

## Zusammenfassung

Aus der Natur abgeleitete Verbindungen liefern eine große strukturelle Vielfalt für die Entwicklung von Arzneimitteln. Mit der wachsenden Kenntnis über die biosynthetischen Ursprünge dieser Verbindungen kann die Verwendung von bioinformatischen Methoden in Verbindung mit modernen chemischen Analysen dazu beitragen, neue Strukturen in gezielten Screening-Experimenten aufzufindig zu machen. Diese beinhalten peptidische Bausteine nicht-proteinogenen Ursprungs, welche in einigen der pharmakologisch wertvollsten Naturstoffen vorkommen. Ein Beispiel ist der DNA-Gyrase-Inhibitor Albicidin, ein Metabolit aus *Xanthomonas* die eine große antibakterielle Wirksamkeit zeigt. Es stellt das erste Beispiel einer peptidischen Struktur dar, welche multiple *p*-Aminobenzoesäure-Bausteine enthält. Die Biosynthese dieser Verbindung geht auf eine nicht-ribosomale Megasyntetase zurück, welche mit einer Polyketid-Synthetase verbunden ist.

In der vorliegenden Arbeit stellen wir die strukturelle Charakterisierung zweier Sekundärmetabolite unterschiedlichen bakteriellen Ursprungs vor, welche sich durch das Vorhandensein nicht-proteinogener Aminosäuren auszeichnen. Motiviert durch den Fund von *p*-Aminobenzoesäure in Sekundärmetaboliten, haben wir einen verwandten Stamm des Albicidin-Produzenten untersucht. *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* ist ein Gram-negatives Phytopathogen und der Verursacher der Schwarzfleckenkrankheit von Mango-Pflanzen. Durch Fütterungsexperimente mit Deuterium-markierten Prekursorpeptiden und *Molekulares Networking* konnte eine neue Struktur nachgewiesen werden, in der *p*-Aminobenzoesäure-Einheiten mit einem Terpenoid-System verknüpft sind. Die Verbindung zeigt eine antiproliferative Aktivität gegenüber diverser menschlicher Krebszelllinien durch Induktion von Autophagie.

Die zweite strukturell charakterisierte Verbindung ist das Cyclodecapeptid Streptofactin A, produziert durch das im Boden vorkommende Gram-positive Bakterium *Streptomyces tendae* Tü 901/8c. Streptofactine wurden erstmal 1998 beschrieben und als Biotenside peptidischen Ursprungs charakterisiert. Ihre Strukturen wurden nicht vollständig aufgeklärt, was in erster Linie auf fehlende Informationen bezüglich ihrer Biosynthese zurückzuführen ist. Aminosäure-Analytik mit chiraler GC zeigte das Vorhandensein verschiedener nicht-proteinogener Aminosäuren in *D*-Konfiguration. Die Biosynthese-Gene konnten durch *de novo*-Gensequenzierungsdaten aus genomischer DNA und bioinformatischen Analysen identifiziert werden. Geninaktivierung und MALDI-Imaging-MS-Experimente bestätigten diese Annahmen. Eine Adenylierungsdomäne mit einem ungewöhnlichen nicht-ribosomalen Code wurde mit Substratspezifitätsassays und Tandem-MS- sowie zweidimensionalen NMR-Experimenten untersucht. So konnte ein neuartiges  $\alpha$ - $\beta$ -ungesättigtes Prolinderivat identifiziert werden. Basierend auf den neuen Erkenntnissen über die nicht-ribosomale Maschinerie und die identifizierten modifizierenden Enzyme, die das Biosynthese-Cluster bilden, wird eine chemische Struktur für das Streptofactin vorgeschlagen.

## Abstract

Naturally-derived compounds provide the largest structural diversity for drug development. With the growing knowledge on the biosynthetic origins of these molecules, the employment of bioinformatics together with advanced chemical analysis serve to reveal new structures when utilizing targeted screening. Among those targets are structural building units comprising non-proteinogenic amino acids, which are prevalent in some of the most pharmacologically important natural products. One example is the DNA gyrase inhibitor albicidin, produced by a *Xanthomonas* strain and having potent antibacterial activity. It represents the first example of a peptidic structure comprising multiple *p*-aminobenzoic acid units, previously foreign to secondary metabolites. The biosynthesis of this molecule is owed to a non-ribosomal megasynthetase working together with a polyketide synthase.

In this work we present the discovery and structure elucidation of two secondary metabolites from different bacteria containing non-proteinogenic amino acids in their structures. Motivated by the findings of *p*-aminobenzoic acid in secondary metabolites, we investigated a relative strain of the albicidin producer. *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae* is a Gram-negative phytopathogen which is the causative agent of black-spot disease in mango plants. Using deuterium-labelled precursor feeding and molecular network analysis, we discovered a new structure comprising a *p*-aminobenzoic acid bound to a terpenoid system. The compound showed to possess antiproliferative activity against a number of human cancerous cell lines by induction of autophagy.

The second structure elucidated was the cyclodecapeptide, streptofactin A, produced by the soil Gram-positive bacterium *Streptomyces tendae* Tü 901/8c. Streptofactins were first discovered in 1998 and characterized as biosurfactants of peptidic nature. Their structures were not fully assigned, partly attributed to the lack of knowledge on their biosynthetic roots at the time. Amino acids analysis by chiral GC-MS shows the prevalence of several non-proteinogenic amino acids of D-configurations in the isolated derivative. Guided by bioinformatic analyses from *de novo* gene sequencing data of the genomic DNA, we identified the designated biosynthesis genes. Gene inactivation combined with MALDI imaging MS experiments confirmed these findings. Substrate-specificity assays for one of the adenylation domains having an ambiguous non-ribosomal code, together with tandem MS and two-dimensional NMR analyses were utilized to assign the structure, revealing an unprecedented  $\alpha$ - $\beta$  unsaturated proline residue in streptofactin A. Based on the new insights into the non-ribosomal machinery and the identified modifying enzymes constituting the biosynthesis cluster, we present our interpretations for the events to bring about such an unfamiliar structural feature.