

## Zusammenfassung

Die steigende Zahl Antibiotika-resistenter Bakterien stellt eine immer größere Bedrohung für die Weltbevölkerung dar. Einen großen Schritt zu einem potenziellen neuen antibakteriellen Wirkstoff stellt das nicht-ribosomal synthetisierte Peptid Albicidin dar, welches aus dem pflanzenpathogenen Bakterium *Xanthomonas albilineans* isoliert wurde und als Angriffsziel die DNA-Gyrase von Gram-positiven und -negativen Bakterien hat.

Um die Entwicklung von Albicidin zu einem Antibiotikum zu unterstützen, wurden in dieser Arbeit zwei Resistenzmechanismen gegen Albicidin auf molekularer und mechanistischer Ebene charakterisiert. Zum einen wurden die Albicidin-bindenden Proteine AlbA (*Klebsiella oxytoca*) und AlbB (*Achromobacter xylosoxidans*) hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens und ihrer neutralisierenden Wirkung gegenüber Albicidin untersucht. Beide Proteine konnten erstmals der MerR-Transkriptionsregulator Proteinfamilie zugeordnet werden. Verschiedene bioinformatische und biophysikalische Messungen mit CD- NMR- und Fluoreszenz-Spektroskopie, verwiesen auf die ungewöhnliche Wiederholungsstruktur der Ligandenbindungsdomäne und verdeutlichen die hohe Bindungsaffinität, sowie ein kooperatives Bindungsverhalten zu Albicidin. Mit Hilfe einer Vielzahl von Albicidin-Derivaten, konnte die Promiskuität der Proteine untersucht werden und erste Ansätze für eine Überwindung des Resistenzmechanismus ausgemacht werden. Mittels Proteinkristallographie konnte die dreidimensionale Struktur des AlbA-Albicidin-Komplexes gelöst werden und die Eigenschaft als Transkriptionsregulatoren von AlbA und AlbB durch einen EMSA-Assay untersucht werden.

Ein weiterer Resistenzmechanismus basiert auf der enzymatischen Spaltung durch die Endopeptidase AlbD (*Pantoea dispersa*). Diese Arbeit zeigt erstmalig einen Ansatz, um Albicidin vor der enzymatisch-hydrolytischen Spaltung zu schützen. Zusätzliche enzymkinetische Daten, die mittels eines LC/MS basierten Spaltungsassay erhalten wurden, beschreiben das katalytische Verhalten von AlbD gegenüber Albicidin und werden in Zukunft als Grundlage für den Vergleich zu anderen Albicidin-Derivaten dienen.

## Abstract

Increasing numbers of antibiotic-resistant bacteria provide a growing threat to the world population. A promising step towards a new active antibacterial compound was made with the discovery of the non-ribosomal synthesized pentapeptide albicidin, which was originally isolated from the plant pathogen *Xanthomonas albilineans* and which inhibits the DNA-gyrase of Gram-positive and -negative bacteria.

In order to support the development of albicidin towards a drug, this work focuses on the molecular and mechanistic characterization of two different resistance strategies directed against albicidin. The first project deals with the characterization of the albicidin-binding proteins AlbA (*Klebsiella oxytoca*) and AlbB (*Achromobacter xylosoxidans*) regarding their binding behavior and neutralizing efficacy against albicidin. For the first time, both proteins could be assigned to the family of MerR-transcriptional regulator proteins. By means of bioinformatic analysis and biophysical measurements with CD- NMR- and fluorescence-spectroscopy, the unusual tandem-repeat arrangement of the AlbA/AlbB ligand binding domains could be elucidated and demonstrate the cooperative binding behavior as well as the strong binding affinity to albicidin. Testing of the large number of albicidin derivatives, helped to reveal the promiscuous binding behavior of AlbA and AlbB and provided first attempts to by-pass the resistance mechanisms. An important step could be obtained by the structure elucidation of the AlbA-albicidin complex with protein crystallization trials and the function as transcriptional regulators of AlbA and AlbB was identified with an established EMSA assay.

The second investigated resistance mechanism in this work is based on the enzymatic cleavage of albicidin by the serine endopeptidase AlbD (*Pantoea dispersa*). For the first time an approach could be identified to avoid the enzymatic-hydrolysis of albicidin. Furthermore, enzyme kinetic data, obtained from an LC/MS based cleavage assay, describe the catalytic mechanism of AlbD towards albicidin and will serve as basis for the comparison to other albicidin derivatives in the future.