamburg) für hervorragende technische Unterstützung, Stephane Boivin und der Sample Preparation and Characterization Facility (SPC) für die Hilfe bei der Kristallisation und den Soaking-

Experimenten sowie Gleb Bourenkov, Thomas Schneider und Michele Cianci für die großzügige Unterstützung an den P13 und P14 EMBL-Beamlines des PETRA-Synchrotron am DESY in Hamburg. A.R. dankt der DFG für die Unterstützung im Rahmen eines Emmy Noether-Stipendiums (RE 2796/2-1) und dem Fonds der Chemischen Industrie für einen Sachkostenzuschuss. Diese Arbeit wurde durch Mittel aus dem Sieben Rahmenprogramm der Europäischen Gemeinschaft im Rahmen des Vertrages 227764 (P-Cube) und teilweise von der DFG und dem Exzellenzcluster Cells-in-Motion (EXC 1003–iM) an der Universität Münster unterstützt. S.H.H.S. dankt der IRTG 2027 für ein Promotionsstipendium. G.C. dankt dem österreichischen Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für finanzielle Unterstützung (P24070) und Rainer Kurmayer für allgemeine Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201503275> zu finden. Die Koordinaten und Strukturfaktoren wurden in der Protein Data Bank ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)) hinterlegt und können unter folgenden Codes aufgerufen werden: 4D4H, 4D4G, 4D4I, 4D57, 4D56.



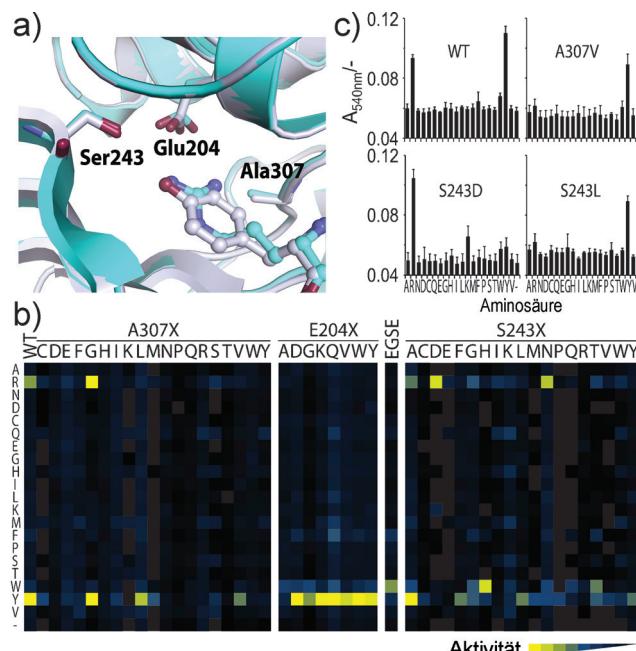
**Abbildung 1.** Aminosäureselektion und -aktivierung in ApnA A<sub>1</sub> aus bHTDI;C;L?KMT?PLKE-A-Domänen-katalysierte Aktivierung der Aminosäure ((1)) mit ATP (<) in NRPS führt zum Aminoacyladenylat (+), das durch weitere Domänen und Module zum Anabaenopeptin (#) umgesetzt wird. Die A-Domäne ist bispezifisch für Tyr ((T) und Arg ((R)), wodurch zwei verschiedene Anabaenopeptide (#) entstehen.



**Abbildung 2.** Kristallstruktur von ApnA A<sub>1</sub> aus bmTMT?PLKE7821 im Komplex mit einem adenylierten Aminosäuresubstrat. a) Überlagerung von ApnA A<sub>1</sub> und PheA (PDB-Code 1AMU).<sup>[3a]</sup> Die N- und C-terminalen Domänen sind für ApnA A<sub>1</sub> schwarz bzw. gelb und für PheA hellgrau bzw. hellblau gezeigt. Die Linker-Region ist rot markiert. Das aktive Zentrum mit gebundenem Liganden Tyr-AMP (Kugeln, Färbung nach Atomtyp mit Kohlenstoffatomen grau und Sauerstoffatomen rot) ist in einer Spalte zwischen den Domänen gelegen. b, c) Die Differenzelektronendichte für die Zwischenprodukte der Adenylierungsreaktion wurde durch Weglassen der Liganden aus dem Modell berechnet. Die Elektronendichtekarte des Tyrosyladenylat-Intermediats (b) konturiert bei 0.12 e Å<sup>-3</sup> ( $\sigma' = 2.0$ ) und des Arginyladenylats (c) bei 0.14 e Å<sup>-3</sup> ( $\sigma' = 3.0$ ). Die adenylierten Endprodukte sind hellgrau (Tyr) und hellblau (Arg) gezeigt.

minale Domäne (Reste 413–547), die über eine flexible, vier Reste lange Schleife verbunden sind (Abbildung 2a).<sup>[3a,7]</sup> Der Strukturvergleich mit PheA zeigt eine mittlere quadratische Abweichung (rmsd) von 1.24 Å für die C<sub>α</sub>-Atome der 375 Reste und verdeutlicht damit die große Ähnlichkeit in der Gesamttopologie. In der apo-Struktur von ApnA A<sub>1</sub> ist die C-terminale Subdomäne nicht in der Elektronendichte sichtbar. In Gegenwart von AMP-PNP (einem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogen) nimmt die C-terminale Domäne eine geordnete Struktur ein, sodass die Reste 409–445 und 451–492 in die Elektronendichtekarte eingepasst werden können. Im Vergleich zu PheA ist die C-terminale Domäne um etwa 140° in Richtung des N-Terminus gedreht, und das Enzym scheint im T-Zustand vorzuliegen.<sup>[3a,7]</sup>

Wenn ein apo-Kristall von ApnA A<sub>1</sub> mit 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP und einer gesättigten Lösung von L-Tyrosin getränkt wurde, erhielten wir die Kristallstruktur mit einem adenylierten L-Tyrosin (Tyr-AMP) in der aktiven Tasche (Abbildung 2b). Das ATP-Molekül ist hydrolysiert und man kann sehen, wie die Phosphatgruppen die Substratbindetasche durch einen Hohlraum verlassen, der von den Resten Phe199 und Phe419 gesäumt wird (Suppl. Abbildung 1). Die Tyr-AMP-Gruppe nimmt dabei die gleiche Position wie im AMP-PNP-Komplex ein. Wendet man ein analoges Protokoll zum Tränken mit 50 mM L-Arg an, gelangt man zur Kristallstruktur von ApnA A<sub>1</sub> im Komplex mit adenyliertem L-Arg (Arg-AMP) mit einer Auflösung von 2.0 Å (Abbildung 2c). Die Überlagerung der beiden Strukturen in Gegenwart der adenylierten Aminosäuren zeigte eine nahezu identische Ausrichtung des Proteingerüsts (rmsd 0.129 Å für 408 C<sub>α</sub>-Atome) und der gebundenen Aminosäure-AMP-Liganden, was darauf hindeutet, dass die beiden Aminosäuren in derselben Tasche des Proteins gebunden und aktiviert werden. Um die Substratkomplementarität zu erreichen, nimmt die Arg-Seitenkette eine Konformation an, die die Form des Tyr-Rings nachahmt (Abbildung 3a und Suppl. Abbildung 2a).



**Abbildung 3.** Identifizierung und Substitution von Positionen, die für die Spezifität relevant sind. a) Die Überlagerung der Kristallstrukturen in Gegenwart von Arg bzw. Tyr zeigt die entscheidenden Reste in der Substratbindetasche. b) Substratprofil getesteter Varianten. Die Farben zeigen Aktivitäten entsprechend der Legende. EGSE: E204G/S243E. c) Aktivitätstests ausgewählter Varianten mit unterschiedlichen Substratprofilen im Vergleich zum WT. (b) und (c) zeigen Mittelwerte von zwei unabhängigen Messungen in Doppelbestimmung.

Die Reste Glu204 und Ser243 scheinen eine Schlüsselrolle bei der Koordinierung der korrekten Ausrichtung der Substrate zu spielen. Die Interaktionsmuster dieser Reste unterscheiden sich in Abhängigkeit vom Aminosäuresubstrat und dessen Adenylierungszustand (Suppl. Abbildung 2b-d). Vor der Adenylierung bildet Glu204 eine einzelne Salzbrücke mit dem L-Arg-Substrat. Die Seitenkette von Glu204 wird durch einen benachbarten Rest (Tyr183), der eine Wasserstoffbrücke zwischen dem OE1-Atom von Glu204 und der OH-Gruppe von Tyr183 bildet, in Position gehalten. Bei Adenylierung passt die Seitenkette von Glu204 ihre Konformation an, um die jeweilige funktionelle Gruppe von Tyr bzw. Arg zu beherbergen. Dies führt dazu, dass eine einzelne Wasserstoffbrücke zur Hydroxygruppe des Tyr-Phenolring ausgebildet wird, während es zu einer zweizähnigen Wechselwirkung mit der Guanidinogruppe von Arg kommt. Von Bedeutung ist außerdem, dass ein Wassermolekül nach der Adenylierung eine Brücke zwischen den Substraten und Ser243 bildet. Darüber hinaus konnten wir eine unpolare Wechselwirkung zwischen Ala307 und dem Phenylring von Tyr bzw. dem aliphatischen Teil der Arg-Seitenkette (Abbildung 3a) beobachten. Als Teil des Spezifitätscodes besitzt Position 307 (331 in PheA) eine hohe Variabilität zwischen verschiedenen A-Domänen und ist wichtig für die Substratspezifität des Enzyms.<sup>[3b]</sup> Diese Wechselwirkungen bestimmen die Bispezifität der ApnA A<sub>1</sub>-Domäne aus PCC7821: Die funktionellen Gruppen der Seitenketten der Substrate interagieren mit den Seitenketten von Glu204 und Ser243, um die entgegengesetzten Ladungen aufnehmen zu können und um das Substrat in eine spezifische Konformation zu zwingen. Der Rest Ala307 schränkt die konformativen Freiheit der Substrat-Endgruppen innerhalb der Bindungstasche weiter ein.

In der Gattung *Planktothrix* existieren zwei verschiedene Gruppen von ApnA A<sub>1</sub>-Homologen, von denen eine monospezifisch für Arg ist. Ein Vergleich ihrer Spezifitätscodes zeigte nicht-konservative Substitutionen an zwei Positionen (243S/D und 307A/E), die somit für die unterschiedlichen Spezifitäten verantwortlich sein könnten (Suppl. Abbildung 9).<sup>[6]</sup> Wir konnten beobachten, dass bereits die Einzelsubstitution S243D zu einer Arg-monospezifischen Variante führt (Abbildung 3c). Die Variante hatte eine hohe Gesamtkaktivität und war auf Arg aktiver als der Wildtyp (WT). Die Variante A307E war hingegen nicht aktiv. Unsere Daten deuten darauf hin, dass die 243S/D-Substitution für die verschiedenen Tyr/Arg-Spezifitäten der beiden natürlich vorkommenden Gruppen von Homologen verantwortlich ist.

Bis heute konnte keine natürlich vorkommende Tyr-monospezifische ApnA A<sub>1</sub>-Variante identifiziert werden. Wir haben angenommen, dass eine Verstärkung der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Ala307 und dem aromatischen Ring des Tyr-Liganden dazu führt, dass Tyr gegenüber Arg bevorzugt wird. Fünfzehn von 19 Substitutionen an der Position Ala307 führten zu inaktiven Varianten (Abbildung 3b und Suppl. Abbildung 3), was bestätigt, dass Ala307 ein Schlüsselfaktor für die enzymatische Funktion ist. Substitutionen mit größeren aliphatischen Seitenketten (Val, Leu) führten jedoch zu einer Substratpräferenz für Tyr (Abbildung 3c und Suppl. Abbildung 3).

An Aminosäureposition 243 zeigt das Enzym eine bemerkenswert hohe Toleranz gegenüber Mutationen, wobei aus 12 von 19 Aminosäuresubstitutionen aktive Varianten resultierten (Abbildung 3b und Suppl. Abbildung 4). Substitution durch größere nicht-polare Seitenketten (wie Leu oder Met) reduzierte die Aktivität auf Arg beträchtlich, während Substitution durch kleinere unpolare Reste (wie Gly und Ala) die Bispezifität aufrechterhielt. Das deutet darauf hin, dass eine größere aliphatische Seitenkette an Position 243 nach wie vor mit dem aromatischen Ring des Tyr-Substrats interagieren kann, aber die Bindung von Arg behindert – vermutlich indem das Wassermolekül, das bei der Substratbindung eine Rolle spielt, verdrängt wird. Sind jedoch Wechselwirkungen mit dem aromatischen Ring möglich, erhält man Varianten, die die enzymatische Aktivität auf Tyr beibehalten. S243Y und S243F sind Tyr-monospezifisch, wahrscheinlich aufgrund von Stapelwechselwirkungen.

Die Bedeutung von Glu204 für die Bindung von Arg wird deutlich, wenn man das Substratprofil der Glu204-Varianten untersucht. Von den 8 getesteten Varianten haben 7 die Aktivität auf Arg verloren, aber die Aktivität auf Tyr behalten. Nur E204A war auf allen getesteten Substraten inaktiv (Abbildung 3b, Suppl. Abbildung 5). Diese Daten legen nahe, dass die Position 204 entscheidend für die Bispezifität ist, denn Glu204 scheint für die Aktivität auf Arg erforderlich zu sein. Glu204 scheint jedoch nicht essentiell für die Tyr-Aktivierung zu sein. Interessanterweise sind keine natürlich vorkommenden Tyr-monospezifischen Homologe von ApnA A<sub>1</sub> bekannt. Stattdessen ist Glu204 in der Natur vollständig konserviert (Suppl. Abbildungen 8 und 9).

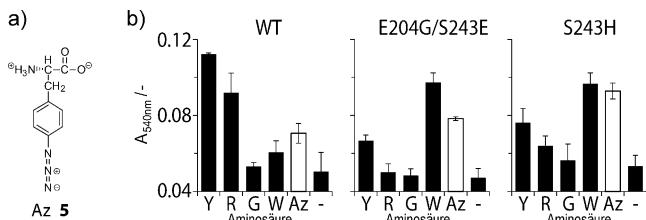
Uns ist aufgefallen, dass die Variante E204G neben mehreren weiteren Varianten (z.B. S243H, S243A, S243T) eine erhöhte Aktivität auf Tryptophan (Trp) aufwies. Wir vermuteten, dass die Kombination der größeren Substratbindungsstasche von E204G mit der Substitution S243E (zur Erhaltung der Nettoladung) die Aktivierung größerer Aminosäuresubstrate ermöglichen könnte. Tatsächlich wies die Doppelvariante E204G/S243E eine starke Substratpräferenz für Trp (die größte der 20 kanonischen Aminosäuren) mit einer Aktivität im Bereich des WT für seine bevorzugten Substrate auf (Suppl. Abbildung 5). Diese Beobachtung wurde mithilfe von kinetischen Messungen bestätigt, die eine 3000-fache Änderung der Substratspezifität hin zu Trp erkennen ließen. Ebenso zeigte die Doppelvariante eine höhere katalytische Effizienz auf Trp ( $k_{cat}/K_m' = 21 \text{ mm}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) als WT auf Tyr ( $k_{cat}/K_m' = 7 \text{ mm}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) (Tabelle 1 und Suppl. Tabelle 1).

Da NRPS in der Lage sind, neben den kanonischen Aminosäuren auch viele weitere Aminosäuren zu verwenden, haben wir versucht, Aktivität auf der nicht-natürlichen Aminosäure 4-Azidophenylalanin einzuführen (Az, Abbildung 4a). Da Az mit bioorthogonaler Klick-Chemie kompatibel ist,<sup>[8]</sup> könnte auf diese Weise langfristig die Herstellung neuartiger Anabaenopeptine **4** (Abbildung 1a) zur Markierung im Organismus gelingen. Die Aktivität der Variante E204G/S243E auf Az war geringer als für Trp, aber deutlich höher als für Tyr und Arg und erreichte die Aktivität des WT auf Arg mit einer katalytischen Effizienz von  $1.7 \text{ mm}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

**Tabelle 1:**  $h_m$ - und  $k_{cat}$ -Werte für ApnA A<sub>1</sub>-Domänen aus bmTMT?PLKK PCC7821 gemessen in der ATP/PP<sub>i</sub>-Austauschreaktion.<sup>[9]</sup>

Variante	Substr.	$h_m$ [mm]	$k_{cat}$ [min <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/h_m$ [mm <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ]	Spezi- fität <sup>[b]</sup>	Spezifitäts- wechsel <sup>[c]</sup>
WT	Tyr	0.044	0.3	7	1	–
WT	Arg	0.16	0.6	4	0.5	–
WT	Trp	1.6	0.3	0.18	0.03	–
WT	Az	1.1	0.9	0.8	0.1	–
EGSE <sup>[d]</sup>	Tyr	0.3	0.08	0.3	1	–
EGSE <sup>[d]</sup>	Arg	n.b.	n.b.	n.b.	–	–
EGSE <sup>[d]</sup>	Trp	0.07	1.5	21	80	3000
EGSE <sup>[d]</sup>	Az	0.36	0.6	1.7	6	60
S243H	Tyr	0.32	0.2	0.6	1	–
S243H	Arg	6.2	0.4	0.07	0.1	0.2
S243H	Trp	0.39	2.2	6	9	300
S243H	Az	0.6	4.5	7	12	100

[a] Es sind jeweils Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Experimenten gezeigt. n.b.: Nicht bestimmbar. [b] Spezifität bezeichnet die relative Spezifität für das gelistete Substrat in Bezug auf Tyrosin: ( $k_{cat}(\text{Substrat})/h_m(\text{Substrat})$ ) / ( $k_{cat}(\text{Tyr})/h_m(\text{Tyr})$ ). [c] Der Spezifitätswechsel zeigt Spezifität<sub>(Variante)</sub> / Spezifität<sub>(WT)</sub> für die angegebene Aminosäure. [d] E204G/S243E.



**Abbildung 4:** Aktivierung einer nicht-natürlichen Aminosäure durch ApnA A<sub>1</sub>-Varianten. a) 4-Azidophenylalanin Az (!). b) Aktivität des WT und ausgewählter Varianten auf ! im Vergleich zu Tyr, Arg, Gly und Trp. Dargestellt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung.

(im Vergleich zu 4 mm<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> für WT auf Arg) (Abbildung 4b, Tabelle 1).

Das Testen der vielversprechendsten Varianten auf Az ergab, dass auch S243A, S243H, E204G und S243T nennenswerte Aktivität auf dieser nicht-natürlichen Aminosäure aufwiesen (Abbildung 4 und Suppl. Abbildung 6). S243H zeigte eine Substratpräferenz für Az und Trp mit Aktivitäten und  $k_{cat}/K_m$ -Werten im Bereich des WT-Enzyms für seine bevorzugten Substrate. Unsere kinetischen Daten zeigen, dass die Einzelsubstitution S243H die Spezifität 100-fach in Richtung Az verschiebt und die resultierende Variante diese nicht-natürliche Aminosäure so effizient aktiviert wie WT Tyrosin ( $k_{cat}/K_m$  7 mm<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> für WT auf Tyr und S243H auf Az). Daher sollten sowohl E204G/S243E als auch S243H den Einbau von Trp und Az in neue Anabaenopeptine ermöglichen.

Zusammenfassend klärt unserer Studie auf, wie die bispezifische A-Domäne ApnA A<sub>1</sub> aus *P. agardhii* PCC7821 die Auswahl der scheinbar gegensätzlichen Substrate Arg und Tyr bewältigt. Die Strukturanalyse zeigte, dass der Aufbau der aktiven Tasche Arg in eine Tyr-ähnliche Konformation

zwingt, und kann dadurch die Bispezifität erklären. Bemerkenswert ist, dass zwei der drei Reste im aktiven Zentrum, die durch Strukturuntersuchungen als kritisch für die Bispezifität identifiziert wurden, auch Gegenstand natürlich vorkommender Punktmutationen sind (Ser243 und Ala307).<sup>[6]</sup> Durch Erweiterung der natürlich vorkommenden Variationen an diesen Positionen des Spezifitätscodes konnten zusätzliche Substratspezifitäten für Tyr und Trp erhalten werden. Unabhängig vom Biosyntheseweg beinhalten alle bislang charakterisierten Operons für Sekundärmetaboliten in Cyanobakterien ein ABC-Transporter-Homolog (ABC für ATP-bindende Kassette). Diese Proteine transportieren ihr entsprechendes Allocrit wahrscheinlich über eine Membran, wobei unbekannt ist, ob es sich um die Thylakoid- oder die Cytoplasmamembran handelt, was zu völlig verschiedenen Lokalisationen führen würde. Die Herstellung spezifischer Einzel- und Doppelvarianten, die die nicht-natürliche Aminosäure Az akzeptieren, sollte es ermöglichen, ApnA A<sub>1</sub> auch in seinem natürlichen Wirt genetisch umzuprogrammieren, um Anabaenopeptine innerhalb des produzierenden Organismus zu funktionalisieren. In Kombination mit selektiver bioorthogonaler Markierung wird dies helfen, potenzielle Transportwege innerhalb der Zelle zu identifizieren. Einblicke in die Lokalisierung von NRS-Peptiden könnten dabei helfen, die Frage der biologischen Funktion von Sekundärmetaboliten in Cyanobakterien zu beantworten.

^; KQL8É?; O Adenylierungsdomäne · Cyanobakterien · Kristallstrukturen · Nicht-ribosomale Peptidsynthetasen · Substratspezifität

**Zitierweise:** Angew. Chem. Int. Ed. 2015, 54, 8833–8836  
Angew. Chem. 2015, 127, 8957–8961

- [1] M. Stricker, A. Tanovic, M. A. Marahiel, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2010, 20, 234–240.
- [2] a) S. Doekel, M. F. C. L. Gal, J. Q. Gu, M. Chu, R. H. Baltz, P. Brian, *Microbiology* 2008, 154, 2872–2880; b) N. A. Magarvey, Z. Q. Beck, T. Golakoti, Y. S. Ding, U. Huber, T. K. Hemscheidt, D. Abelson, R. E. Moore, D. H. Sherman, *ACS Chem. Biol.* 2006, 1, 766–779; c) T. Stachelhaus, M. A. Marahiel, *J. Biol. Chem.* 1995, 270, 6163–6169.
- [3] a) E. Conti, T. Stachelhaus, M. A. Marahiel, P. Brick, *EMBO J.* 1997, 16, 4174–4183; b) T. Stachelhaus, H. D. Mootz, M. A. Marahiel, *Chem. Biol.* 1999, 6, 493–505.
- [4] M. Rottig, M. H. Medema, K. Blin, T. Weber, C. Rausch, O. Kohlbacher, *Nucleic Acids Res.* 2011, 39, W362–W367.
- [5] a) C. Y. Chen, I. Georgiev, A. C. Anderson, B. R. Donald, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 3764–3769; b) K. Eppelmann, T. Stachelhaus, M. A. Marahiel, *Biochemistry* 2002, 41, 9718–9726; c) B. W. Stevens, R. H. Lilien, I. Georgiev, B. R. Donald, A. C. Anderson, *Biochemistry* 2006, 45, 15495–15504; d) J. Thirlway, R. Lewis, L. Nunn, M. Al Nakeeb, M. Styles, A. W. Struck, C. P. Smith, J. Micklefield, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 7181–7184; *Angew. Chem.* 2012, 124, 7293–7296; e) B. Villiers, F. Hollfelder, *Chem. Biol.* 2011, 18, 1290–1299; f) H. Kries, R. Wachtel, A. Pabst, B. Wanner, D. Niquille, D. Hilvert, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53, 10105–10108; *Angew. Chem.* 2014, 126, 10269–10272.
- [6] G. Christiansen, B. Philmus, T. Hemscheidt, R. Kurmayr, *J. Bacteriol.* 2011, 193, 3822–3831.
- [7] H. Yonus, P. Neumann, S. Zimmermann, J. J. May, M. A. Marahiel, M. T. Stubbs, *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 32484–32491.

- [8] a) M. L. Tsao, F. Tian, P. G. Schultz, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2147–2149; b) V. Böhrsch, R. Serwa, P. Majkut, E. Krause, C. P. R. Hackenberger, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3176–3178; c) T. Mukai, M. Wakiyama, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Protein Sci.* **2010**, *19*, 440–448.
- [9] W. Gevers, H. Kleinkauf, F. Lipmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, *60*, 269–276.

Eingegangen am 10. April 2015  
Online veröffentlicht am 11. Juni 2015

---