

"Strukturelle Untersuchungen  
der Wechselwirkungen zwischen DltA und DltC"

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium*  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von

Herrn Stephan Zimmermann

geb. am: 20.04.1982 in: Halle/Saale

Gutachter

1. Prof. Dr. Milton T. Stubbs
2. Prof. Dr. J. Balbach
3. Prof. Dr. H. D. Mootz

Halle (Saale), 24.11.2011



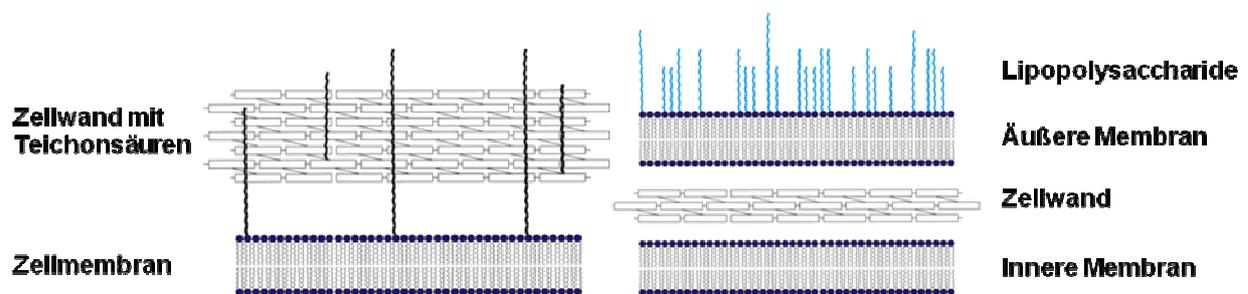
|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| <b>1.</b> | <b>EINLEITUNG .....</b>  | <b>5</b>  |
| 1.1.      | Das <i>dlt</i> -Operon gram-positiver Bakterien .....  | 5         |
| 1.2.      | Nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) .....   | 9         |
| 1.3.      | Adenylierungsdomänen und DltA .....  | 14        |
| 1.4.      | Peptidyl-Carrier-Proteine und DltC .....   | 21        |
| 1.5.      | Ziele dieser Arbeit.....   | 25        |
| <b>2.</b> | <b>MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>  | <b>27</b> |
| 2.1.      | Geräte, Materialien und Chemikalien .....  | 27        |
| 2.2.      | Organismen, Plasmide, Oligonukleotide und Enzyme .....   | 31        |
| 2.3.      | Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden.....  | 33        |
| 2.3.1.    | Agarose-Gelelektrophorese .....  | 33        |
| 2.3.2.    | Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....  | 34        |
| 2.3.3.    | Konzentrationsbestimmung von nukleinsäurehaltigen Lösungen .....   | 36        |
| 2.3.4.    | Reinigung von DNA .....  | 36        |
| 2.3.5.    | Enzymatischer Restriktionsverdau von Nukleinsäuren.....  | 36        |
| 2.3.6.    | Ligation von Nukleinsäuren .....   | 37        |
| 2.3.7.    | Herstellung chemokompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen .....  | 37        |
| 2.3.8.    | Transformation von Nukleinsäuren in kompetente <i>Escherichia coli</i> Zellen .....                        | 38        |
| 2.3.9.    | Vervielfältigung von Plasmiden .....   | 38        |
| 2.3.10.   | Sequenzierung von Plasmiden.....   | 39        |
| 2.3.11.   | Rekombinante Produktion von Proteinen in transformierten <i>Escherichia coli</i> Zellen in LB-Medium ..... | 39        |
| 2.3.12.   | Rekombinante Produktion von Proteinen in transformierten <i>Escherichia coli</i> Zellen in M9-Medium ..... | 39        |
| 2.3.13.   | Zellaufschluss von <i>E. coli</i> Zellen .....   | 40        |
| 2.4.      | Biochemische Methoden.....   | 41        |
| 2.4.1.    | Diskontinuierliche Polyacrylamid Gelelektrophorese.....  | 41        |
| 2.4.2.    | TRIS/TRICINE PAGE .....  | 42        |
| 2.4.3.    | Proteindetektion mittels Immunoblotting .....  | 42        |
| 2.4.4.    | Affinitätschromatographie .....  | 43        |
| 2.4.5.    | Größenausschlusschromatographie ( <i>size exclusion chromatography</i> SEC).....                           | 44        |
| 2.4.6.    | Konzentrationserhöhung von Proteinlösungen .....   | 44        |
| 2.4.7.    | Proteinkonzentrationsbestimmung .....  | 45        |
| 2.4.8.    | Aktivitätsmessung von DltA .....   | 46        |
| 2.4.9.    | Kristallisation von Proteinen.....   | 46        |
| 2.5.      | Biophysikalische Methoden .....  | 47        |
| 2.5.1.    | Röntgenkristallographie .....  | 47        |
| 2.5.2.    | NMR-Spektroskopie.....   | 48        |
| <b>3.</b> | <b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>   | <b>49</b> |
| 3.1.      | DltA .....   | 49        |
| 3.1.1.    | Proteinexpression und –reinigung von Wildtyp DltA .....  | 49        |
| 3.1.2.    | Konstruktion, Expression und Reinigung der DltA-Mutanten .....   | 50        |
| 3.1.3.    | Aktivitätstests der DltA-Varianten anhand des <sup>32</sup> P-ATP-PP <sub>i</sub> -Austausch.....          | 51        |
| 3.2.      | DltC .....   | 53        |
| 3.2.1.    | Expression und Reinigung von DltC in der Wildtyp-Form und der S36A-Mutante.....                            | 53        |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.2.2. | Kristallisation und Strukturlösung von DltC S36A .....               | 54 |
| 3.2.3. | Kristallisation und Strukturlösungen von DltC Wildtyp.....           | 60 |
| 3.2.4. | NMR-Messungen mit DltC_wt und DltC S36A .....                        | 67 |
| 3.3.   | Die Interaktion von DltA mit DltC.....                               | 71 |
| 3.3.1. | NMR-Titrationsen von DltA zu DltC .....                              | 71 |
| 3.3.2. | Kristallisation und Strukturaufklärung des DltC-DltA Komplexes ..... | 75 |
| 4.     | ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....                                    | 82 |
| 5.     | LITERATUR.....   | 84 |
| 6.     | ANHANG .....   | 96 |

# 1. Einleitung

## 1.1. Das *dlt*-Operon gram-positiver Bakterien

Eine der gebräuchlichsten Klassifikationen von Bakterien ist die Gram-Färbung. Der Unterschied zwischen gram-positiven und gram-negativen Bakterien beruht dabei auf den unterschiedlichen Zellhüllen (Abbildung 1). Gram-positive Bakterien besitzen keine äußere Zellmembran, und durch die Ethanolbehandlung wird die dicke Zellwand dehydriert, so dass der Farbstoff nicht ausgewaschen werden kann.

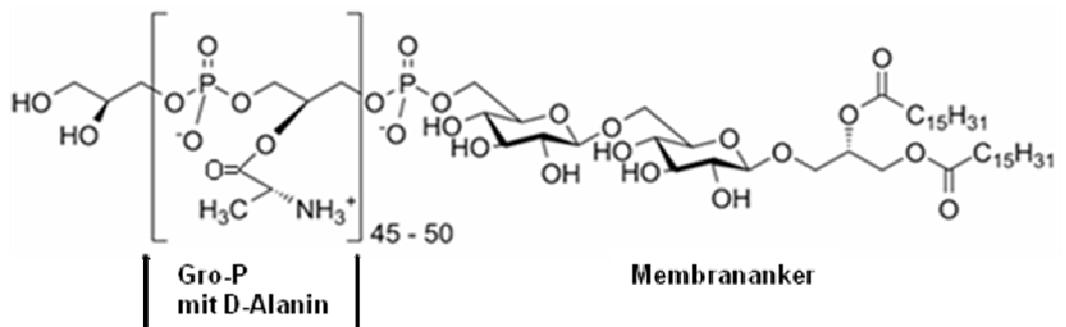


**Abbildung 1:** Die Zellhüllen von gram-positiven (links) und gram-negativen (rechts) Bakterien. Unten entspricht jeweils dem Zellplasma und oben der Umgebung der Zelle. Lipopolysaccharide und Teichonsäuren sind exemplarisch als Zick-Zack-Linien dargestellt, die auswärts ragen.

Bei gram-negativen Bakterien ist die dünne Zellwand von einer zweiten, äußeren Membran umgeben, die mit Ethanol entfernt werden kann. Dadurch wird der Farbstoffkomplex in der Zellwand zugänglich für das Lösungsmittel und ebenfalls entfernt. Die äußere Membranschicht der gram-negativen Bakterien stellt den Kontakt zur Umwelt dar. In ihr sind zum Beispiel die artspezifischen Lipopolysaccharide (LPS) verankert, die das menschliche Immunsystem nutzt, um Krankheitserreger zu erkennen.

Für gram-positive Bakterien ist die Zellwand der direkte Kontakt zur Umgebung. Da die Zellwand laufend den sich verändernden Bedingungen der Umwelt angepasst werden muss, besitzen gram-positive Bakterien einige Möglichkeiten, die chemischen Eigenschaften der Zellhülle zu verändern. Eine dieser Möglichkeiten sind die Teichonsäuren (*teichoic acids*, TAs), Polymerketten, verankert in der Zellmembran (*lipoteichoic acids*, LTAs) oder Zellwand (*wall-teichoic acids*, WTAs), die in oder durch die komplette Zellwand reichen können (Lu *et*

*al.*, 2009). In den meisten Fällen ist die monomere Untereinheit der Teichonsäuren 3-Phosphoglycerin, wie in Abbildung 2 dargestellt. Die Polymerisation erfolgt dabei über Phosphodiesterbindungen der beiden endständigen Sauerstoffatome. Dadurch ist die mittlere Hydroxylgruppe frei, was der Teichonsäure eine negative Ladung gibt. Da in der Zellwand eine Vielzahl von Teichonsäuren vorhanden sind, ist die Zellwand als Ganzes auch negativ geladen (Matias *et al.*, 2008; Neuhaus *et al.*, 2003).



**Abbildung 2:** Der Aufbau von Teichonsäuren am Beispiel von LTA. Teichonsäuren sind ein Polymer aus 3-Phosphoglycerin (Gro-P), hier mit D-Alanin als Modifikation der freien Hydroxylgruppe und Fettsäuren als Membrananker.

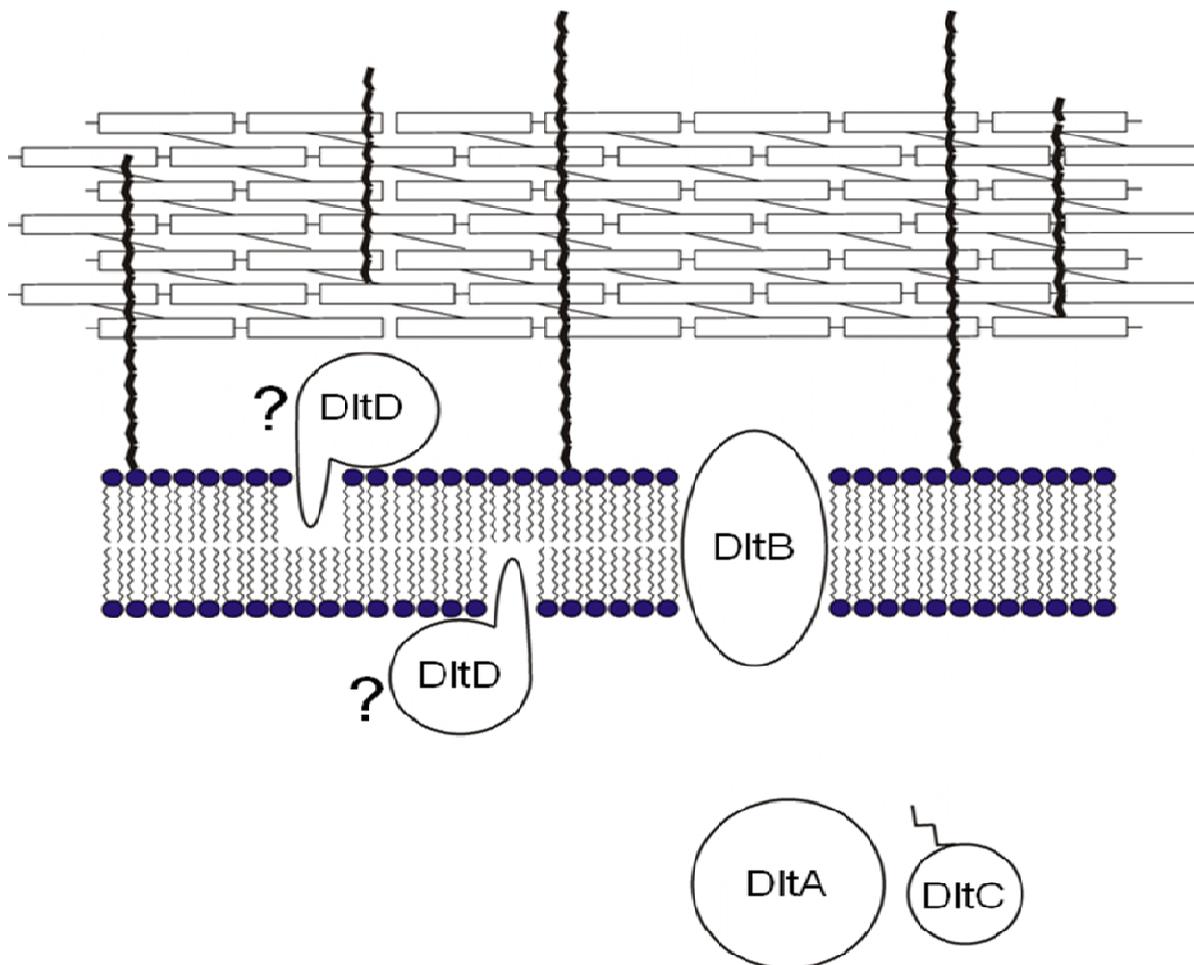
Häufig wird die ungebundene Hydroxylgruppe mit Substituenten verknüpft um die Ladung zu beeinflussen. Diese Modifikation erlaubt eine Anpassung der elektrochemischen Eigenschaften der Zellwand. Zu den Substituenten zählen unter anderem Hexosen und bestimmte Aminosäuren. Eine besondere Rolle fällt dabei dem D-Alanin (D-Ala) zu, der bei weitem häufigsten Modifizierung der Teichonsäuren.

In allen gram-positiven Bakterien, die bisher untersucht wurden, konnten vier Proteine, die alle vom *dlt*-Operon codiert werden, als verantwortlich für die D-Alanylierung von Teichonsäuren identifiziert werden. Da die Namen der Gene und Proteine sich bei verschiedenen Organismen unterscheiden, werden im Folgenden die Bezeichnungen aus *Bacillus subtilis* verwendet. Die vier Gene werden als *dltA*, *dtB*, *dltC* und *dltD* bezeichnet (Abbildung 3). Das *dlt*-Operon beinhaltet außerdem noch das Gen *dltE*, für das allerdings gezeigt wurde, dass eine Inaktivierung keinen Effekt auf die Alanylierung hat (Perego *et al.*, 1995).



**Abbildung 3:** Das *dlt*-Operon im Genom von *Bacillus subtilis*.

Eine Rolle der *dlt*-Gene für die Alanylierung von Teichonsäuren wurde erstmals zwei Jahre vor der kompletten Sequenzierung des Genoms von *Bacillus subtilis* (Kunst et al., 1997), von Perego *et al.*, 1995 beschrieben. Basierend auf den Gensequenzen konnten die entsprechenden Proteine DltA, DltB, DltC und DltD abgeleitet werden, die in den darauf folgenden Jahren biochemisch identifiziert wurden (Debabov *et al.*, 1996; Perego *et al.*, 1995). Abbildung 4 zeigt schematisch die Lokalisation der Dlt-Proteine in der Zelle.



**Abbildung 4:** Die Lokalisation der Dlt-Proteine in der Zelle. DltA und DltC sind lösliche Proteine im Zellplasma, während DltB und DltD in der Zellmembran verankert sind. Die genaue Lokalisation von DltD ist bisher unbekannt.

Mutanten von gram-positiven Bakterien, bei denen eines oder mehrere der Dlt-Proteine fehlen oder defekt sind, zeigen Abweichungen im Phänotyp und in der Überlebensfähigkeit. Da die Modifizierungen der Teichonsäuren für gram-positive Bakterien entscheidend sind um die Ladung der Zelloberfläche zu beeinflussen, resultiert eine Unterbrechung dieses Mechanismus in einer verringerten Fähigkeit mit bestimmten Umweltbedingungen umzugehen. So ist die pH-Toleranz verringert (Boyd *et al.*, 2000; Velez *et al.*, 2007), die Autolyserate der Zellen erhöht (Velez *et al.*, 2007; Wecke *et al.*, 1997) und die Bakterien zeigen ein erhöhtes Längenwachstum sowie fehlerhafte Septenbildung (Velez *et al.*, 2007). Des Weiteren sind Bakterien mit defekter D-Alanylierung der Lipoteichonsäuren weniger virulent, da sie sich schlechter an Wirtszellen anhaften können (Cox *et al.*, 2009; Fittipaldi *et al.*, 2008) und die Anfälligkeit für bestimmte antimikrobielle Substanzen (kationische antimikrobielle Peptide CAMPs, Nisin, Vancomycin, Methicillin, Drosomycin) erhöht ist (Fittipaldi *et al.*, 2008; Kramer *et al.*, 2008; May *et al.*, 2005; Peschel *et al.*, 1999; Peschel *et al.*, 2000; Tabuchi *et al.*, 2010; Velez *et al.*, 2007; Wecke *et al.*, 1997). Weiterhin konnte in *Drosophila melanogaster* gezeigt werden, dass D-alanylierte WTAs die Produktion des antimikrobiellen Peptides Drosomycin hemmen (Shiratsuchi *et al.*, 2010; Tabuchi *et al.*, 2010).

DltA und DltC sind beides lösliche Proteine, die im Zellplasma vorkommen (Perego *et al.*, 1995; Debabov *et al.*, 1996; May *et al.*, 2005; Neuhaus *et al.*, 1996; Yonus *et al.*, 2008). DltA aktiviert D-Alanin unter Verwendung von ATP und überträgt es auf DltC (Heaton *et al.*, 1992; Heaton *et al.*, 1994; May *et al.*, 2005; Yonus *et al.*, 2008). Daraufhin wird entweder mit D-Ala beladenes DltC oder D-Ala durch die Zellmembran transportiert, wo D-Ala an die Teichonsäure gebunden werden kann. Welcher der beiden Mechanismen *in vivo* vorkommt, konnte bisher nicht endgültig geklärt werden. Auf Struktur und Funktion von DltA und DltC, die beide große Ähnlichkeiten zu Domänen der Nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) zeigen, wird später noch genauer eingegangen (Abschnitt 1.3, Abschnitt 1.4).

Im Gegensatz zu DltA und DltC sind die Eigenschaften von DltB und DltD größtenteils ungeklärt. Sequenzuntersuchungen sagen voraus, dass DltB ein integrales Membranprotein mit mindestens 12 Helices ist (Debabov *et al.*, 1996; Neuhaus *et al.*, 1996; Perego *et al.*, 1995). Aufgrund dieser Vorhersage wird angenommen, dass DltB ein Transporter ist, der D-Ala oder mit D-Ala beladenes DltC durch die Zellmembran zur Zellwand befördert.

DltD konnte nur aus der Membranfraktion von Zellen isoliert werden und ist für die D-Alanylierung von Teichonsäuren essentiell (Debabov *et al.*, 2000). Des Weiteren besitzt DltD N-terminal zwanzig Aminosäuren mit hoher Hydrophobizität, die vermutlich in die

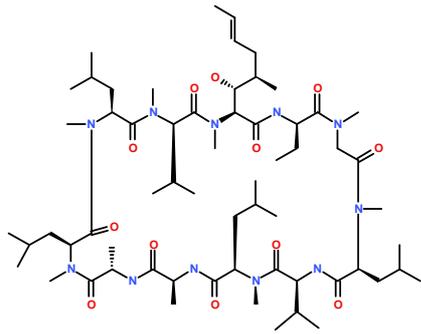
Zellmembran inserieren (Perego *et al.*, 1995). Nicht endgültig geklärt ist, ob DltD auf der zytoplasmatischen Seite oder der extrazellulären Seite der Zellmembran vorkommt (Abbildung 4). Möglicherweise katalysiert es die Übertragung von D-Alanin von D-Ala-DltC auf die Teichonsäure (May *et al.*, 2005; Neuhaus *et al.*, 2003). Allerdings gibt es auch Hypothesen, die besagen, dass die Übertragung ohne Hilfe anderer Proteine stattfindet (Kiriukhin *et al.*, 2001; Volkman *et al.*, 2001). DltD könnte auch dazu dienen, falsch beladenes DltC oder versehentlich mit D-Ala beladene Acyl-Carrier-Proteine (ACPs) wieder zu entladen (Debabov *et al.*, 2000).

Trotz der essentiellen Funktion der Proteine des *dlt*-Operons und ihrer Bedeutung für die gram-positiven Bakterien, als auch ihrer möglichen medizinischen Anwendung sind diese Proteine bisher relativ wenig untersucht worden.

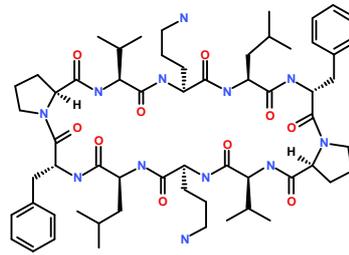
## **1.2. Nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS)**

Nichtribosomale Peptide sind eine sehr vielfältige Gruppe von Substanzen. Dazu gehören zum Beispiel verschiedene Antibiotika wie Vancomycin und die Actinomycine oder Cytostatika wie Bleomycin und die Epithilone. Unabhängig von der medizinischen Verwendung haben nichtribosomale Peptide aber auch vielfältige andere Wirkungen. Sie dienen zum Beispiel als Siderophoren, Toxine oder Pigmente. Wie der Name schon sagt, werden nichtribosomale Peptide, die in der Regel eine Länge von bis zu 22 Aminosäuren haben, nicht von den Ribosomen synthetisiert. Die nichtribosomalen Peptide können dadurch nicht-proteinogene Aminosäuren wie zum Beispiel D-Aminosäuren, methylierte oder glykosilierte Aminosäuren oder Hydroxycarbonsäuren enthalten (Donadio *et al.*, 2007; Finking *et al.*, 2004a; Marahiel *et al.*, 1997; Schwarzer *et al.*, 2003; Sieber *et al.*, 2003).

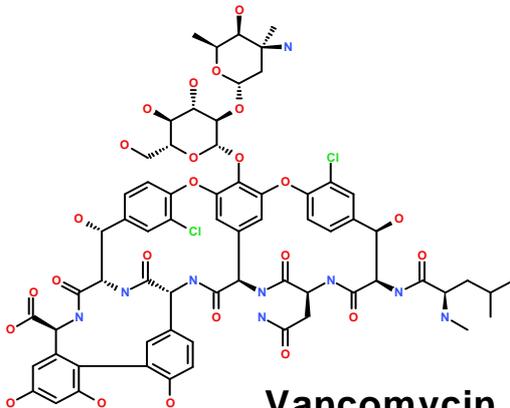
Für jedes nichtribosomale Peptid gibt es einen Proteinkomplex, der auf die Produktion dieses Peptides spezialisiert ist. Diese Proteinkomplexe, genannt Nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS), sind eine große, vielfältige Klasse von Proteinen aus Bakterien und Pilzen (Challis *et al.*, 2004; Donadio *et al.*, 2007; Lautru *et al.*, 2004; Schwarzer *et al.*, 2003; Sieber *et al.*, 2003; Sieber *et al.*, 2005; Strieker *et al.*, 2010; Walsh 2004; Weber *et al.*, 2001). Sie sind in der Lage die extrem vielseitigen und teilweise auch medizinisch einsetzbaren Nichtribosomale Peptide zu synthetisieren, von denen einige in Abbildung 5 gezeigt sind.



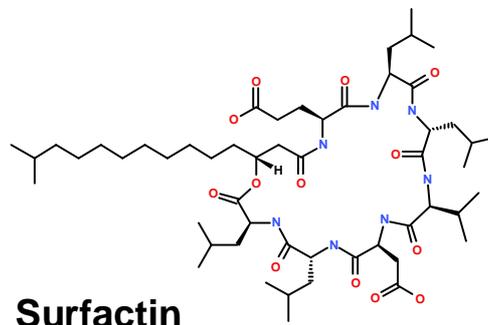
**Cyclosporin A**



**Gramicidin S**



**Vancomycin**

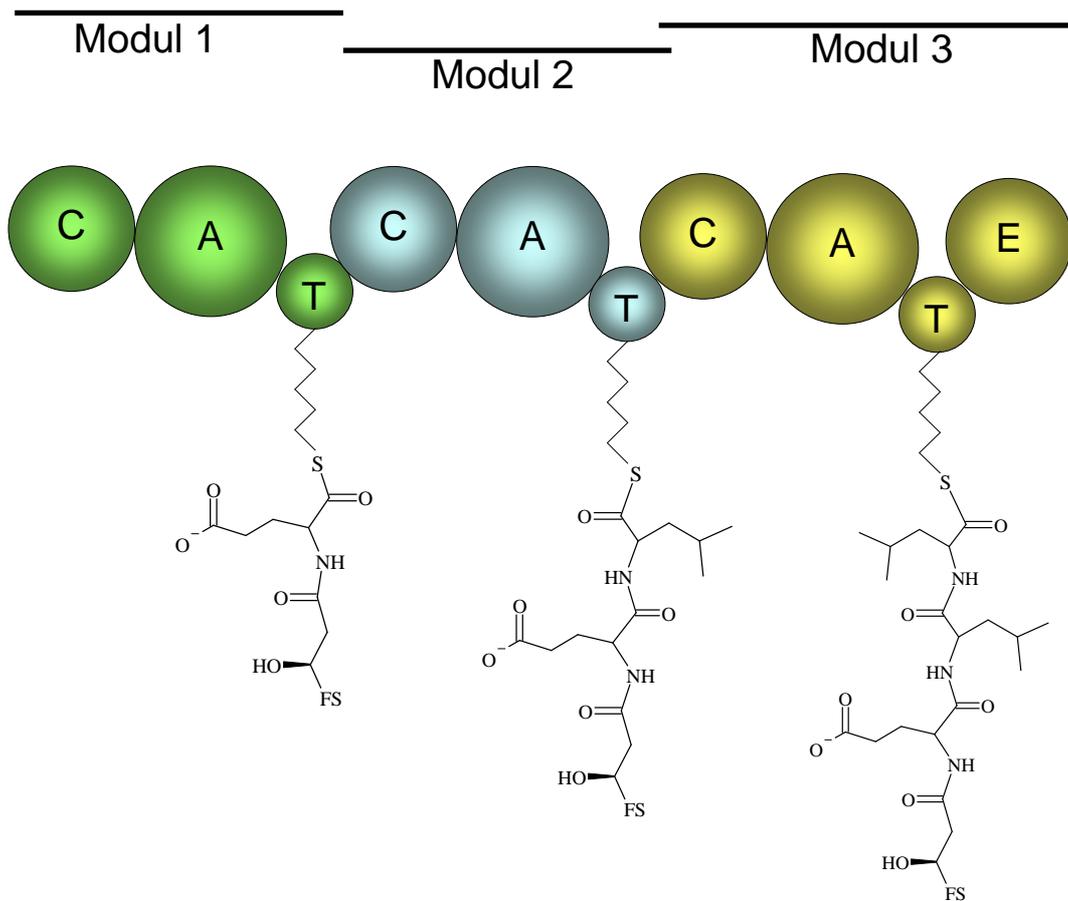


**Surfactin**

**Abbildung 5:** Einige Beispiele für nichtribosomale Peptide. Cyclosporin A ist ein Ring aus 11 Aminosäuren, unter anderem Aminobuttersäure und Methylthreonin. Es hemmt die menschliche Immunabwehr. Gramicidin S besteht aus einem Dekapeptid, das unter anderem Ornithin und D-Phenylalanin enthält. Gramicidin S wird als Antibiotika eingesetzt. Vancomycin wird ebenfalls als Antibiotika verwendet. Es ist mehrfach zyklisiert und besteht aus sieben, teilweise modifizierten Aminosäuren, wie zum Beispiel Hydroxychlorotyrosin und Hydroxyphenylglycin. Surfactin besitzt eine Ring aus sieben Aminosäuren, zwei davon D-Aminosäuren, sowie eine Fettsäure. Surfactin ist ein starkes Tensid und wird ebenfalls als Antibiotika verwendet.

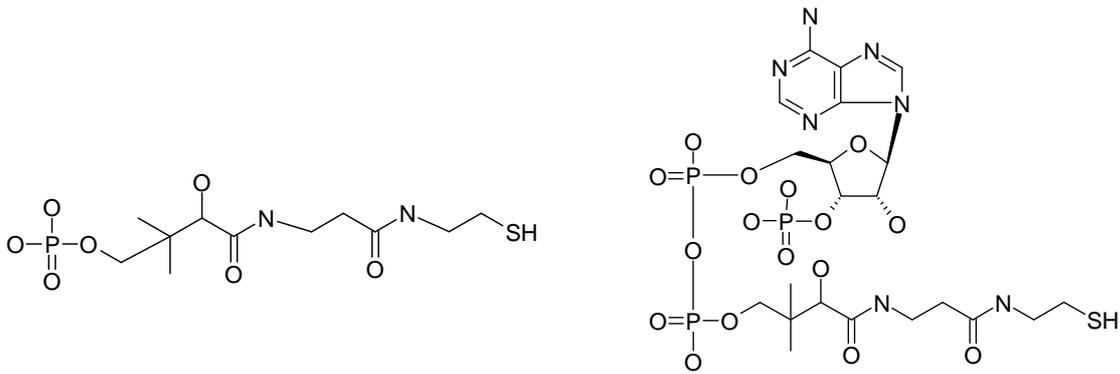
Die Nichtribosomalen Peptidsynthetasen bestehen aus einzelnen Modulen, von denen jedes für die Verarbeitung einer bestimmten Aminosäure zuständig ist. In der Regel entspricht die Anzahl der Module der Anzahl der Aminosäuren im fertigen Produkt. Jedes Modul wiederum besteht aus mehreren Domänen. Diese Domänen können kovalent verbunden als eine Polypeptidkette oder als einzelne Proteine vorkommen.

Die drei wichtigsten Domänen eines Moduls einer NRPS sind die Adenylierungsdomäne (A-Domäne), die Transporterdomäne (T-Domäne) und die Kondensationsdomäne (C-Domäne). Jede bekannte NRPS enthält jede dieser Domänen mindestens einmal. In Abbildung 6 ist als Beispiel der Aufbau von SrfA, der ersten Untereinheit des Multienzym Komplexes Surfactin-Synthetase dargestellt.



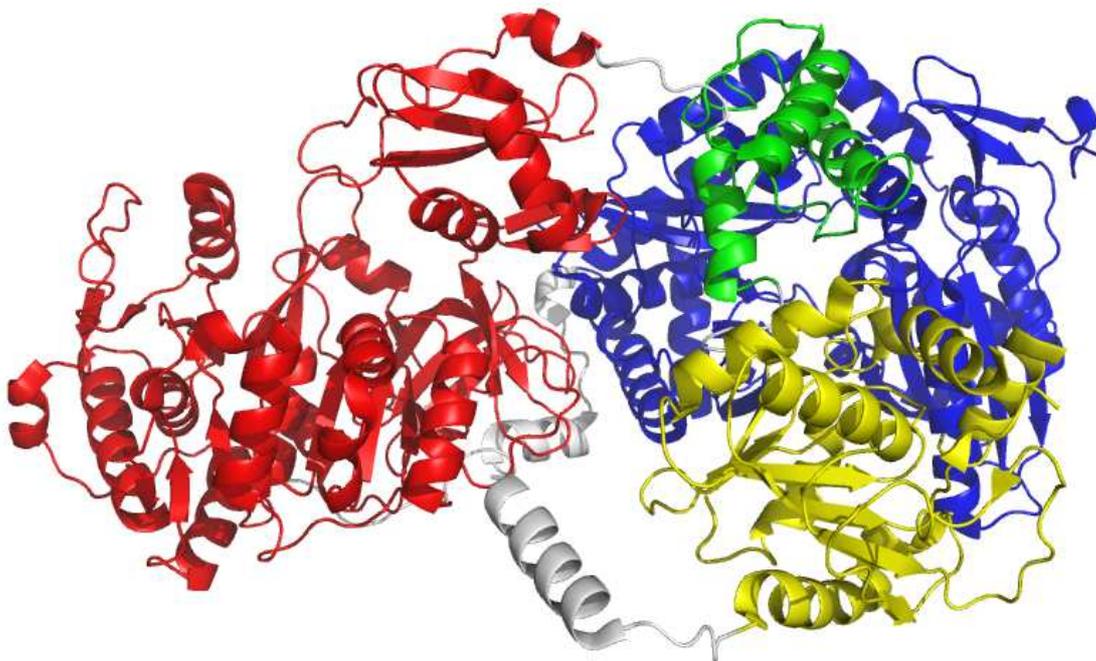
**Abbildung 6:** Der modulare Aufbau von SrfA (nach Sieber *et al.*, 2003), A: Adenylierungsdomäne, C: Kondensationsdomäne, T: Transporterdomäne, E: Epimerisierungsdomäne, FS: Fettsäure. An die T-Domäne ist jeweils die wachsende Peptidkette gebunden. Jedes Modul verlängert diese Kette um eine Aminosäure.

Die A-Domäne katalysiert den ersten Schritt der Synthese von nichtribosomale Peptiden, indem sie, unter Verwendung von ATP, das Aminosäuresubstrat durch Adenylierung aktiviert und es dann auf die T-Domäne überträgt (Abbildung 9). Da die A-Domänen als erstes mit dem niedermolekularen Substrat in Kontakt kommen, fällt ihnen die Aufgabe der Substratselektion zu. Die T-Domäne, auch Peptidyl-Carrier-Protein (PCP) genannt, besitzt den Kofaktor 4'-Phosphopantethein (PPant), an dessen endständiger Thiol-Gruppe die Aminosäure gebunden wird (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Links Phosphopantethein, der Kofaktor von DltCs sowie PCPs und ACPs. Rechts Coenzym A, das zur Modifikation von Proteinen mit PPant genutzt wird.

Eine C-Domäne katalysiert dann die Bildung einer Peptidbindung zwischen den aktivierten Aminosäuren von zwei verschiedenen PCPs. Diese Abfolge A-Domäne, PCP, C-Domäne erfolgt für jede weitere beteiligte Aminosäure mit einem auf diese Aminosäure spezialisierten Modul. Die erste Struktur eines kompletten NRPS-Moduls, des 3. Moduls von SrfA, konnte 2008 gelöst werden (Tanovic *et al.*, 2008) und ist in Abbildung 8 gezeigt.



**Abbildung 8:** Kristallstruktur des 3. Moduls von SrfA (PDB-Code 2VSQ, Tanovic *et al.*, 2008). Zu sehen sind die A-Domäne (rot), die C-Domäne (blau), das PCP (grün) sowie die Thioesterase-Domäne (gelb), die das fertige Substrat vom PCP trennt. Bereiche, die die Domänen verbinden sind weiß.

NRPS wurden bisher nur in Bakterien und Pilzen gefunden. In Pflanzen und Tieren konnten keine Proteinkomplexe gefunden werden, die der klassischen Definition von NRPS entsprechen. Allerdings existieren sowohl in Pflanzen als auch in Tieren Proteinkomplexe, die eine sehr ähnliche Funktion erfüllen und in Teilen eine sehr große Ähnlichkeit mit den NRPS aus Pilzen und Bakterien haben. Das Protein Ebony aus *Drosophila melanogaster* synthetisiert aus  $\beta$ -Alanin und Dopamin  $\beta$ -Alanyl-Dopamin (Richardt *et al.*, 2003). Zur Aktivierung von  $\beta$ -Alanin nutzt Ebony eine A-Domäne und zum Transport eine T-Domäne. Auch diese T-Domäne besitzt, wie T-Domänen aus Bakterien und Pilzen als Kofaktor 4'-Phosphopantethein. Weitere Beispiele sind die Biosynthese von Polylysin in *Saccharomyces cerevisiae* durch das Protein Lys2, das eine T-Domäne besitzt (Yamanaka *et al.*, 2008), oder das Protein U26 aus höheren Eukaryoten, das am Abbau von Lysin beteiligt ist, und eine A- und eine T-Domäne besitzt (Kasahara *et al.*, 2003). In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die klassische Definition von NRPS nicht so strikt ist, wie angenommen. So ist die Polylysin Synthetase Lys2 in Bakterien eine Art membrangebundene NRPS. Direkt nach den ersten beiden Domänen, einer A- und einer T-Domäne, folgen drei Tandem-Domänen aus je zwei Transmembranhelices und einer C-Domäne.

Der modulare Aufbau von NRPS ist ein geeigneter Ansatzpunkt, um durch gezielte Kombination von Modulen und Domänen neue Produkte zu erhalten. In den letzten Jahren wurden viele Versuche in diese Richtung unternommen. Es wurden neue Kenntnisse über das Zusammenwirken von Domänen und Modulen gewonnen und wie man dieses Zusammenwirken beeinflussen kann (Baltz 2006; Eppelmann *et al.*, 2002; Fischbach *et al.*, 2007; Lai *et al.*, 2006c; Linne *et al.*, 2001). So wurde versucht Domänen aus verschiedenen NRPS miteinander zu kombinieren, um neue Produkte zu erhalten (Stachelhaus *et al.*, 1995). Die Produktmenge war allerdings im Vergleich zum natürlichen Produkt sehr gering. Vielversprechender scheint der Ansatz zu sein, komplette Module aneinander zu koppeln. Da diese bereits die A-, T- und C-Domänen enthalten, die aufeinander abgestimmt sind, sollte die Reaktion effizienter sein. Aber auch bei diesen Versuchen lag die Ausbeute deutlich unter der von natürlichen NRPS (Schneider *et al.*, 1998). Vermutlich sind die Protein-Protein-Kontakte zwischen den einzelnen Modulen und Domänen noch nicht genug verstanden, um einen effektiven Transfer der Substrate zu ermöglichen. Die gelösten Komplexstrukturen von mehreren Domänen eines Moduls haben dabei wertvolle Hinweise über die Wechselwirkungen innerhalb eines Moduls gegeben (Frueh *et al.*, 2008; Samel *et al.*, 2007; Tanovic *et al.*, 2008). Trotzdem ist weiteres Wissen über die Wechselwirkungen der

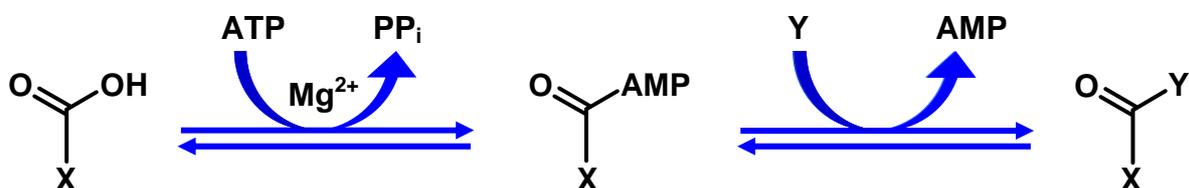
beteiligten Proteine nötig um effektive, neue Kombinationen von NRPS-Modulen zu konstruieren.

Sowohl DltA als auch DltC zeigen bei Sequenz, Struktur und Funktion sehr große Ähnlichkeit mit NRPS-Domänen. DltA mit den Adenylierungsdomäne, DltC mit den PCP. Erkenntnisse über DltA und DltC sollten daher Rückschlüsse auf die Eigenschaften von A- und T-Domänen von NRPS ermöglichen.

### 1.3. Adenylierungsdomänen und DltA

DltA ist ein circa 57 kDa großes Protein. Seine Funktion ist die Aktivierung von freiem D-Alanin durch Adenylierung, und die Übertragung auf den Akzeptor DltC (May *et al.*, 2005; Perego *et al.*, 1995; Yonus *et al.*, 2008). Die zwei Teilreaktionen von DltA sind typisch für die Superfamilie der Adenylat-bildenden Enzyme (Schmelz *et al.*, 2009), deren allgemeines Reaktionsschema in Abbildung 9 dargestellt ist.

In einem ersten Reaktionsschritt, der Adenylierung, wird ein niedermolekulares Substrat unter Verwendung von ATP aktiviert, also an AMP gebunden, wobei anorganisches Pyrophosphat (PP<sub>i</sub>) frei wird. Das so aktivierte Substrat wird daraufhin in der zweiten Teilreaktion, der Thiolierung, auf einen Akzeptor übertragen, wobei das AMP wieder freigesetzt wird. Beide Teilreaktionen sind thermodynamisch reversibel.

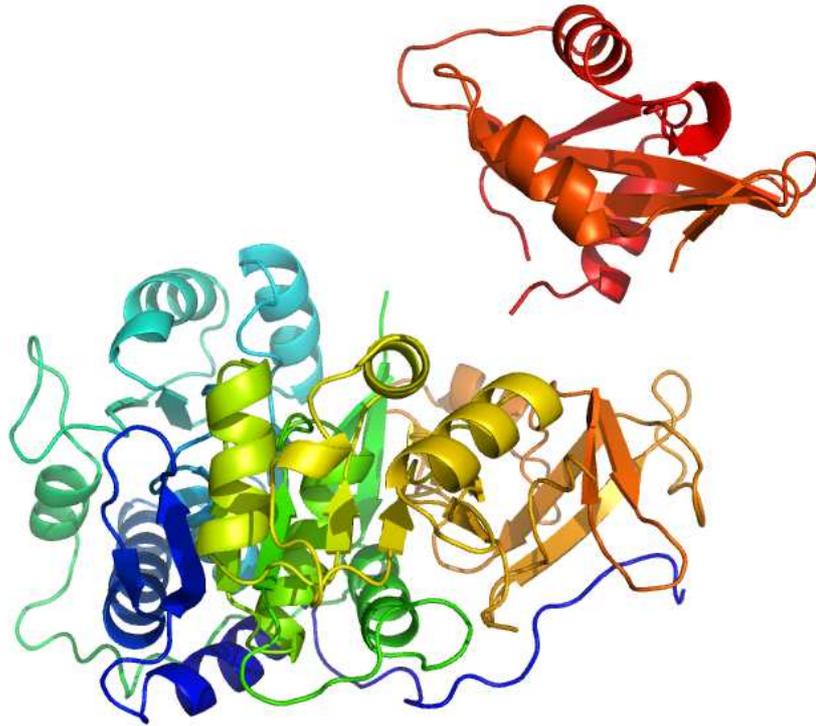


**Abbildung 9:** Das allgemeine Reaktionsschema der Adenylat-bildenden Enzyme. Im ersten Schritt wird das Substrat X an einer Carboxylgruppe durch Adenylierung aktiviert und im zweiten Schritt auf den Akzeptor Y übertragen. Bei NRPS ist der Akzeptor das Phosphopantethein der T-Domäne.

Die Klasse I der Adenylat-bildenden Enzyme werden anhand ihrer verwendeten Substrate in drei Gruppen unterteilt. 1. die Luciferasen, 2. die Acyl-CoA Synthetasen (ACS) und 3. die Adenylierungsdomänen der NRPS, zu denen auch DltA gezählt wird. Der Reaktionsmechanismus und die Struktur sind bei allen Mitgliedern der Klasse I sehr ähnlich, sie unterscheiden sich allerdings in Bezug auf das verwendete Substrat und den Akzeptor, auf den das Substrat übertragen wird. Auch die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen katalysieren eine Adenylierungsreaktion, werden jedoch aufgrund deutlicher Sequenz- und Strukturunterschiede als Klasse II Adenylat-bildende Enzyme eingeordnet (Gulick 2009; Schmelz *et al.*, 2009; Weber *et al.*, 2001).

Die Luciferasen, die kleinste Gruppe der Klasse I Adenylat-bildenden Enzyme, nutzen Luciferin als Substrat und als Akzeptor molekularen Sauerstoff. Ihre Reaktion ist verantwortlich für die Chemolumineszenz der Leuchtkäfer (Inouye 2010). Die Acyl-CoA Synthetasen nutzen Acetat, Propionat oder Fettsäuren als Substrat und übertragen sie auf Coenzym A. In nahezu allen Organismen sind sie essentiell für den Fettsäurestoffwechsel (Jogl *et al.*, 2004; Reger *et al.*, 2007). Die dritte Gruppe sind die bereits erwähnten A-Domänen. Sie alle verwenden eine bestimmte Aminosäure als Substrat und übertragen diese auf den Kofaktor 4'-Phosphopantethein (Abbildung 7) eines PCPs (Koglin *et al.*, 2009). Die ACS und die A-Domänen sind die beiden zahlenmäßig stärksten Gruppen und weisen außerdem zueinander eine größere Ähnlichkeit bei Struktur und Akzeptor auf als zu den Luciferasen.

Als erste Struktur eines Klasse I Adenylat-bildenden Enzyms wurde 1996 die Kristallstruktur der Luciferase gelöst (Conti *et al.*, 1996). Im Jahre 1997 folgte mit der Phenylalanin-aktivierenden-Domäne PheA der Gramicidin-S-Synthetase aus *Bacillus brevis* die erste Struktur einer Adenylierungsdomäne (Conti *et al.*, 1997). 2003 wurde dann die erste Struktur einer ACS veröffentlicht (Gulick *et al.*, 2003). Es zeigte sich, dass Klasse I Adenylat-bildende Enzyme aus zwei Domänen aufgebaut sind: einer großen N-terminalen Subdomäne mit ungefähr 400 Aminosäuren und einer kleineren C-terminalen Subdomäne mit ungefähr 100 Aminosäuren. Verbunden sind diese beiden Subdomänen über eine so genannte *hinge*-Region („Scharnier“-Region). Das aktive Zentrum für die Katalyse der beiden Teilreaktionen befindet sich in der Kontaktfläche der beiden Subdomänen.

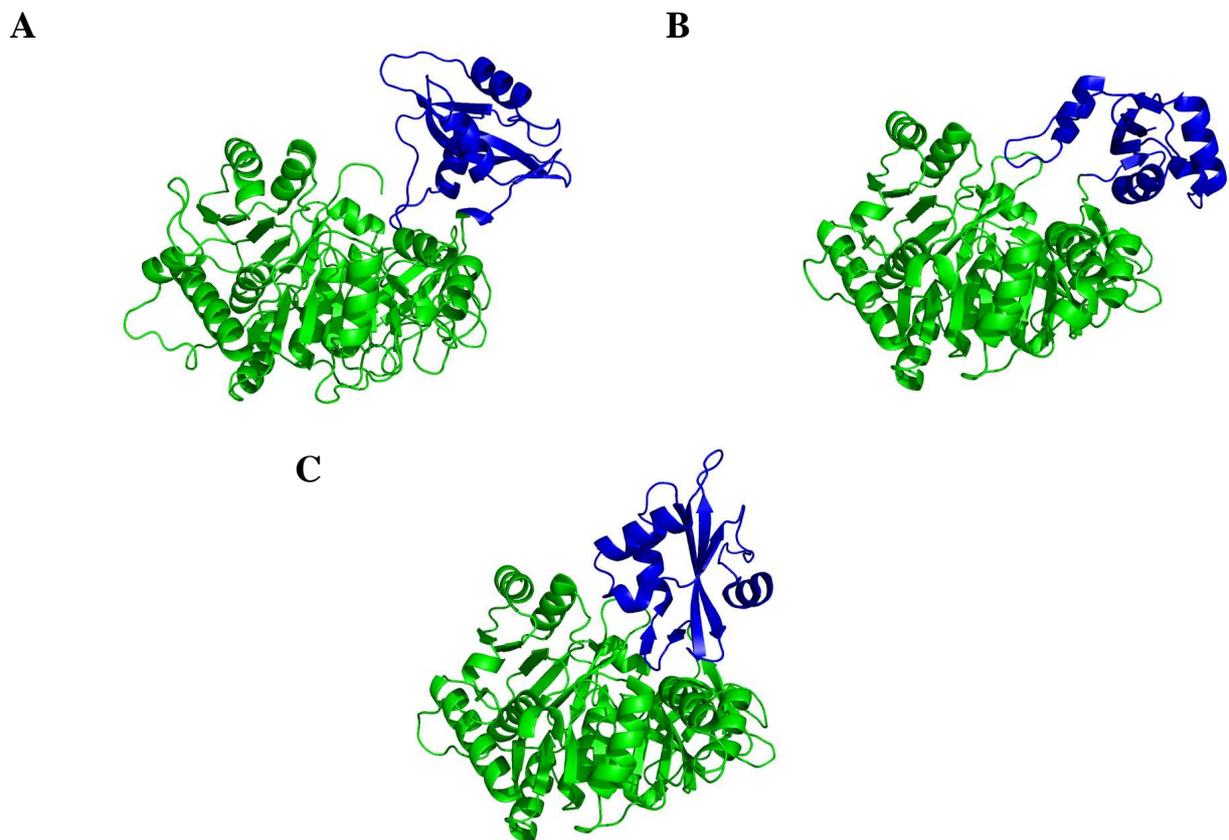


**Abbildung 10:** Die Kristallstruktur von Luciferase wurde 1996 als erste Struktur eines Klasse I Adenylat-bildenden Enzymes gelöst. Sie zeigt deutlich die größere N-terminale Domäne (blau, grün, gelb, orange) und die kleinere C-terminale Domäne (rot). Aufgrund unzureichender Elektronendichte ist die Verbindung zwischen N- und C-terminaler Domäne nicht zu sehen (PDB-Code 1LCI, Conti *et al.*, 1996).

Die Sequenzidentität von Klasse I Adenylat-bildenden Enzymen untereinander ist mit circa 20% relativ gering. Die Vielzahl der mittlerweile vorhandenen Strukturen zeigt aber eine große strukturelle Ähnlichkeit inklusive dem typischen Aufbau aus 2 Subdomänen (Bains *et al.*, 2007; Conti *et al.*, 1996; Conti *et al.*, 1997; Du *et al.*, 2008b; Gulick *et al.*, 2003; Gulick *et al.*, 2004; Hisanaga *et al.*, 2004; Hughes *et al.*, 2011; Kochan *et al.*, 2009; May *et al.*, 2002; Osman *et al.*, 2009; Reger *et al.*, 2007; Reger *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009b; Zhang *et al.*, 2011

Trotz dieser Gemeinsamkeiten beim grundlegenden Mechanismus ist die Vielseitigkeit in Bezug auf die verwendeten Substrate enorm. Luciferasen beschränken sich auf Luciferin und ACS auf Acetat, Propionat oder Fettsäuren. Die A-Domänen der NRPS hingegen können, angefangen mit den klassischen proteinogenen Aminosäuren, über D-Enantiomere und Aminosäuren aus dem Sekundärstoffwechsel, bis hin zu völlig neuen, anscheinend nur für die NRPS synthetisierten Aminosäuren, unzählige verschiedene Varianten von Substraten verwenden. Dazu besitzen alle A-Domänen in ihrem aktiven Zentrum speziell geformte Bindungstaschen, die eine selektive Aktivierung einer bestimmten Aminosäure ermöglichen.

Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeit wird angenommen, dass der grundlegende Reaktionsmechanismus für alle Klasse I Adenylat-bildenden Enzyme gleich ist. Verschiedene Strukturen zeigen, dass die C-terminale Subdomäne während der Reaktion ihre Orientierung in Bezug auf die N-terminale Subdomäne signifikant ändert (Gulick 2009). Sie rotiert um ca.  $140^\circ$ , von ihrer Position während der ersten Teilreaktion um ihre Position während der zweiten Teilreaktion einzunehmen. Durch verschiedene Strukturen mit Substraten, Produkten und Inhibitoren konnten drei verschiedene Konformationen bestimmt werden: (i) eine offene Konformation, wenn kein Substrat anwesend ist (ii) eine Adenylat-bildende Konformation bei der das Substrat adenyliert wird, (iii) eine Thioester-bildenden Konformation, nachdem das Substrat auf den Akzeptor übertragen worden ist (Abbildung 11).

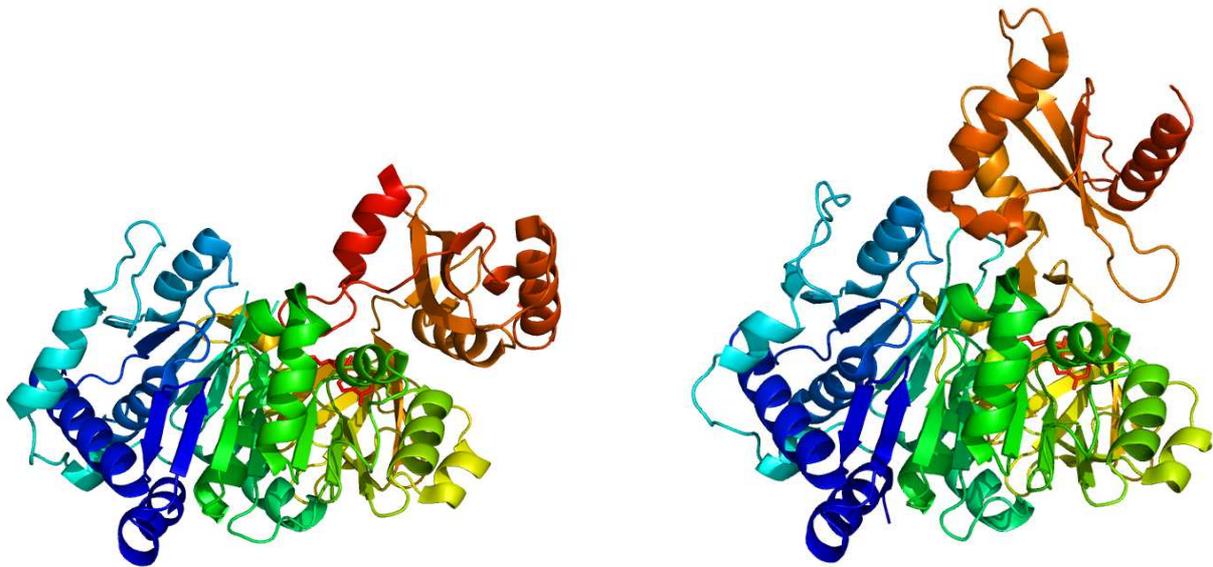


**Abbildung 11:** Die drei verschiedenen Konformationen von Adenylat-bildenden Enzymen. Die N-terminalen Domänen sind jeweils grün, die C-terminalen Domänen blau gefärbt. (A) Die offene Konformation, dargestellt am Beispiel der Luciferase (PDB-Code 1BA3, Franks *et al.*, 1998). (B) Die Adenylat-bildende Konformation (PDB Code 3CW8, Reger *et al.*, 2008) und (C) die Thioester-bildende Konformation (PDB Code 3CW9, Reger *et al.*, 2008) beide am Beispiel der 4-Chlorobenzoat:CoA-Ligase.

Die große Auswahl an vorhandenen Strukturen von verschiedenen Klasse I Adenylat-bildenden Enzymen in allen drei Konformationen hat gezeigt, dass dieser Mechanismus sehr wahrscheinlich ist. Welche Konformationen ohne gebundene Substrate vorliegen ist dagegen unklar. Möglich ist das alleinige Vorhandensein einer Konformation in Abwesenheit aller Substrate und dass die Konformation sich nur ändert, wenn die nötigen Katalyseschritte durchlaufen werden. Ebenso möglich, und aufgrund der großen Flexibilität der N-terminalen und der C-terminalen Domänen zueinander wahrscheinlicher, ist dass in Lösung alle Konformationen populierte werden. Dann würden nur die Proteine, die eine Reaktion katalysieren die Konformationen in geordneter Reihenfolge durchlaufen, während die ungebundenen Proteine zufällig alle Konformationen einnehmen können.

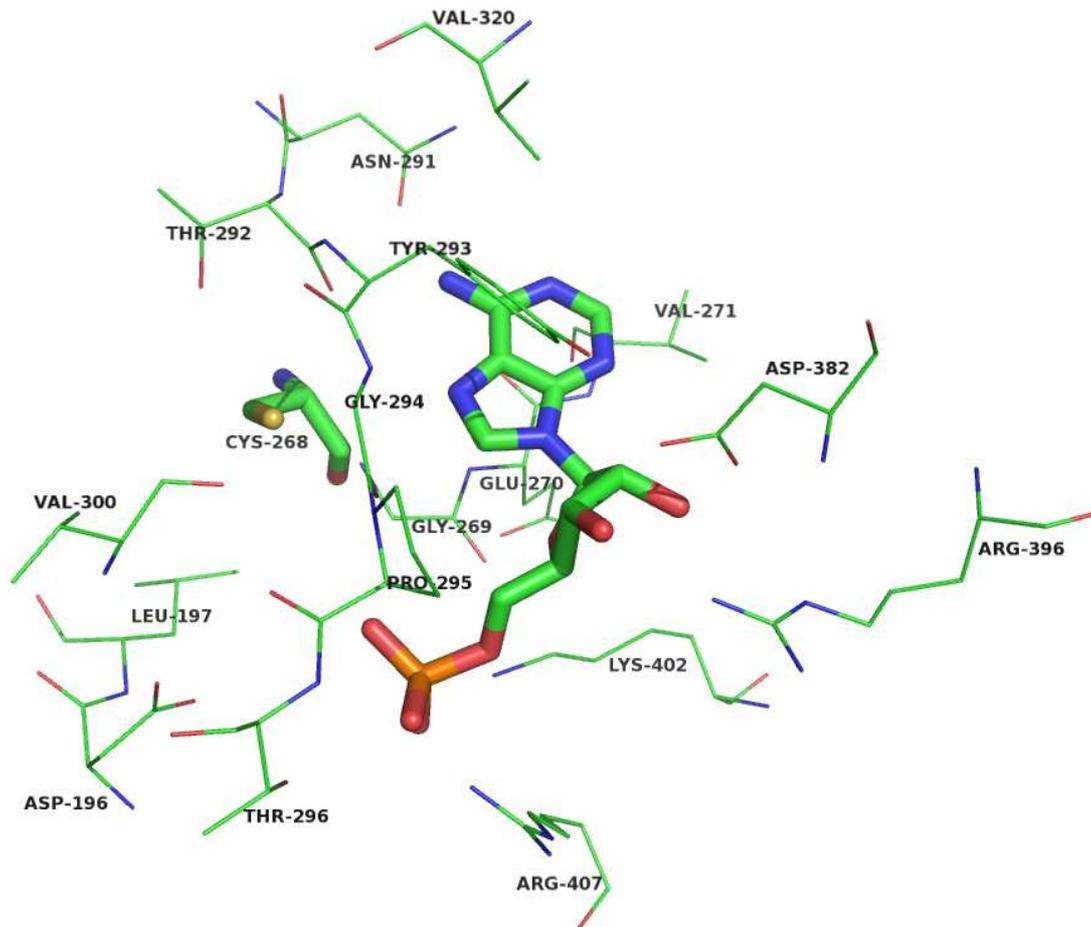
Die bekannten Strukturen von A-Domänen ermöglichten es weiterhin, bestimmte Regeln bezüglich der Substratselektivität herzuleiten. So konnten die Aminosäurereste bestimmt werden, die an der Substratbindung beteiligt sind, und anhand von Sequenzvergleichen wurde gezeigt, dass bestimmte Reste im aktiven Zentrum konserviert sind, z.B. diejenigen welche die Phosphatgruppen des ATPs binden. Andere Reste hingegen sind nicht konserviert, da sie an der Bindung zum Aminosäuresubstrat beteiligt sind (Conti *et al.*, 1997). Für diese Reste konnten allgemeine Regeln abgeleitet werden, anhand deren die Spezifität einer A-Domäne vorhergesagt werden kann (May *et al.*, 2002; Stachelhaus *et al.*, 1999).

2008 konnten unabhängig voneinander zwei verschiedene Kristallstrukturen von DltA gelöst werden. Einmal von DltA aus *Bacillus subtilis* in Anwesenheit von AMP (Yonus *et al.*, 2008) und außerdem von DltA aus *Bacillus cereus* mit D-Alanin-Adenylat (Du *et al.*, 2008b). In Abbildung 12 sind beide Strukturen gezeigt. 2009 konnten zwei weitere Strukturen von *Bacillus cereus* DltA in Anwesenheit von ATP gelöst werden (Osman *et al.*, 2009). Die Kristallstrukturen zeigen, dass auch DltA die für Klasse I Adenylat-bildende Enzyme bekannten verschiedenen Konformationen einnimmt.



**Abbildung 12:** Kristallstrukturen von DltA. Links DltA aus *Bacillus cereus* in Anwesenheit von D-Alanin Adenylat (PDB Code 3DHV, Du *et al.*, 2008b) zeigt die Adenylat-bildende Konformation. Rechts DltA aus *Bacillus subtilis* in Anwesenheit von AMP kristallisierte in der Thioester-bildende Konformation (PDB-Code 3E7W, Yonus *et al.*, 2008)..

Anhand der Kristallstrukturen konnten Aminosäuren im aktiven Zentrum bestimmt werden, welche die Substratspezifität festlegen (Abbildung 13). Für die Reste Cystein 268, Aspartat 382, Glutamat 297 und Arginin 396 (Nummerierung laut *Bacillus subtilis* DltA) konnte mit Punktmutationen ein Einfluss auf die katalysierte Reaktion bestätigt werden (Du *et al.*, 2008a; Osman *et al.*, 2009; Yonus *et al.*, 2008). Zum Beispiel bewirkt die Mutation C268A eine breitere Substratspezifität, so dass die Aktivität für D-Aminobuttersäure deutlich erhöht ist und auch L-Alanin und L-Aminobuttersäure umgesetzt werden. Passend dazu ist Cystein 268 ist in allen gram-positiven Bakterien konserviert, außer in *Streptococcus* Spezies, die stattdessen ein Aspartat besitzen (Yonus *et al.*, 2008).



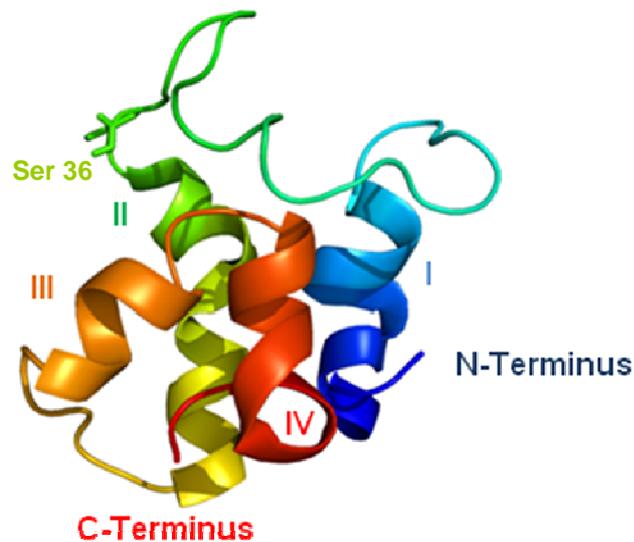
**Abbildung 13:** Das aktive Zentrum von *Bacillus subtilis* DltA (PDB Code 3E7W, Yonus *et al.*, 2008). Cystein 268 und AMP sind in *stick*-Form dargestellt.

In zwei Kristallstrukturen von *Bacillus subtilis* DltA (Yonus *et al.*, 2008) zeigen die Aminosäuren Glycin 108 bis Valin 114 besonders hohe B-Faktoren, was auf eine große Flexibilität dieser Reste hindeutet. Des Weiteren interagiert dieser Bereich möglicherweise mit DltC, wenn der Transfer von aktiviertem D-Alanin auf DltC in der zweiten Teilreaktion stattfindet.

## 1.4. Peptidyl-Carrier-Proteine und DltC

DltC ist der Träger für aktiviertes D-Alanin, das zur Alanylierung von Teichonsäuren dient (Heaton *et al.*, 1994; Kiriukhin *et al.*, 2001). DltC besitzt eine molekulare Masse von etwa 11 kDa und den Kofaktor 4'-Phosphopantethein (PPant), an dessen endständigem Schwefel D-Alanin gebunden wird (Abbildung 7). Frühere Sequenzvergleiche legen nahe dass sich die PCPs aus den ACPs entwickelt haben. Acyl-Carrier-Proteine (ACPs) übertragen in allen Organismen die Acyl-Ketten bei der Fettsäuresynthese (Byers *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2010). Sowohl ACPs als auch PCPs brauchen für ihre Funktion PPant als Kofaktor, der immer an ein 100% konserviertes Serin über eine Phosphodiesterbindung gekoppelt wird. Die 4'-Phosphopantethein-Transferasen nutzen Coenzym A (CoA) als Substrat, um die ACPs bzw. PCPs mit PPant zu modifizieren. Es konnte gezeigt werden, dass es für ACPs und PCPs verschiedene Transferasen gibt. Die Transferasen werden in drei verschiedene Klassen eingeteilt, von denen eine spezifisch für die ACPs ist, während die anderen beiden Klassen vermutlich eine geringe Substratspezifität haben und sowohl ACPs als auch PCPs modifizieren können (Finking *et al.*, 2004b; Lambalot *et al.*, 1995; Mofid *et al.*, 2002; Mootz *et al.*, 2001; Reuter *et al.*, 1999).

Da sowohl ACPs als auch PCPs nur circa 10 kDa groß sind, bieten sie sich für NMR-Messungen zur Strukturaufklärung an. Eine große Zahl von NMR-Strukturen von ACPs konnten bereits gelöst werden (Alekseyev *et al.*, 2007; Arthur *et al.*, 2009; Crump *et al.*, 1997; Evans *et al.*, 2008; Evans *et al.*, 2009; Findlow *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2003; Ploskon *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2009a; Xu *et al.*, 2001). Aber auch von PCPs wurden NMR-Strukturen veröffentlicht (Frueh *et al.*, 2008; Koglin *et al.*, 2006; Volkman *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2000). Auch Röntgenkristallstrukturen von ACPs und PCPs konnten bereits gelöst werden (Cryle *et al.*, 2008; Drake *et al.*, 2006; Parris *et al.*, 2000; Rafi *et al.*, 2006; Roujeinikova *et al.*, 2002; Roujeinikova *et al.*, 2007; Samel *et al.*, 2007; Tanovic *et al.*, 2008). Die Strukturen zeigen, dass sich ACPs und PCPs sehr ähnlich sind. Alle CPs zeigen ein typisches globuläres Bündel aus vier Helices, das auch als Acyl-Carrier-Protein-artige Faltung bezeichnet wird. Helix I ist antiparallel zu Helix II und Helix IV angeordnet, wobei Helix IV um circa 45° gekippt ist. Die erste Struktur eines Carrier-Proteins, die gelöst werden konnte, ist in Abbildung 14 gezeigt. NMR-Untersuchungen deuten darauf hin, dass besonders Helix II eine geringe konformationelle Stabilität aufweist (Andrec *et al.*, 1995) und sich die Strukturen von apo- und holo-Form von PCPs unterscheiden könnten (Koglin *et al.*, 2006).



**Abbildung 14:** Die erste Struktur eines ACP konnte 1990 mittels NMR gelöst werden. Zu sehen sind die vier Helices (Helix I: blau, Helix II: gelb/grün, Helix III: orange, Helix IV: rot) und des Weiteren das Serin, welches *in vivo* mit PPant modifiziert wird, als *stick*. (PDB-Code 1ACP, Kim *et al.*, 1989)

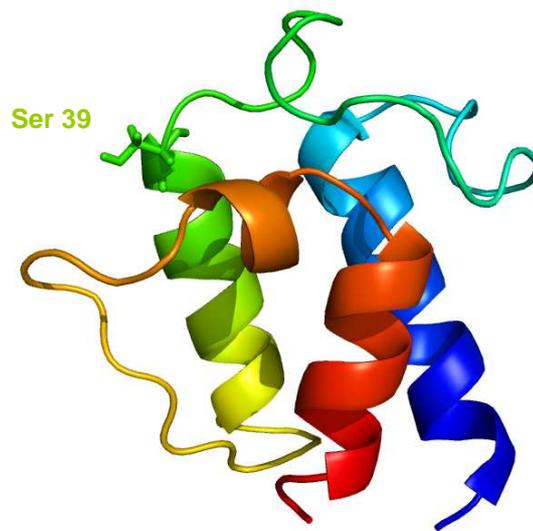
Im Gegensatz zu den A-Domänen weisen die PCPs keine bekannte Spezifität bezüglich ihres Substrates auf. Die Selektion erfolgt hier wahrscheinlich anhand der spezifischen Bindung eines bestimmten PCPs an eine bestimmte A-Domäne und eine bestimmte C-Domäne (Marshall *et al.*, 2002). In der Tat konnte gezeigt werden das Thioesterase-Domänen, eine weitere Art von Domänen der NRPS, die Fähigkeit besitzen falsch beladene PCPs von der gebundenen Aminosäure zu trennen, was darauf hinweist dass diese Fehlbeladung häufiger vorkommt (Schwarzer *et al.*, 2002). Allerdings übertragen A-Domänen sehr selektiv nur auf die in derselben NRPS benachbarten PCPs, und es gibt auch Hinweise, dass A-Domänen und PCPs spezifisch miteinander interagieren, so dass das „falsche“ PCP nicht beladen wird (Drake *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007). Außerdem ist zu beachten, dass die Module von NRPS oft als eine einzige Polypeptidkette vorkommen, so dass die passenden A-, T- und C-Domänen über Verbindungsregionen kovalent aneinander gebunden sind. Dies verringert die Möglichkeit der falschen Reaktion von Domänen, da die passende Domäne schon in geringer Distanz lokalisiert ist, und nicht erst durch Diffusion in der Zelle gefunden werden muss.

Die genaue Interaktion zwischen A-Domänen und PCPs ist noch unklar. Es wird angenommen, dass das 4'-Phosphopantethein der PCPs bei der zweiten Teilreaktion in das aktive Zentrum der A-Domäne eindringt (Yonus *et al.*, 2008). Für ACS liegen Strukturen vor, die zeigen, wie Coenzym A gebunden wird (Reger *et al.*, 2007). Da Coenzym A der

biochemische Vorläufer von PPant ist, liegt es nahe, dass PPant an die A-Domänen auf eine ähnliche Art bindet. Die Details der eigentlichen Bindung von PCPs und A-Domänen sind jedoch nicht bekannt und ein endgültiger struktureller Beweis steht noch aus.

Auch für die Bewegung der C-terminalen Subdomäne der A-Domänen liegt ein Zusammenhang zur Bindung zwischen A-Domäne und PCP nahe, konnte aber bisher noch nicht bewiesen werden. Frühere Ergebnisse zeigen, dass eine Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen stattfindet, die bewirkt dass nur passende PCPs von einer A-Domäne beladen werden. Wahrscheinlich wird die Wechselwirkung über die interagierenden Aminosäuren auf der Oberfläche der PCPs bestimmt. Mutationen derselben konnten, in Maßen, die Interaktion verändern (Zhou *et al.*, 2007).

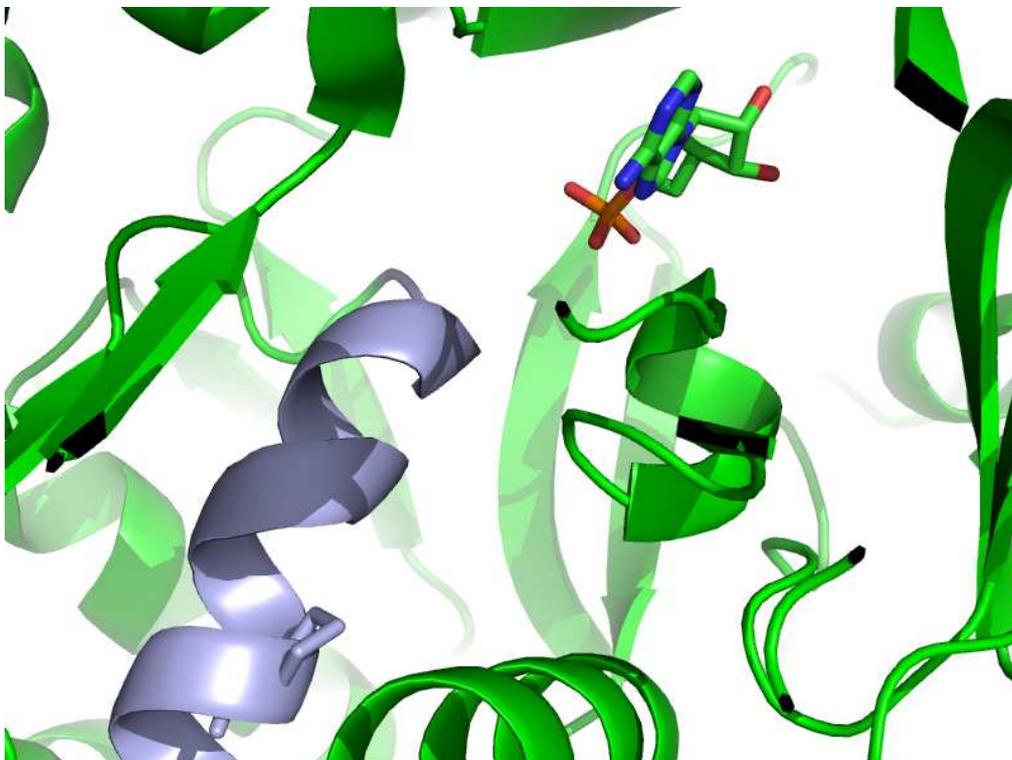
Die NMR-Struktur von Dcp, eines homologen Proteins von DltC, wurde 2001 veröffentlicht (Volkman *et al.*, 2001). Dcp stammt aus *Lactobacillus casei*, erfüllt die Funktion von *Bacillus subtilis* DltC und zeigt 44 % Sequenzidentität mit diesem. Die Struktur von Dcp bestätigte die Vermutung, dass auch DltCs ein kompaktes Vier-Helix Bündel bildet. Allerdings ist Helix III nicht so ausgeprägt definiert wie in Strukturen von ACPs (Abbildung 15). Volkman *et al.*, 2001 beschreiben auch einen möglichen Bindungsmodus von Dcp an ein Monomer einer Teichonsäure. Sie zeigen einen einzelnen positiv geladenen Bereich auf der Oberfläche von Dcp, der bei ACPs nicht vorhanden ist, und daher eine spezifische Funktion für Dcp, wie die Bindung an Teichonsäuren, besitzen könnte. Dieser positive Bereich könnte die Übertragung von D-Ala auf eine freie Hydroxylgruppe von Teichonsäuren strukturell ermöglichen. Heaton *et al.*, 1994 beschreiben dass mit D-Ala beladenes DltC ohne die Anwesenheit weiterer Proteine D-Ala auf LTA übertragen kann. Kiriukhin *et al.*, 2001 zeigten, dass, mit D-Ala beladenes DltC in der Anwesenheit von LTAs hydrolysiert wird, mit D-Ala beladenes ACP hingegen nicht. Weiterhin wurde D-Ala von LTAs auf freies DltC übertragen.



**Abbildung 15:** Die NMR-Struktur des DltC-Homologen aus *Lactobacillus casei*, Dcp. Helix I (blau), Helix II (gelb/grün), Helix III (orange) und Helix IV (rot) sind wie in Abbildung 14 angeordnet. Der Faltungstypus ist derselbe wie bei ACPs bereits gefunden, allerdings ist Helix III deutlich verkürzt. Serin 39 ist als *stick* dargestellt. (1DV5, Volkman *et al.*, 2001).

## 1.5. Ziele dieser Arbeit

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es, die Eigenschaften und Wechselwirkungen der Proteine DltA und DltC aus *Bacillus subtilis* näher zu charakterisieren. Um weitere Informationen über die Substratbindung von DltA zu erhalten, sollten Aminosäurereste im aktiven Zentrum von DltA gezielt mutiert werden. Dazu sollten mittels Punktmutation Cystein 268 gegen Aspartat und Prolin 204 gegen Alanin ausgetauscht werden. Für Cystein 268 konnte schon früher eine Rolle bei der Substratbindung und -spezifität festgestellt werden. So ergab die Mutation zu Alanin eine größere Aktivität für die Substrate L-Alanin und D-Aminobuttersäure. Prolin 204 ist nicht Teil des aktiven Zentrums sondern circa 10 Å entfernt und Teil einer Helix, deren N-Terminus in das aktive Zentrum hinein ragt (Abbildung 16). Durch die Mutation von Prolin 204 zu Alanin sollte diese Helix sterisch entspannt werden, was möglicherweise zu einer größeren Affinität von DltA für nicht-native Substrate führen könnte.



**Abbildung 16:** Die Position von Prolin 204 relativ zum aktiven Zentrum von DltA. Die Helix mit Prolin 204 ist hellblau gefärbt. AMP im aktiven Zentrum und Prolin 204 sind in *stick*-Darstellung abgebildet.

Um die Bindung von DltC näher zu untersuchen sollte ein flexibler Bereich von sieben Aminosäuren der N-terminalen Domäne, der möglicherweise an der Bindung mit DltC beteiligt ist, vollständig zu Alanin mutiert werden. Alle generierten DltA-Mutanten sollten dann exprimiert und gereinigt werden, um anschließend die Aktivität oder die Wechselwirkung mit DltC mit der von DltA Wildtyp zu vergleichen.

Um die apo-Form von DltC für weitere Untersuchungen zu imitieren, sollte Serin 36 von DltC zu Alanin mutiert werden. Diese Mutante und der Wildtyp sollten dann exprimiert und gereinigt werden. Ein weiterer Schwerpunkt waren Kristallstrukturen des Peptidyl-Carrier Proteins DltC. Bisher war nur eine NMR-Struktur der apo-Form eines DltC Homologen bekannt. Die Kristallstrukturen von DltC S36A und des Wildtyps sollten eventuelle Unterschiede zwischen der apo- und der holo-Form aufzeigen. Sowohl für DltC Wildtyp als auch die S36A-Mutante sollte die Interaktion von DltC mit DltA mit geeigneten Methoden untersucht werden. NMR-Titrations von DltA zu DltC als auch die Kristallstrukturen des DltA-DltC-Komplexes sollten genauere Kenntnisse über die Art der Bindung liefern.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Geräte, Materialien und Chemikalien

**Tabelle 1:** Verwendete Geräte

| Gerät  | Hersteller   |
|--|--|
| <i>Absorptionsspektrometer</i><br>Ultrospec 4000<br>Ultrospec 3300 pro<br>Jasco V-630  | Amersham Pharmacia Biotech<br>Amersham Pharmacia Biotech<br>Jasco                    |
| <i>Autoklav</i><br>Varioklav   | Varioklav  |
| <i>Bildverarbeitungssystem für Protein-Kristallisationsplatten</i><br>Oasis LS3 Protein Crystal Imaging System<br>Minstrel DT UV | Veeco<br>Rigaku  |
| <i>Chromatographieeinheiten</i><br>Aekta FPLC<br>Aekta Purifier  | GE Healthcare<br>GE Healthcare   |
| <i>Gelelektrophoreseeinheiten</i><br>Easy Cast B1A (Agarose)<br>Hoefer SE 260 Gelkammer (SDS-PAGE)                               | Owl Separation Systems Inc.<br>Amersham Pharmacia Biotech                            |
| <i>Heizblöcke/Thermomixer</i><br>Block Heater<br>Thermomixer compact<br>Thermomixer comfort                                      | Stuart Scientific<br>Eppendorf<br>Eppendorf  |
| <i>Homogenisator</i><br>Ultra Turrax T25   | Janke&Kunkel Labortechnik  |
| <i>Inkubator für Zellkultur</i><br>Schüttler SM30<br>Schüttler KS15<br>Inkubationshaube TH15<br>Inkubationshaube TH30            | Edmund Bühler GmbH<br>Edmund Bühler GmbH<br>Edmund Bühler GmbH<br>Edmund Bühler GmbH |

|   |                                       |
|---|---------------------------------------|
| <i>Magnetrührer</i><br>Bibby Magnetic Stirrer<br>Reo basic C  | Bibby Sterilin<br>IKA-Werke           |
| <i>Mikroskope</i><br>M80<br>M165C<br>MZ16<br>MZ75   | Leica<br>Leica<br>Leica<br>Leica      |
| <i>NMR Spektrometer</i><br>600 Avance III<br>800 Avance III   | Bruker<br>Bruker                      |
| <i>PCR-Cycler</i><br>Mastercycler gradient<br>MyCycler  | Eppendorf<br>Bio-Rad                  |
| <i>pH-Meter</i><br>pH 526 Microprocessor pH-meter<br>pH 211 Microprocessor pH-meter   | WTW<br>HANNA instruments              |
| <i>Pipettierroboter</i><br>MicroSys SQ Cartesian Dispensing System  | Zinsser Analytics (Genomic Solutions) |
| <i>Röntgenstrahlgenerator</i><br>RA Micro007<br><i>Detektoren</i><br>R-AXIS IV++<br>Saturn 944+<br><i>Kryostrom</i><br>XSTREAM 2000 | Rigaku<br>Rigaku<br>Rigaku<br>Rigaku  |
| <i>Rotatoren</i><br>Rotator SB2   | Stuart Scientific                     |
| <i>Stromversorgung</i><br>Electrophoresis Power Supply EPS 300  | Amersham Pharmacia Biotech            |
| <i>Szintillationszähler</i><br>Tri-Carb 2100 TR   | Packard Bioscience                    |
| <i>Taumler</i><br>Polymax 1040  | Heidolph                              |

|  |  |
|--|--|
| <i>Ultraschallsonde</i><br>UP 200s Ultraschallprozessor<br>VibraCell   | Dr. Hielscher GmbH<br>Bioblock Scientific  |
| <i>Waagen</i><br>Analytical Plus<br>BP 4100S<br>TE3102 S   | Ohaus<br>Sartorius<br>Sartorius  |
| <i>Western-Blot Apparatur</i><br>Semi-Phor<br>TE77PWR  | Hoefer Scientific Instruments<br>GE Healthcare   |
| <i>Vortex</i><br>Vortex Genie 2  | Scientific Industries  |
| <i>Zentrifugen</i><br>Biofuge pico<br>SIGMA 2-16 K<br>Speed Vac Plus SC 110A<br>Universal 32R<br>Avanti J-20<br>Avanti J-25<br>Centrifuge 5804R<br>Sigma 1-14<br>Mikro 120 | Heraeus<br>Sartorius<br>Savant<br>Hettich Zentrifugen<br>Beckman Coulter<br>Beckman Coulter<br>Eppendorf<br>Sartorius<br>Hettich |

**Tabelle 2:** Verwendete Materialien

| <b>Material</b>  | <b>Bezugsquelle</b>                             |
|--|---|
| <i>Antikörper</i><br>Maus Anti-His <sub>6</sub> IgG, ungekoppelt<br>Ziege anti-Maus IgG, gekoppelt mit<br>Meerretich-Peroxidase<br>Ziege anti-Maus IgG, gekoppelt mit<br>Alkalischer Phosphatase | Roche Applied Science<br>Millipore<br>Millipore |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| <i>Chemolumineszenter Film</i>  |                         |
| Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film   | Roche Applied Science   |
| <i>Chromatographiesäulen</i>  |                         |
| HiTrap IMAC, 5 ml<br>(Affinitätschromatographie)  | GE Healthcare           |
| Superdex 75 prep grade 26/60<br>(Größenausschlusschromatographie)   | GE Healthcare           |
| <i>DNA Extraktions Kits</i>   |                         |
| QIAprep Miniprep  | Qiagen                  |
| QIAquick PCR Purification   | Qiagen                  |
| High Pure PCR Cleanup Micro   | Roche Applied Science   |
| NucleoBond Xtra Midi Kit  | Macherey-Nagel          |
| ZymoClean Gel DNA Recovery  | Zymo Research           |
| peqGold Gel Extraction  | peqlab                  |
| GeneJET Plasmid Miniprep  | Fermentas               |
| <i>Immunoblotting Detektion</i>   |                         |
| ECL Western Blotting Detection Reagents   | Amersham Bioscience     |
| <i>Isotopenmarkierte Chemikalien</i>  |                         |
| <sup>13</sup> C-Glucose   | Spectra Stable Isotopes |
| <sup>15</sup> N-Ammoniumchlorid   | Spectra Stable Isotopes |
| <sup>32</sup> P-Tetrasodium Pyrophosphat  | PerkinElmer             |
| <i>Konzentrator Einheiten</i>   |                         |
| Amicon Centriplus   | Millipore               |
| <i>Membran für Immunoblotting</i>   |                         |
| Immun-Blot PVDF Membran   | Bio-Rad                 |
| <i>Protein Kristallisationskits</i>   |                         |
| JBScreen Classic Kits 1-10, JBScreen JCSG<br>++ Kits 1-4  | Jena Bioscience         |
| Crystal Screen 1, Crystal Screen 2  | Hampton Research        |
| Crystallization Basic Kit, Crystallization<br>Extension Kit, Crystallization Cryo Kit,<br>Crystallization Low Ionic Kit | Sigma-Aldrich           |
| Morpheus, MemGold, MemSys,<br>MemPlusMemStart   | Molecular Dimensions    |

| <i>Protein-Kristallisationsplatten</i>    |                 |
|---|-----------------|
| 96 well CrystalQuick Platte               | Greiner Bio-One |
| Swissci MRC 2 well Kristallisationsplatte | Jena Bioscience |
| Swissci MRC 3 well Kristallisationsplatte | Jena Bioscience |
| NeXtal 24 well Kristallisationsplatte     | Qiagen          |

Sämtliche weiteren verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich, Merck, Invitrogen oder Applichem im Reinheitsgrad p.a. bezogen. Alle angegeben wässrigen Lösungen wurden, sofern nicht anders vermerkt, mit bidestilliertem Wasser hergestellt.

## 2.2. Organismen, Plasmide, Oligonukleotide und Enzyme

**Tabelle 3:** Verwendete Bakterienstämme

| <b>Stamm</b>                          | <b>Genotyp</b>   | <b>Bezugsquelle</b> |
|---------------------------------------|--|---------------------|
| <i>Escherichia coli</i><br>Top10      | F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) φ80 <i>lacZ</i> DM15<br><i>DlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697</i><br><i>galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i> | Invitrogen          |
| <i>Escherichia coli</i><br>XL1 Blue   | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1</i><br><i>lac [F' proAB lacIqZ.M15 Tn10 (TetR)]</i>  | Stratagene          |
| <i>Escherichia coli</i><br>BL21 (DE3) | F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> (DE3)   | Novagen             |

**Tabelle 4:** Verwendete Plasmid-Vektoren

| <b>Verwendete Plasmid-Vektoren</b> | <b>Beschreibung</b>   | <b>Herkunft</b>       |
|------------------------------------|---|-----------------------|
| pET-15b                            | Expressionsvektor, N-terminaler His- <i>tag</i> ,<br>Thrombin-Spaltstelle, Ampicillin Resistenz     | Novagen               |
| pET-15b/TEV                        | Expressionsvektor, N-terminaler His- <i>tag</i> , TEV-<br>Spaltstelle, Ampicillin Resistenz         | modifizierter pET-15b |
| pET-19b                            | Expressionsvektor, N-terminaler His- <i>tag</i> ,<br>Enterokinase-Spaltstelle, Ampicillin Resistenz | Novagen               |

|         |   |         |
|---------|---|---------|
| pET-20b | Expressionsvektor, C-terminaler His-tag, <i>pelB</i> Gen des Originalvektors wurde für genutzte Konstrukte entfernt, Ampicillin Resistenz | Novagen |
| pET-21a | Expressionsvektor, C-terminaler His-tag, N-terminaler T7-tag, Ampicillin Resistenz  | Novagen |
| pET-22b | Expressionsvektor, C-terminaler His-tag, <i>pelB</i> Gen des Originalvektors wurde für genutzte Konstrukte entfernt, Ampicillin Resistenz | Novagen |
| pET-28a | Expressionsvektor, N-terminale His-tag/Thrombin-Spaltstelle/T7-tag Kombination  | Novagen |
| pQE-60  | Expressionsvektor, C-terminaler His-tag, Ampicillin Resistenz   | Qiagen  |

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon bezogen.

**Tabelle 5:** Verwendete Oligonukleotide

| Oligonukleotid                | Sequenz (5' → 3')                                      | Verwendungszweck                    |
|-------------------------------|--|-------------------------------------|
| DltA C292D<br>vorwärts        | GACACATTTATGTTTTGACGGAGAGGTCTT                         | Generierung der DltA C292D Mutante  |
| DltA C292D<br>rückwärts       | CTGTGTAAATACAAACTGCCTCTCCAAGAA                         | Synthese der DltA C292D Mutante     |
| DltA P228A<br>vorwärts        | CATGGACCTATATGCGTGCCTTCAATCAG                          | Synthese der DltA P228A Mutante     |
| DltA P228A<br>rückwärts       | CTGATTGAAGGCACGCATATAGGTCCATG                          | Synthese der DltA P228A Mutante     |
| DltA 7-Ala<br>vorwärts        | CTGATCCACGCAGCAGCAGCAGCAG<br>CAGCAGCGGCCGGCCAGCAGATTCA | Synthese der DltA 7-Alanin Mutante  |
| DltA 7-Ala<br>rückwärts       | CTGAATCTGCTGGCCGGCCGCTGCT<br>GCTGCTGCTGCTGCTGCGTGGATCA | Synthese der DltA 7-Alanin Mutante  |
| DltC S36A<br>vorwärts         | TTGCTTGATGCTTTTTGGAACAGT                               | Synthese der DltC S36A Mutante      |
| DltC S36A<br>rückwärts        | ACTGTTCCAAAAGCATCAAGCAA                                | Synthese der DltC S36A Mutante      |
| DltB NheI<br>vorwärts         | CTTAGTGCTAGCATGACGCCTTACAGCTCGTTTT                     | Synthese der <i>dltB</i> Konstrukte |
| DltB<br>rückwärts             | CGTTGACTCGAGATGGTGGTGATGAAATGGTTTT                     | Synthese der <i>dltB</i> Konstrukte |
| DltD Wildtyp NdeI<br>vorwärts | GCGGGACATATGAAAAAGCGTTTTTTCGGTC                        | Synthese der <i>dltD</i> Konstrukte |

|                                |                                    |  |
|--------------------------------|------------------------------------|--|
| DltD verkürzt NdeI<br>vorwärts | GCTAGACATATGACAGGCTTCATCACCGATA    | Synthese der <i>dltD</i><br>Konstrukte |
| DltD XhoI<br>rückwärts         | CGAGATCTCGAGGGATGAAGTGACTTTTCCGGTT | Synthese der <i>dltD</i><br>Konstrukte |

**Tabelle 6:** Für molekularbiologische Experimente verwendet Enzyme

| <b>Enzym</b>                            | <b>Verwendung</b>               | <b>Bezugsquelle</b>      |
|---|---------------------------------|--------------------------|
| BsaI, NdeI, NheI, XhoI, BamHI           | Restriktionsverdau von<br>DNA   | New England Biochemicals |
| T4 DNA Ligase                           | Ligation von DNA-<br>Fragmenten | New England Biochemicals |
| Taq-Polymerase                          | Vervielfältigung von<br>DNA     | New England Biochemicals |
| Pfu-Polymerase                          | Vervielfältigung von<br>DNA     | Stratagene               |
| Phusion High-Fidelity DNA<br>Polymerase | Vervielfältigung von<br>DNA     | Finnzymes Reagents       |
| DpnI                                    | Verdau von<br>methylierter DNA  | New England Biochemicals |

**Tabelle 7**

## 2.3. Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

### 2.3.1. Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE-Puffer: 2 M TRIS, 1 M Essigsäure 100 mM EDTA, pH 8,3

5x Agarose-Probenpuffer: 50 % (w/v) Glycerin, 0,2 % SDS (w/v),

0,05 % (w/v) Bromphenolblau, gelöst in 1x TAE

Die Größe von Nukleinsäuren wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese bestimmt. Zur Herstellung der Agarosegele wurde das entsprechende Masseprozent (1 % oder 2 %) Agarose in 1x TAE-Puffer gegeben und bis zur vollständigen Auflösung erhitzt. Die Flüssigkeit wurde mit 2 % (v/v) Ethidiumbromidlösung (Stammlösung 10 mg/ml) versetzt und in eine

Gelkammer zum Auspolymerisieren gegeben. Die zu untersuchende Lösung wurde mit Agarosegel-Probenpuffer versetzt und in die Probestaschen des Agarosegels gegeben. Zur qualitativen Analyse wurde ein Größenstandard auf das Gel mit aufgetragen.

### 2.3.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung oder zur gerichteten Mutagenese von DNA wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) genutzt. Die Reaktion nutzt die Eigenschaften bestimmter DNA-Polymerasen aus thermophilen Organismen, die bei Temperaturen über 65 °C ihre höchste Aktivität besitzen. Der Ablauf einer Standard-PCR ist in Abbildung 17 dargestellt.

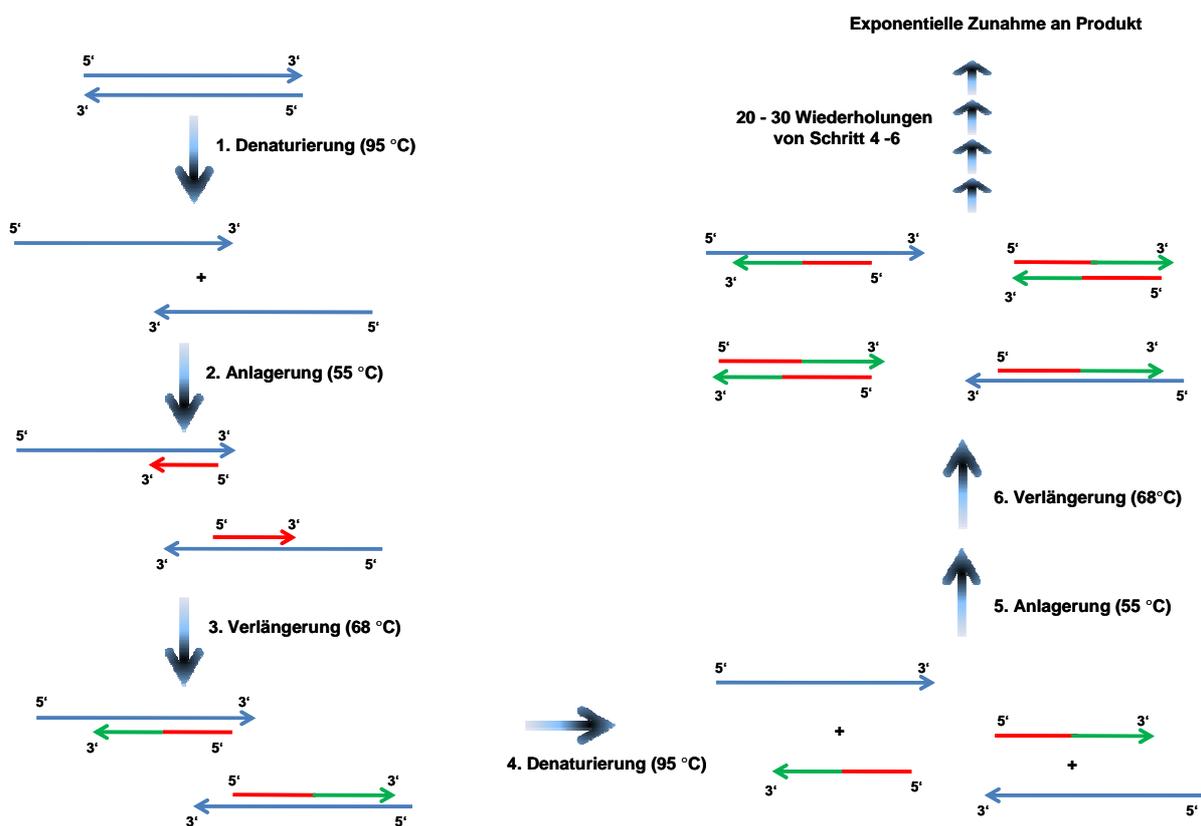


Abbildung 17: Schematische Darstellung einer PCR-Reaktion.

Um die optimale Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide zu ermitteln, wurde ein erster Test mit einem Gradienten von 10 °C um die vom Hersteller angegebene Denaturierungstemperatur genutzt. Je nach verwendeter Polymerase, Oligonukleotide, DNA-Vorlage und gewünschtem Produkt wurden die Protokolle in Bezug auf die optimalen Temperaturen und Zeiten der einzelnen Schritte angepasst.

Gemein haben alle Protokolle das initiale Denaturieren am Anfang der PCR bei ca. 95 °C für mindestens 30 Sekunden. Jeder einzelne Zyklus begann dann mit einem Denaturierungsschritt bei 95 °C für mindestens 10 Sekunden. Die Anlagerung der Oligonukleotide an die DNA-Vorlage erfolgte bei geeigneter Temperatur, in der Regel zwischen 55 °C und 75 °C, für mindestens 10 Sekunden. Die Verlängerungszeit war abhängig von der Polymerase und der Größe des gewünschten Fragments. Für Taq-Polymerase wurde 1 Minute pro Kilobase, für Pfu-Polymerase 2 Minuten pro Kilobase und für Phusion 30 Sekunden pro Kilobase verwendet. Das jeweilige PCR-Protokoll wurde für jede Reaktion optimiert um die geeigneten Bedingungen zu ermitteln.

Für die Mutagenese einzelner Aminosäuren wurden die Oligonukleotide passend gewählt und die PCR wie oben beschrieben angepasst durchgeführt. Nach der PCR-Reaktion wurde der Ansatz mit DpnI verdaut. DpnI hydrolysiert methylierte DNA, so dass die unmutierten Plasmide aus *Escherichia coli*, die methyliert sind, nicht in die Zellen transformiert wurden.

Um den Erfolg einer PCR zu bestimmen wurde mit den transformierten Zellen eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurde ein Teil einer Kolonie mit einem Zahnstocher von der Agarplatte in ein Eppendorfgefäß mit sterilem H<sub>2</sub>O überführt. Nach Zugabe von Oligonukleotiden, dNTPs, Puffer, DNA-Vorlage und der Taq-Polymerase wurde die PCR passend zu Oligonukleotiden und DNA-Vorlage durchgeführt, allerdings wurde der initiale Denaturierungsschritt um 5 Minuten verlängert, um die Zellen aufzuschließen. Die Anwesenheit einer PCR-Produktbande mit der erwarteten Größe nach Agarose-Gelelektrophorese, zeigte die erfolgreiche Transformation.

Alternativ zur Kolonie-PCR wurde von einer Kolonie nach der Transformation eine 4 ml LB-Kultur angezogen, mit der dann eine Plasmid-Isolation mit einem geeigneten *Kit* durchgeführt wurde. Das erhaltene Plasmid wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und die Fragmente mit Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

### 2.3.3. Konzentrationsbestimmung von nukleinsäurehaltigen Lösungen

Die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung wurde durch die Absorption von UV-Licht der Wellenlänge 260 nm bestimmt. Dazu wurde die Lösung in einer geeigneten Verdünnung oder unverdünnt in eine Küvette mit der Schichtdicke 1 cm gegeben und in einem Photometer die Absorption gemessen. Die DNA-Konzentration kann aus der gemessenen Absorption nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet werden (Gleichung 1).

$$E = c * d * \varepsilon \qquad \text{Gleichung 1}$$

E ... Absorption

c ... Konzentration der DNA (M)

d ... Schichtdicke (cm)

$\varepsilon$  ... Absorptionskoeffizient ( $M^{-1} * cm^{-1}$ )

Anhand der bekannten Schichtdicke und des bekannten Absorptionskoeffizienten von DNA, kann Gleichung 1 umgestellt werden um die Konzentration der DNA zu berechnen (Gleichung 2).

$$c \text{ (DNA)} = E * 50 \mu\text{g/ml} * \text{Verdünnung} \qquad \text{Gleichung 2}$$

### 2.3.4. Reinigung von DNA

Um DNA Fragmente und Plasmide zu reinigen wurden *Kits* verschiedener Hersteller benutzt (Tabelle 2). Alle *Kits* nutzen eine anionische Membran um die DNA zu binden, die dann mit Ethanol gewaschen wird. Die Elution erfolgt mit sterilem Wasser oder dem entsprechendem Elutionspuffer aus dem *Kit*.

### 2.3.5. Enzymatischer Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Restriktionsenzyme der Firma New England Biochemicals (NEB) wurden genutzt um DNA an bestimmten Stellen zu schneiden. Diese Enzyme erkennen eine bestimmte DNA-Sequenz und schneiden die DNA an dieser Stelle oder in einem definierten Abstand. Anhand der

bekannten Schnittstellen können gezielt Fragmente definierter Größe und mit bestimmten Basen an den Enden erzeugt werden. Die erhaltenen Fragmente können elektrophoretisch untersucht oder ligiert werden. Ein typischer Ansatz besteht aus 5 µg der DNA, dem entsprechend verdünnten Puffer, BSA und 5 *units* des Enzyms. Eine *unit* ist dabei die vom Hersteller angegebene Menge Enzym, die 1 µg DNA in einer Stunde schneidet. Der Ansatz wurde für 2 h bei der optimalen Temperatur für das Enzym, meist 37 °C, inkubiert und anschließend mit einem DNA-Reinigungs *Kit* gereinigt. Der Erfolg des Restriktionsverdau wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

### **2.3.6. Ligation von Nukleinsäuren**

Für die Insertion von Genen in Plasmide, wurden sowohl die Gene als auch die Plasmide mit den passenden Restriktionsenzymen verdaut. Die Verdauungen wurden mit zwei Enzymen durchgeführt, die verschiedene DNA-Sequenzen spalten, um einen Einbau mit der korrekten Leserichtung sicherzustellen. Nach dem Verdau wurden Plasmid und Gen getrennt mit einem DNA-Extraktions *Kit* gereinigt. Das Plasmid wurde dann mit Antarctic Phosphatase dephosphoryliert, um eine Selbstligation zu verhindern. Plasmid und Gen wurden im Verhältnis 1:3 zusammengegeben und bei Raumtemperatur in der Anwesenheit von T4-DNA-Ligase für eine halbe Stunde inkubiert. Mit einem Drittel des Ansatzes erfolgte dann die erste Transformation in XL1- und Top10-Zellen. Der restliche Ansatz wurde bei 7 °C gelagert und nach 24 Stunden und 48 Stunden wurden weitere Transformationen vorgenommen. Transformanten wurden mittels Kolonie-PCR auf die Anwesenheit des Genes untersucht.

### **2.3.7. Herstellung chemokompetenter *Escherichia coli* Zellen**

LB-Medium: 1 % Trypton/Pepton (w/v), 1 % NaCl (w/v), 0,5 % Hefeextrakt (w/v)

Um Plasmide in die verwendeten *E. coli* Stämme zu transformieren, wurden von diesen Stämmen mittels Calciumchlorid chemokompetente Zellen hergestellt.

Dazu wurden 50 ml LB Medium aus einer über Nacht Kultur mit den entsprechenden Zellen angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C inkubiert, bis sie eine optische Dichte (OD) von circa 0,4 hatte. Die Zellen wurden dann für 10 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend bei

5000 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 40 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und nachdem es 5 Minuten auf Eis gekühlt wurde, erneut bei 5000 g für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 2 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und für 2 Stunden auf Eis gekühlt. Zum Schluss wurde 2 ml 50 % Glycerin-Lösung hinzu gegeben und die Mischung zu je 200 µl in Eppendorf-Gefäße verteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur Benutzung aufbewahrt.

### **2.3.8. Transformation von Nukleinsäuren in kompetente *Escherichia coli* Zellen**

LB-Agar-Platten: LB-Medium + 15 g/l Agar-Agar

Um die Zielproteine zu exprimieren wurden chemokompetente Zellen mit den gewünschten Plasmiden transformiert. Dazu wurden die Zellen direkt nach dem Auftauen 30 min mit dem Plasmid bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 42 °C für 90 Sekunden. Die Zellen wurden dann aus Eis abgekühlt und anschließend für 45 min bei 37 °C inkubiert. Zum Schluss erfolgte das Ausplattieren von 200 µl der Zellsuspension auf eine LB-Agar-Platte mit den entsprechenden Antibiotika. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Kolonien am nächsten Tag begutachtet.

### **2.3.9. Vervielfältigung von Plasmiden**

Zur Vervielfältigung wurden Plasmide in XL1- oder Top10-Zellen transformiert. Von den so erhaltenen Kolonien wurden über Nacht Kulturen in 4 ml LB angesetzt, die am nächsten Tag mittels Zentrifugation bei 5000 g für 20 Minuten geerntet wurden. Mit einem DNA-Reinigungs *Kit* wurden die Plasmide abschließend isoliert.

### **2.3.10. Sequenzierung von Plasmiden**

Um die Sequenz von Plasmiden zu überprüfen wurden diese sequenziert. Dazu wurde die DNA-haltige Lösung (0,5 µg/µl) an einen kommerziellen Anbieter von DNA-Sequenzierungen gesendet wo die Sequenzierung durch die Kettenabbruchmethode nach Sanger et al., 1977 erfolgte.

### **2.3.11. Rekombinante Produktion von Proteinen in transformierten *Escherichia coli* Zellen in LB-Medium**

Die hier untersuchten Proteine wurden alle rekombinant in *E. coli* Zellen produziert. Dazu wurden die transformierten Zellen in 4 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika bei 37 °C über Nacht inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde dann am nächsten Tag die LB-Medium Hauptkultur mit einer Verdünnung von 1:100 angeimpft. Wenn nicht anders angegeben wurde die Hauptkultur dann bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Dabei wurde regelmäßig die optische Dichte der Suspension gemessen. Sobald die OD den gewünschten Wert erreicht hatte, wurde die Expression mit der geeigneten Menge IPTG induziert. Die Dauer der Expression variierte je nach exprimierten Protein. Je nach Bedarf wurde zwischen 4 h und 24 h exprimiert. Auch die Temperatur während der Expression wurde an das zu exprimierende Protein angepasst und variierte zwischen 4 °C und 37 °C.

Am Ende der Expression wurden die Zellen mittels Zentrifugation für 20 Minuten bei 6000 g pelletiert. Das Pellet wurde direkt weiter verarbeitet oder zur Lagerung bei -80 °C eingefroren.

### **2.3.12. Rekombinante Produktion von Proteinen in transformierten *Escherichia coli* Zellen in M9-Medium**

10x M9-Puffer: 59,2 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 30 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g/l NaCl

1000x MgSO<sub>4</sub>: 250g/l MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O

1000x CaCl<sub>2</sub>: 14 g/l CaCl<sub>2</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O

100x NH<sub>4</sub>Cl: 100 g/l NH<sub>4</sub>Cl

10x Glucose: 20-100 g/l

Für bestimmte Untersuchungen wurden speziell markierte Proteinproben benötigt. Die Expression dazu wurde in M9-Minimalmedium durchgeführt. Dadurch kann, im Gegensatz zu LB-Vollmedium, kontrolliert werden welche Chemikalien die Zellen zum Wachstum nutzen.

Um Selenomethionin markiertes Protein zu erhalten, wurde M9-Medium mit den Aminosäuren Lysin, Phenylalanin, Threonin (je 100 mg/l Medium), Isoleucin, Leucin, Valin (je 50 mg/l Medium) versetzt. Dadurch wird die Methioninsynthese in den Zellen inhibiert (Vanduyne et al., 1993). Selenomethionin (60 mg/l Medium) wurde ebenfalls zugegeben, welches von den Zellen dann anstelle von schwefelhaltigem Methionin in der Proteinsynthese verwendet wurde.

Um  $^{13}\text{C}$  markierte Proteine zu erhalten, wurde M9-Medium mit  $^{13}\text{C}$ -Glucose anstelle von unmarkierter Glucose versetzt. Die verwendete Menge variierte dabei zwischen 2-10 g/l Medium und wurde für jede Expression optimiert. Die Optimierung erfolgte dabei mit unmarkierter Glucose. Um  $^{15}\text{N}$ -markiertes Protein zu erhalten wurde das M9-Medium mit  $^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$  (10 mg/l Medium) versetzt. Um  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiertes Protein zu erhalten, wurde sowohl  $^{13}\text{C}$ -Glucose als auch  $^{15}\text{N-NH}_4\text{Cl}$  in den oben genannten Konzentrationen zugegeben.

Für Expression in M9-Medium wurde die Vorkultur in LB-Medium wie bei einer Expression mit LB-Medium über Nacht inkubiert. Um bei der Übertragung das M9-Medium nicht mit LB-Medium zu kontaminieren, wurde die Vorkultur bei 5000 g für 20 min zentrifugiert und das Zellpellet in M9-Medium resuspendiert. Mit dieser Suspension wurde dann die M9-Hauptkultur angeimpft. Die weiteren Expressionsbedingungen wie Temperatur, Dauer, IPTG-Menge und Zellernte waren dann dieselben wie bei einer Expression mit LB-Medium

### **2.3.13. Zellaufschluss von *E. coli* Zellen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *E. coli* Zellen mit Ultraschall-Behandlung aufgeschlossen. Bei dieser Methode zerstört die thermische und kinetische Energie des Ultraschalls die Zellwände der Bakterien.

Zuerst wurden die Zellen in geeigneten Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde dann in Eiswasser gestellt, um der Erwärmung durch den Aufschluss entgegenzuwirken. Die Ultraschallimpulse wurden mit einer konischen Ultraschallsonde appliziert. Dabei wurden Pulse von einer Sekunde Dauer, unterbrochen von anderthalb Sekunden Pause verwendet, um ein zu starkes Erhitzen der Probe zu vermeiden.

## 2.4. Biochemische Methoden

### 2.4.1. Diskontinuierliche Polyacrylamid Gelelektrophorese

2x SDS-PAGE Sammelgelpuffer: 0,88 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid, 0,8 ml 0,5 M

TRIS/HCl pH 6,8, 2,4 ml H<sub>2</sub>O, 50 µl 10 % SDS, 50 µl 10 % APS, 3 µl TEMED

2x SDS- PAGE Trenngelpuffer: 4,2 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid, 3,1 ml 1,5 M

TRIS/HCl pH 8,8, 0,9 ml H<sub>2</sub>O, 60 µl 10 % SDS, 60 µl 10 % APS, 4 µl TEMED

3x SDS-PAGE Probenpuffer: 17,5 % 1 M TRIS/HCl pH 6,8, 15 % Glycerin,

50 % SDS (aus 10 % iger Lösung), 5 % 2-Mercaptoethanol, 12,5 % Bromphenolblau

10x Laemmli-Laufpuffer für SDS-PAGE: 250 mM TRIS-Base, 1,9 M Glycin,

1% (w/v) SDS, pH 8,9

Fairbanks A: 10 % Essigsäure (v/v), 25 % Isopropanol (v/v),

0,05 % Coomassie-Blau (w/v)

Fairbanks D: 10 % Essigsäure (v/v)

Um die Reinheit und Größe von Proteinen abschätzen zu können, wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese nach Laemmli 1970 verwendet. Dabei enthält der Ladepuffer das Detergenz Natrium-Dodecylsulfat (SDS) und 2-Mercaptoethanol welches Disulfidbrücken reduziert. Durch diese Chemikalien und eine Erwärmung der Probe auf 95 °C für 5 Minuten wurden die Proteine in der Probe denaturiert. Das Gel besteht aus quer vernetztem Acrylamid, durch dessen Maschen die Proteine einer Probe nach Größe aufgetrennt werden. Das verwendete Gel bestand aus einem Sammelgel mit 6,4 % Acrylamid um die Probe nach dem Auftragen aufzukonzentrieren. Die Auftrennung der Proteine in der Probe erfolgte im Trenngel, das je nach erwarteter Größe der Proteine und weiterer Verwendung des Geles eine Konzentration von 8%, 12% oder 15% Acrylamid enthielt. Die Proben wurden vorher mit Ladepuffer der passenden Konzentration gemischt. Im Gel bewegen sich die Proteine entlang des elektrischen Stromes zur Anode, da sie durch die Anlagerung von SDS eine negative Ladung besitzen. Je größer das Protein, desto langsamer können sie die Maschen des Polyacrylamidgels durchqueren. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde das Gel mit Fairbanks A gefärbt und überschüssiges Färbemittel mit Fairbanks D entfernt. Die Größenbestimmung der Proteinprobe erfolgte anhand eines kommerziellen Proteingemisches aus verschiedenen Proteinen bekannter Größe.

Um den Einfluss von Disulfidbrücken zu untersuchen wurden oxidierende Gele genutzt. Dabei enthält der Ladepuffer kein 2-Mercaptoethanol, so dass Disulfidbrücken nicht aufgetrennt werden. Somit können auch durch Cystine gebildete Oligomere beobachtet werden.

#### **2.4.2. TRIS/TRICINE PAGE**

10x Kathodenpuffer: 60,5 g TRIS/HCl, 89,6 g TRICINE, 5,0 g SDS, add 500 ml H<sub>2</sub>O

10x Anodenpuffer: 121 g TRIS/HCl, pH 8,9, add 500 ml H<sub>2</sub>O

3x SDS-Probenpuffer: 1,5 ml 80% glycerol, 5ml (10%) SDS, 1,75 ml 10x

Kathodenpuffer, 1,25 ml Bromphenolblau, 0,5 µl 2-Mercaptoethanol

3x Gelpuffer: 181,5 g TRIS/HCl, 1,5 g SDS, pH 8,45, add 500 ml H<sub>2</sub>O

Trenngel: 66,7 µl H<sub>2</sub>O, 0,4 ml 80% Glycerin, 1,33 ml 3x Gel-Puffer, 2,2 ml 30%

Acrylamid/Bisacrylamid, 2 µl TEMED, 10µl APS

Sammelgel: 1,24 ml H<sub>2</sub>O, 0,5 ml 3x Gelpuffer, 0,26 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid, 2 µl TEMED, 5 µl APS

Da die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese nach Laemmli 1970 bei Proteinen unter 20 kDa nur noch eine schlechte Auftrennung der einzelnen Proteinbanden ermöglicht, wurde für die Untersuchungen von DltC die TRIS/TRICINE-PAGE (Schagger et al., 1988) genutzt. Das Sammelgel enthielt dabei 4 % Polyacrylamid, das Trenngel 16,5 % Acrylamid.

#### **2.4.3. Proteindetektion mittels Immunoblotting**

10x Transferpuffer: 0,25 M TRIS/HCl, 1,92 M Glycin

1x Transferpuffer: 1/10 10x Transferpuffer, 20 % (v/v) MeOH

10x TBS: 500 mM TRIS/HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,6

1x TBST: 1/10 10x TBS + 0,1 % (v/v) Tween20

Blocklösung: 1/10 10x TBS + 1 % (w/v) Milchpulver

AP-Puffer: 100 mM NaCl, 100 mM TRIS/HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> pH 9,5

NBT: 50 mg/ml in 70 % (v/v) DMF

BCIP: 50 mg/ml in 100 % (v/v) DMF

Um Proteine auch in geringeren Mengen eindeutig zu identifizieren, wurde Immunoblotting genutzt. Dabei wird die Proteinprobe zuerst mit diskontinuierlicher Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mittels dem halbtrocken Verfahren in einer *Western-Blot* Apparatur, auf eine PVDF-Membran übertragen. In der Blotting-Apparatur migrieren die Proteine in Transferpuffer durch Anlegen eines elektrischen Stromes aus dem Gel in die Membran. Diese wurde dann zuerst mit einer milchpulverhaltigen Blocklösung inkubiert um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach erfolgte die Bindung des primären Antikörpers an passende Bindungsstellen von Proteinen auf der Membran in Blocklösung. In der vorliegenden Arbeit wurde als primärer Antikörper ausschließlich Maus Anti-His<sub>6</sub> IgG, der die Abfolge von sechs Histidinen erkennt und bindet, wie sie im His-tag vorkommt. Nachdem ungebundener primärer Antikörper mit mehreren Waschschritten mit TBST entfernt wurde, erfolgte die Bindung des sekundären Antikörpers in Blocklösung. Der sekundäre Antikörper stammt aus der Ziege, bindet an Antikörper von Mäusen und ist mit einem Protein zum Nachweis gekoppelt. Das Nachweisprotein war entweder Meerrettich Peroxidase oder Alkalische Phosphatase. Je nachdem welcher sekundäre Antikörper verwendet wurde, unterschied sich das weitere Vorgehen. Wenn Meerrettich Peroxidase genutzt wurde, erfolgte die Visualisierung der Bindungsstellen mittels ECL-Lösung. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich Peroxidase setzt dabei das Luminol in der ECL-Lösung zu 3-Aminophthalat um, wobei sichtbares Licht abgegeben wird. Bei Alkalischer Phosphatase als sekundärem Antikörper wird BCIP von der Alkalischen Phosphatase dephosphoryliert. Daraufhin dimerisiert dephosphoryliertes BCIP und reduziert NBT, welches ein blaues unlösliches Präzipitat bildet.

#### **2.4.4. Affinitätschromatographie**

IMAC Auftragspuffer: 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol pH 7,8

IMAC Elutionspuffer: 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol pH 7,8

Alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proteine wurden rekombinant hergestellt und besaßen zur vereinfachten Reinigung einen His-tag für Affinitätschromatographie. Diese Methode beruht auf der Anreicherung des Zielproteins auf der Chromatographiesäule durch spezifische Wechselwirkungen zwischen Zielprotein und Säulenmaterial. Dazu wird die Affinität von mehreren aufeinanderfolgenden Histidinen zu zweiwertigen Metallen genutzt.

Das Säulenmaterial enthält einen Chelator, der Nickelionen komplexiert. Proteine mit mehreren aufeinanderfolgenden Histidinen wiederum komplexieren ebenfalls das Nickel. Die Bindung ist dabei umso stärker, je mehr Histidine beteiligt sind. Das gebundene Protein wird von der Säule entfernt, indem ein Puffer mit einer hohen Konzentration von Imidazol aufgetragen wird. Das Imidazol verdrängt die Histidine des Proteins vom Nickel-Komplex, so dass das Protein von der Säule gewaschen wird.

Die übliche Länge eines solchen His-*tags* beträgt zwischen sechs und zehn Histidinen, die entweder am N-Terminus oder am C-Terminus des Proteins angefügt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde immer ein sechs Histidine langer *tag* verwendet, der sich am C-Terminus des jeweiligen Proteins befindet.

#### **2.4.5. Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography* SEC)**

SEC Puffer: 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7,8

Da die Proteinproben für Kristallisationsversuche eine größtmögliche Reinheit besitzen sollten, wurde als finaler Reinigungsschritt die Größenausschlusschromatographie verwendet. Bei dieser Reinigung wandern die Proteine durch eine Säule die aus einer porösen Matrix aus Agarose und Dextran besteht. Diese Matrix besitzt Poren verschiedener Größe, in die Proteine und Chemikalien eindringen können. Dabei können kleinere Moleküle auch in kleinere Poren eindringen, wodurch sie insgesamt länger auf der Säule verbleiben als größere Moleküle. Im Endeffekt wird eine aufgetragene Probe dadurch so aufgetrennt, dass größere Moleküle früher eluieren, da sie seltener in die Poren der Matrix eindringen können, und kleinere Moleküle später. Für die Reinigung von DltA und DltC wurden Superdex 75 prep grade Säulen verwendet.

#### **2.4.6. Konzentrationserhöhung von Proteinlösungen**

Um die Konzentration von Proteinlösungen zu erhöhen wurden Amicon Centriplus Konzentratoren verwendet. Diese besitzen eine Membran die Moleküle bis zu einer bestimmten Größe durch lässt und alle größeren Moleküle zurück hält. Dabei wurde die Durchlässigkeit der Membran entsprechend der Größe des gewünschten Proteins gewählt. Die

Aufkonzentrierung erfolgt dabei in einer Zentrifuge bei 5000 g um die Geschwindigkeit des Vorgangs zu erhöhen. Während der Aufkonzentrierung wurde stichprobenartig die Proteinkonzentration bestimmt.

#### 2.4.7. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde mittels der Absorption im Wellenlängenbereich von 240-320 nm bestimmt. Der Verlauf der Absorption über den gesamten gemessenen Bereich wurde genutzt um die Reinheit der Probe abzuschätzen. Der Absorptionswert bei 280 nm diente zur Berechnung der Konzentration mithilfe des Lambert-Beerschen Gesetz berechnet werden (Gleichung 3).

$$E_{280} = c * d * \varepsilon \quad \text{Gleichung 3}$$

E ... Absorption bei 280 nm

c ... Konzentration der DNA (M)

d ... Schichtdicke (cm)

$\varepsilon$  ... Absorptionskoeffizient ( $M^{-1} * cm^{-1}$ )

Der Absorptionskoeffizient eines Proteins in denaturierter Form kann anhand der Anzahl  $n$  von Tryptophan W, Tyrosin Y und Cystin C bestimmt werden Gill et al., 1989.

$$\varepsilon_{280} = (nW \times 5500 M^{-1} * cm^{-1}) + (nY \times 1490 M^{-1} * cm^{-1}) + (nC \times 125 M^{-1} * cm^{-1}) \quad \text{Gleichung 4}$$

Zur Berechnung des Absorptionskoeffizientes der untersuchten Proteine wurde ProtParam genutzt (Gasteiger et al., 2003). Vor der Messung wurde die Proteinprobe in einer 6 M Guanidiniumhydrochloridlösung denaturiert.

#### 2.4.8. Aktivitätsmessung von DltA

Stopp-Lösung: 3,78 % (v/v) Perchlorsäure, 100 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> \* 10 H<sub>2</sub>O,  
1,4 % Aktivkohlesuspension

Die Aktivität von Adenylierungsdomänen wie DltA und DltA-Mutanten wurde mit radioaktivem Pyrophosphat (<sup>32</sup>P-PP<sub>i</sub>) gemessen. Dabei nutzt man die Reversibilität der Adenylierungsreaktion von DltA (Abbildung 18).

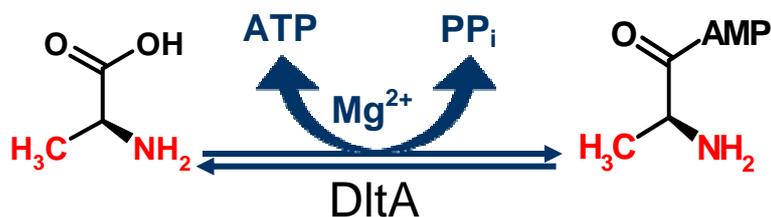


Abbildung 18: Das Reaktionsschema der ersten Teilreaktion von DltA

Dem Reaktionsansatz aus Protein in SEC-Puffer, ATP, D-Alanin und PP<sub>i</sub> wird zusätzlich <sup>32</sup>P-markiertes PP<sub>i</sub> zugegeben. Während der Rückreaktion wird dieses dann in ATP eingebaut. Dadurch entsteht <sup>32</sup>P-ATP. Durch Zugabe der aktivkohlehaltigen Stopplösung wird das ATP ausgefällt. Mittels Zentrifugation (20 min bei 20000 g) wird die Aktivkohlefraktion mit <sup>32</sup>P-ATP anschließend von der Lösung getrennt. Da <sup>32</sup>P-PP<sub>i</sub> in der flüssigen Phase verbleibt ist im Pellet nur umgesetztes <sup>32</sup>P-ATP vorhanden. Das Pellet wird zweimal mit Wasser gewaschen und erneut abzentrifugiert und zum Schluss in Szintilationsflüssigkeit resuspendiert. Mit einem Szintilationszähler kann die Radioaktivität und damit der Anteil von radioaktiven ATP gemessen werden. Der Anteil an umgesetzten ATP korreliert direkt linear mit der Aktivität von DltA.

#### 2.4.9. Kristallisation von Proteinen

Um Proteine zu kristallisieren, wurde die Dampfdiffusionsmethode genutzt. Dabei wird die Proteinprobe mit einem Kristallisationspuffer, der in der Regel einen Puffer und ein Präzipitans enthält, gemischt und in ein geschlossenes System mit einem Reservoir aus reinem Kristallisationspuffer gegeben. Der Kontakt zwischen der verdünnten Proteinprobe

und Reservoir besteht dabei nur über die Gasphase. Dadurch diffundiert Wasserdampf aus der Proteinprobe in das Reservoir, wodurch die Proteinkonzentration kontinuierlich zunimmt. Durch diese Methode ist sichergestellt, dass die Proteinkonzentration am Anfang nicht zu hoch ist und das Protein ausfällt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode des sitzenden Tropfens genutzt. Dabei befinden sich die Proteinprobe erhöht auf einem Plateau und das Reservoir in einem räumlich getrennten Abschnitt, aber verbunden über die Gasphase. Konkret wurden die in Tabelle 2 angegebenen Platten verwendet.

Für erste Kristallisationsversuche wurden dabei 96 *well* Platten und ein Pipettierroboter verwendet, um alle Bedingungen der Kristallisationskits (Tabelle 2) zu testen. Die Platten wurden mit einem Bildverarbeitungssystem untersucht, um geeignete Bedingungen zu finden. Bedingungen, bei denen Kristallisation beobachtet werden konnte, wurden in 24 *well* Platten von Hand angesetzt. Dabei wurden gezielt einzelne Bedingungen variiert, um die Kristallisation zu optimieren.

## **2.5. Biophysikalische Methoden**

### **2.5.1. Röntgenkristallographie**

Geeignete Proteinkristalle wurden mit dem im Haus vorhandenen Röntgengenerator auf ihre Röntgenstreuungsqualität getestet. Wenn möglich wurde dann sofort ein kompletter Datensatz aufgenommen. Um eine bessere Datenqualität zu erhalten oder gezielt nach der anomalen Beugung für die Phasenermittlung zu suchen wurden geeignete Kristalle am Synchrotron (BESSY, Beamline 14.1) gemessen.

Die erhaltenen Datensätze wurden mittels XDS (Kabsch 2010) oder MOSFLM (Battye et al., 2011) reduziert. Für experimentelle Phasierung wurde SHELX (Sheldrick 2008) in hkl2map (Pape *et al.*, 2004) verwendet. Bei Phasierung mit Molekularem Ersatz wurden Phaser (McCoy *et al.*, 2007) und BALBES (Long *et al.*, 2008) in CCP4 (Winn *et al.*, 2011) verwendet. Das Verfeinern der Struktur erfolgte mit Refmac5 (Murshudov *et al.*, 1997) aus CCP4 (Winn *et al.*, 2011), PHENIX (Adams et al., 2010) und Coot (Emsley et al., 2004).

## 2.5.2. NMR-Spektroskopie

Alle NMR-Messungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Jochen Balbach am Institut für Physik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

Die  $^{13}\text{C}$ - und/oder  $^{15}\text{N}$ -markierten, sowie alle unmarkierten Proteinproben wurden in 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, pH 7,8 mit 10 % (v/v)  $\text{D}_2\text{O}$  bei 298 K gemessen. Als erstes wurden Standard Triple Resonanz Spektren (HNCA, HNCACAB, HN(CO)CACB) mit  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiertem DltC S36A und DltC\_wt aufgenommen um die Kreuzsignale der Spektren den Aminosäuren von DltC zuzuordnen. Nachdem die Position der Kreuzsignale der einzelnen Aminosäuren für DltC bestimmt wurden, konnte  $^{15}\text{N}$ -markiertes Protein genutzt werden um  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren aufzunehmen. Titrationsexperimente wurden unter Verwendung von  $^{15}\text{N}$ -markierten DltC und unmarkiertem DltA durchgeführt. Dabei wurde DltA schrittweise zu DltC titriert, bis mindestens ein Verhältnis von 1:1 erreicht war und nach jeder Zugabe ein  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum aufgenommen. Titrationsen mit Substraten oder Inhibitoren wurden auf dieselbe Weise durchgeführt.

Die Messdaten wurden mit Topspin 2.1 (Bruker Biospin) aufgenommen, mit NMRPipe (Delaglio et al., 1995) prozessiert und mit NMRView (Johnson et al., 1994) analysiert.

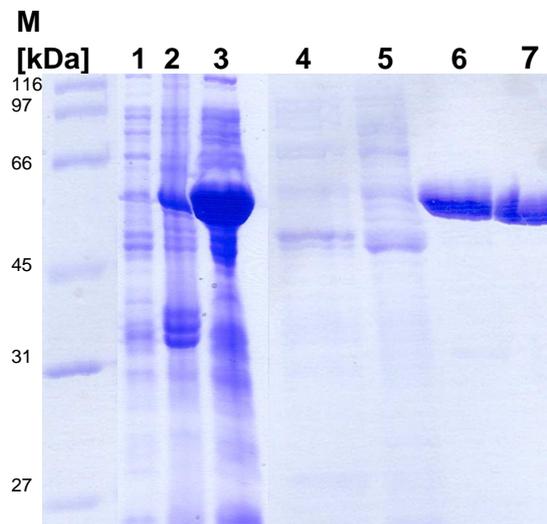
### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1. DltA

##### 3.1.1. Proteinexpression und –reinigung von Wildtyp DltA

Die Transformation des bereits vorhandenen Plasmides pQE60/*dltA*\_wt in BL21 (DE3) Zellen und die Induktion mit 1 mM IPTG resultierten in der Überexpression von DltA\_wt in den Zellen. Nach dem Zellaufschluss mittels Ultraschallbehandlung befand sich DltA\_wt größtenteils in der löslichen Fraktion.

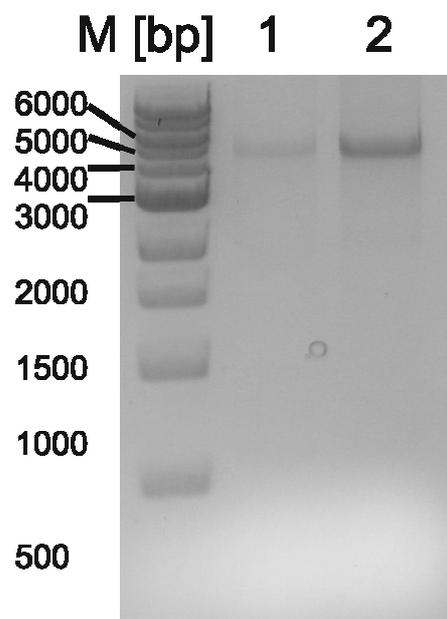
Die Nickel-Affinitätschromatographie als erster Reinigungsschritt war erfolgreich und entfernte ungefähr 90 % aller Verunreinigungen. Mit der Größenausschlusschromatographie als zweitem Reinigungsschritt konnte DltA\_wt als einzelne Bande im SDS-Polyacrylamid Gel, also ungefähr 99 % Reinheit erhalten werden. Die Ausbeute betrug circa 70 mg gereinigtes DltA pro Liter Medium. In Abbildung 19 ist die Expression und Reinigung von DltA\_wt gezeigt.



**Abbildung 19:** 12% SDS-Polyacrylamidgel mit Expression und Reinigung von DltA\_wt (56 kDa); M: Proteinstandard in Kilodalton, 1: Zellen vor Induktion, 2: unlösliche Fraktion nach Zellaufschluss, 3: lösliche Fraktion nach Zellaufschluss, 4: Durchfluss nach Affinitätschromatographie, 5: Waschfraktion nach Affinitätschromatographie, 6: Elution nach Affinitätschromatographie, 7: Elution nach Größenausschlusschromatographie

### 3.1.2. Konstruktion, Expression und Reinigung der DltA-Mutanten

Um die Reste Cystein 268 zu Aspartat beziehungsweise Prolin 204 zu Alanin zu ändern, sowie den flexiblen Bereich der N-terminalen Domäne von DltA gegen sieben Alanine auszutauschen, wurde jeweils eine Mutagenese PCR mit den in Tabelle 5, Kapitel 2.2 angegebenen Oligonukleotiden durchgeführt. In allen Fällen konnte das Standard PCR Protokoll genutzt werden, um ausreichende Mengen mutiertes Plasmid zu erhalten. Als Beispiel ist in Abbildung 20 das Ergebnis nach der PCR und DpnI-Verdau für die Mutanten DltA C268D und DltA P204A gezeigt.

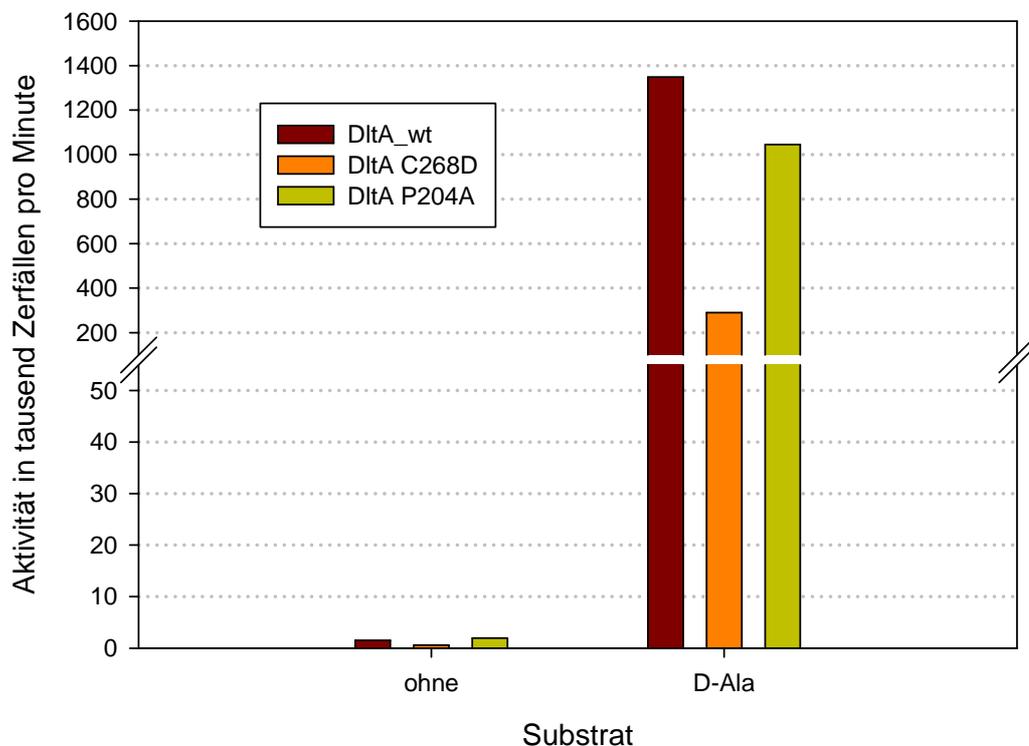


**Abbildung 20:** 1% Agarosegel nach Mutagenese PCR und DpnI Verdau der DltA-Mutanten; M: DNA-Größenstandard in Basenpaaren, 1: 10  $\mu$ l des PCR-Ansatzes für DltA Mutante P204A, 2: 10  $\mu$ l des PCR-Ansatzes für DltA Mutante C268D

Die Sequenzierung nach der Reinigung bestätigte die gewünschten Mutationen. Mit den so erhaltenen mutierten Plasmiden konnte erfolgreich eine Transformation in *E. coli* XL1 durchgeführt werden. Aus diesen Zellen wurden die Plasmide in größeren Mengen isoliert. Für eine Expression wurden die Plasmide in BL21 (DE3) Zellen transformiert. In Bezug auf Expression und Reinigung konnte mit derselben Methode wie bei DltA Wildtyp mit einer Reinheit von 99 % erhalten werden. Auch die Ausbeute war dieselbe wie beim Wildtyp, außer bei der 7-Ala-Mutante von DltA. Hier war die Ausbeute mit 60 mg gereinigtem DltA 7-Ala pro Liter Medium geringer als beim Wildtyp.

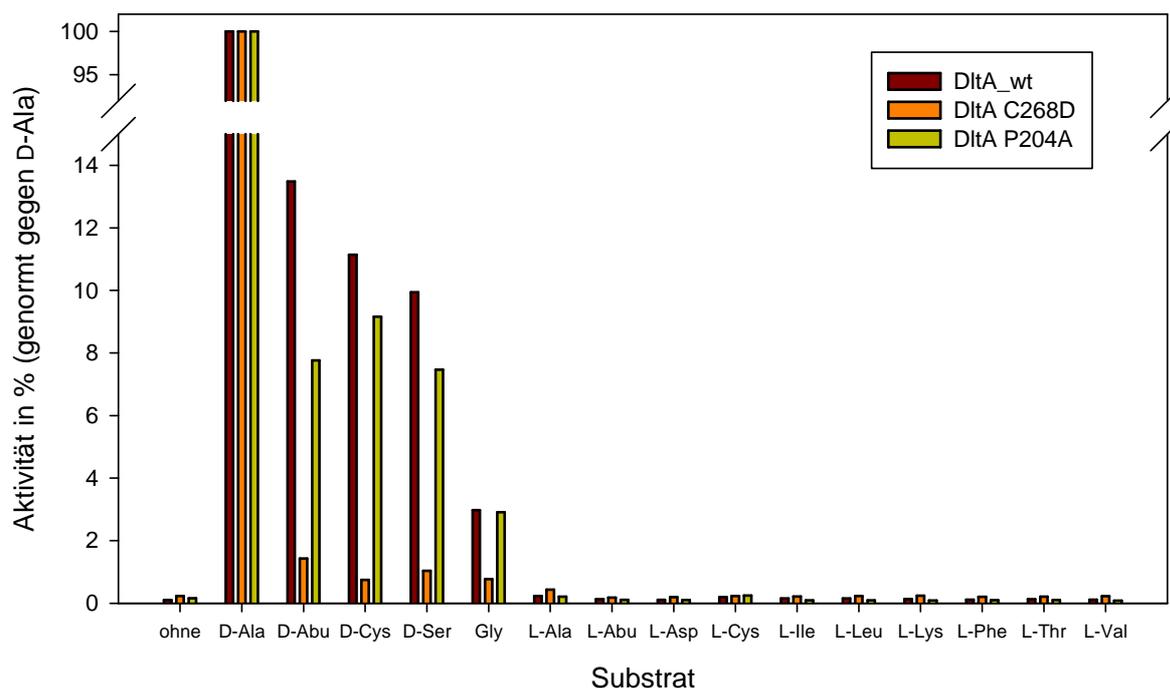
### 3.1.3. Aktivitätstests der DltA-Varianten anhand des $^{32}\text{P}$ -ATP-PP<sub>i</sub>-Austausch

Die Messungen mit dem Wildtyp von DltA konnten die bereits bekannte Spezifität für D-Ala vor allen anderen getesteten Aminosäuren bestätigen (Yonus *et al.*, 2008). Für D-Aminobuttersäure, D-Cystein, D-Serin und in geringerem Maßstab für Glycin konnte eine messbare, allerdings deutlich geringere Aktivität festgestellt werden (Abbildung 22). Die C268D-Mutante zeigte eine allgemein verringerte Aktivität (Abbildung 21), aber eine höhere Spezifität für D-Alanin (Abbildung 22).



**Abbildung 21:** Vergleich der Aktivitäten von DltA\_wt und der Mutanten DltA C268D und DltA P204 mit dem Substrat D-Alanin angegeben in gemessenen Zerfällen pro Minute.

Die Mutation des Prolin 204 zu Alanin verringerte die Aktivität (Abbildung 21), hatte aber nahezu keine Auswirkungen auf die Spezifität von DltA, die der des Wildtyps entsprach (Abbildung 22).



**Abbildung 22:** Die prozentualen Aktivitäten von DltA\_wt, DltA C268D und DltA P204, normiert nach der Aktivität für D-Alanin. Abu: Aminobuttersäure.

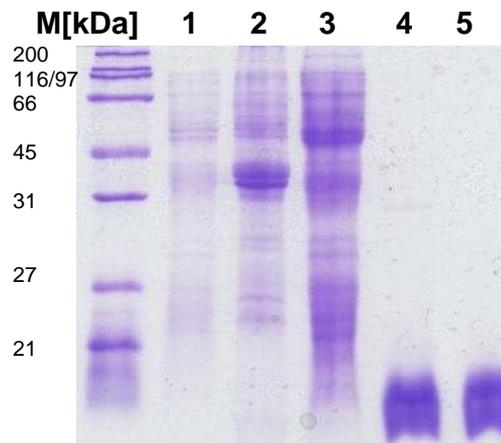
Die Mutationsstudien mit DltA in Bezug auf die Substratspezifität bestätigen den Einfluss der untersuchten Reste auf die Aktivität der Enzyme. Cystein 268 spielt eine wichtige Rolle für die spezifische Bindung von D-Alanin (Du *et al.*, 2008b; Osman *et al.*, 2009; Yonus *et al.*, 2008). Die Mutation zu Aspartat, das in *Streptococcus* Spezies anstelle des Cysteins vorkommt, zeigt dass auch Aspartat eine hohe Selektivität für D-Alanin ermöglicht. Allerdings ist die Aktivität von DltA C268D verringert. Ob auch DltA aus *Streptococcus* Spezies eine verringerte Aktivität gegenüber DltA aus *Bacillus subtilis* zeigt, müssen weitere Untersuchungen ermitteln.

Prolin 204 ist nicht direkt an der Selektion von D-Ala beteiligt. Aber die Ergebnisse demonstrieren einen Effekt der Mutation zu Alanin, indem sie die Aktivität verringern. Ob die gewünschte Beeinflussung der mutierten Helix erfolgte, ist mit den Aktivitätsmessungen nicht zu klären. Hier könnte die Kristallstruktur weiter Informationen liefern.

## 3.2. DltC

### 3.2.1. Expression und Reinigung von DltC in der Wildtyp-Form und der S36A-Mutante

Sowohl der Wildtyp als auch die S36A-Mutante von DltC aus *Bacillus subtilis* konnten in *E. coli* BL21 (DE3) mittels des Vektors pQE-60 und unter Verwendung von 1mM IPTG als Induktor exprimiert werden. Mit Nickel-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie konnte DltC isoliert werden. Abbildung 23 zeigt, dass die Affinitätschromatographie nahezu alle Verunreinigungen entfernte.



**Abbildung 23:** 12 % SDS-PAGE der Expression und Reinigung von DltC\_wt (11 kDa); M: Proteinstandard in Kilodalton, 1: Zellen vor Induktion, 2: unlösliche Fraktion nach Zellaufschluss, 3: Durchfluss der Affinitätschromatographie, 4: Elution der Affinitätschromatographie, 5: Elution der Größenausschlusschromatographie

Mit der folgenden Größenausschlusschromatographie konnten die Proteine zu 99 % Reinheit isoliert werden. Die Ausbeute an gereinigtem Protein betrug circa 85 mg pro Liter Medium. Für die Wildtypform von DltC konnte eine Dimerisierung über Disulfidverbrückung beobachtet werden. Dimer und Monomer konnten mit Größenausschlusschromatographie getrennt werden (Daten nicht gezeigt). Im Rahmen der Arbeit von Huma Yonus konnte mit HPLC und Massenspektrometrie gezeigt werden, dass DltC\_wt nach der Reinigung zu 99 % in der holo-Form vorliegt.

Um Selenomethionin-markiertes DltC S36A zu erhalten, wurde die Expression in M9-Medium vorgenommen. Ebenso wurden die  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ , bzw.  $^{15}\text{N}$ -markierten Formen des Wildtyps und der S36A-Mutante in M9-Medium exprimiert.

Sowohl Selenomethionin-markiertes DltC S36A, als auch die  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ , bzw.  $^{15}\text{N}$  markierten Formen des Wildtyps und der S36A-Mutante konnten mit denselben Methoden und zu derselben Ausbeute wie die unmarkierten Formen exprimiert und gereinigt werden.

### 3.2.2. Kristallisation und Strukturlösung von DltC S36A

Die Strukturaufklärung mit nativen Proteinkristallen unter Verwendung von Molekularem Ersatz war nicht erfolgreich. Daher wurde Phasierung über Multiple anomale Dispersion (MAD) mittels Selenomethionin-markiertem DltC S36A angestrebt. Zum Phasieren wird bei dieser Methode ungefähr ein Selenatom für 100 Aminosäurereste benötigt. Das 80 Aminosäuren große DltC besitzt als einziges Methionin das N-terminale Startmethionin, welches daher zum Phasieren ausreichend sein sollte.

Das Protein in SEC-Puffer, in einer Konzentration von 15 mg/ml, wurde in 200 nl Tropfen, gemischt im 1:1 Verhältnis mit Kristallisationspuffer, angesetzt. Proteinkristalle von Selenomethionin-markiertem DltC S36A (Abbildung 24) konnten nach dem Screening in 96 *well* Platten in drei verschiedenen Bedingungen beobachtet werden.



**Abbildung 24:** Kristalle von Selenomethionin-markiertem DltC S36A (Kristallisationspuffer 100 mM BIS/TRIS pH 5,5; 25 % w/v PEG 3350).

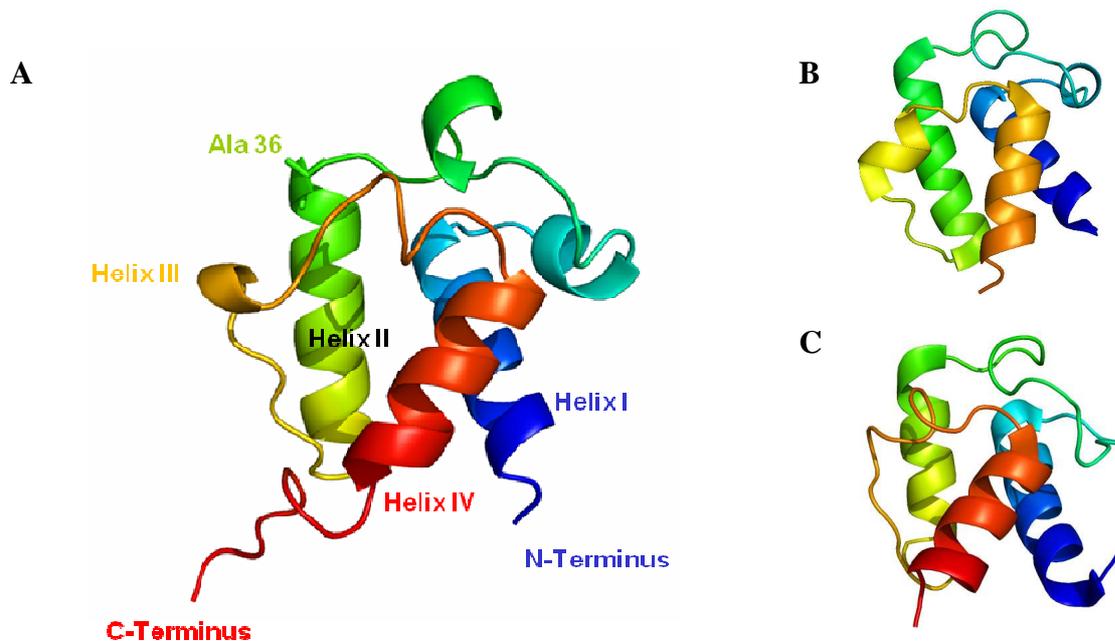
Alle Kristalle wuchsen in 100 mM BIS/TRIS pH 5,5; 25 % w/v PEG 3350. Auch wenn derselbe Puffer 200 mM NaCl oder 200 mM MgCl<sub>2</sub> enthielt konnten Kristalle beobachtet werden. Die sichtbare Kristallform war in allen drei Bedingungen gleich. Die Kristalle konnten direkt von der *Screening*-Platte genommen und zur Aufnahme der Beugungsdaten verwendet werden. Erste Messungen mit dem Röntgenstrahlungsgenerator innerhalb der Abteilung ergaben die Raumgruppe sowie die Abmessungen der Einheitszelle. Die Messungen am BESSY ermöglichten die Lokalisierung eines Selenatoms im N-terminalen Methionin. Die dadurch erhaltene Elektronendichte war ausreichend, um die Proteinstruktur zum größten Teil automatisiert zu positionieren. Mit manueller Verfeinerung konnten alle 86 Aminosäuren in die Elektronendichte eingebaut werden. Tabelle 8 gibt die Daten zur Strukturlösung der S36A-Mutante von DltC wieder.

| <i>A. Datensammlung</i>                           | peak                        | inflection               | remote = nativ<br>(hochaufgelöst) |
|---|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| Röntgeneratore                                    | BESSY<br>BL 14.1            | BESSY<br>BL 14.1         | BESSY<br>BL 14.1                  |
| Wellenlänge $\lambda$ in Å                        | 0,97976                     | 0,9799                   | 0,91841                           |
| Temperatur in K                                   | 100                         | 100                      | 100                               |
| Raumgruppe<br>(Moleküle/asymmetrische<br>Einheit) |                             | P2 <sub>1</sub><br>(1)   |                                   |
| Konstanten der Einheitszelle                      |                             |                          |                                   |
| a, b, c in Å                                      | 34,52<br>37,16<br>37,66     | 34,53<br>37,17<br>37,67  | 34,58<br>37,21<br>37,69           |
| $\alpha, \beta, \gamma$ in °                      | 90,00<br>114,84<br>90,00    | 90,00<br>114,83<br>90,00 | 90,00<br>114,82<br>90,00          |
| Auflösungsbereich in Å                            | 100 – 2,81<br>(2,88 – 2,81) | 100-2,8<br>(2,87 – 2,8)  | 100 – 1,04<br>(1,07 – 1,04)       |
| Nr. einzigartige Reflexe                          | 4006 (316)                  | 3977 (309)               | 40503 (2895)                      |
| Multiplizität                                     | 2,2 (2,2)                   | 2,2 (2,2)                | 3,6 (3,4)                         |
| Vollständigkeit in %                              | 96,4 (99,1)                 | 94,4 (96,6)              | 96,6 (94,4)                       |
| I / $\sigma$ I                                    | 36,1 (33,3)                 | 42,3 (38,4)              | 13,9 (2,5)                        |
| R <sub>meas</sub> in %                            | 2,9 (2,8)                   | 2,4 (2,5)                | 6,6 (66,6)                        |
| <b>B. Verfeinerung</b>                            |                             |                          |                                   |
| R <sub>cryst</sub> in %                           | -                           | -                        | 12,5                              |
| R <sub>free</sub> in %                            | -                           | -                        | 15,6                              |
| r.m.s.d. Bindungslängen in Å                      | -                           | -                        | 0,016                             |
| r.m.s.d. Bindungswinkel in °                      | -                           | -                        | 1,44                              |
| Mittlerer B-Faktor in Å <sup>2</sup>              | -                           | -                        | 14,58                             |
| Ramachandran Plot in %                            |                             |                          |                                   |
| Bevorzugt   | -                           | -                        | 98,51                             |
| Erlaubt   | -                           | -                        | 1,49                              |
| Nicht erlaubt                                     | -                           | -                        | 0                                 |

**Tabelle 8:** Datenstatistik für die Struktur von DltC S36A. Sofern nicht anders angegeben sind Werte in Klammern für den höchsten Auflösungsbereich.  $R_{\text{meas}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$

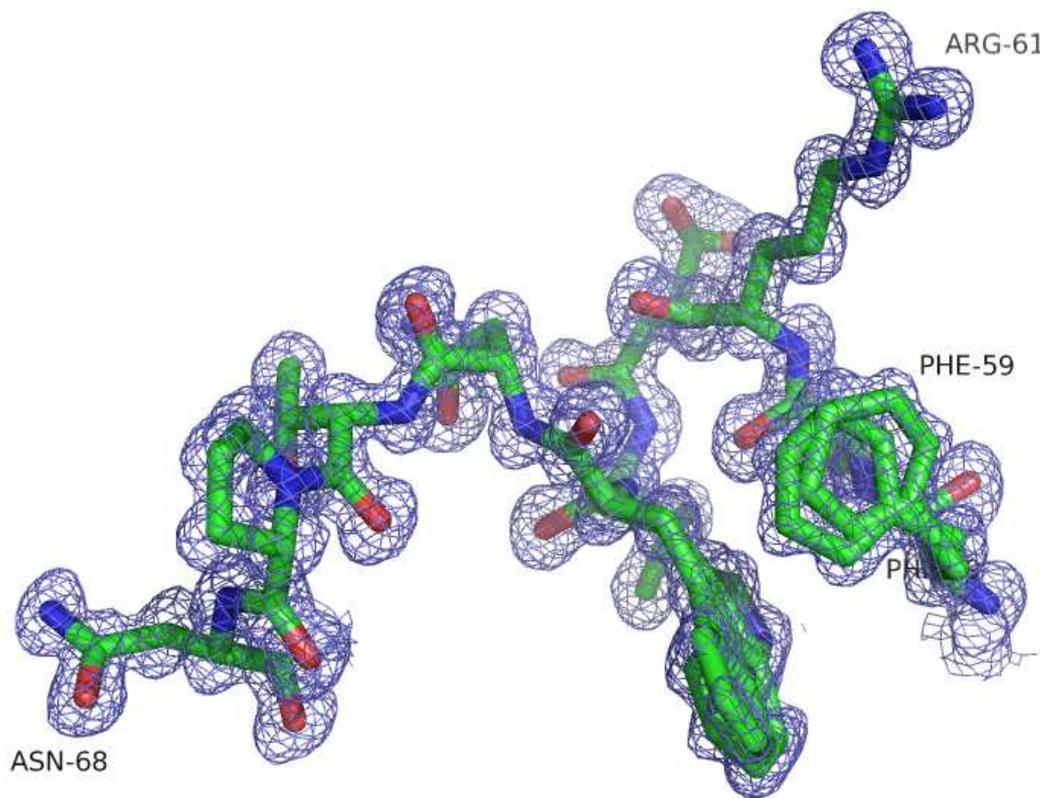
$$R_{\text{cryst}} = \sum |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| / \sum |F_{\text{obs}}|$$

Die Struktur von DltC S36A ist in Abbildung 25 gezeigt. Die sehr gute Elektronendichte ermöglichte dabei den Einbau aller Reste inklusive des kompletten C-terminalen His-tags sowie alternativer Seitenkettenkonformationen (Abbildung 26). Da DltC S36A nicht mit Phosphopantethein modifiziert werden kann, ist der Kofaktor nicht anwesend.



**Abbildung 25:** (A) DltC S36A zeigt die typische Vier-Helix Faltung eines Peptidyl-Carrier-Proteins. Alanin 36 (*stick*-Darstellung), N- und C-Terminus, sowie Helices I-IV sind beschriftet. Der Farbverlauf ist von blau am N-Terminus zu rot am C-Terminus. (B) Struktur eines ACPs (PDB-Code 1T8K, Qiu *et al.*, 2004) und (C) eines PCPs (unten, PDB-Code 2VSQ, Tanovic *et al.*, 2008) mit demselben Farbverlauf.

Die Struktur der DltC-Mutante S36A zeigt den schon für ACPs und PCPs beschriebenen Faltungstyp aus einem Bündel von vier Helices. Dabei bilden die Reste Phenylalanin 3 bis Cystein 15 die Helix I, Helix II erstreckt sich von Alanin 36 bis Phenylalanin 50 und Helix IV wird von den Aminosäuren Prolin 67 bis Leucin 77 gebildet. Helix III ist, wie schon die NMR-Struktur von Dcp (Volkman *et al.*, 2001) deutlich kürzer als die Helix III von ACPs und wird nur von Isoleucin 56, Threonin 57 und Glutamat 58 gebildet.

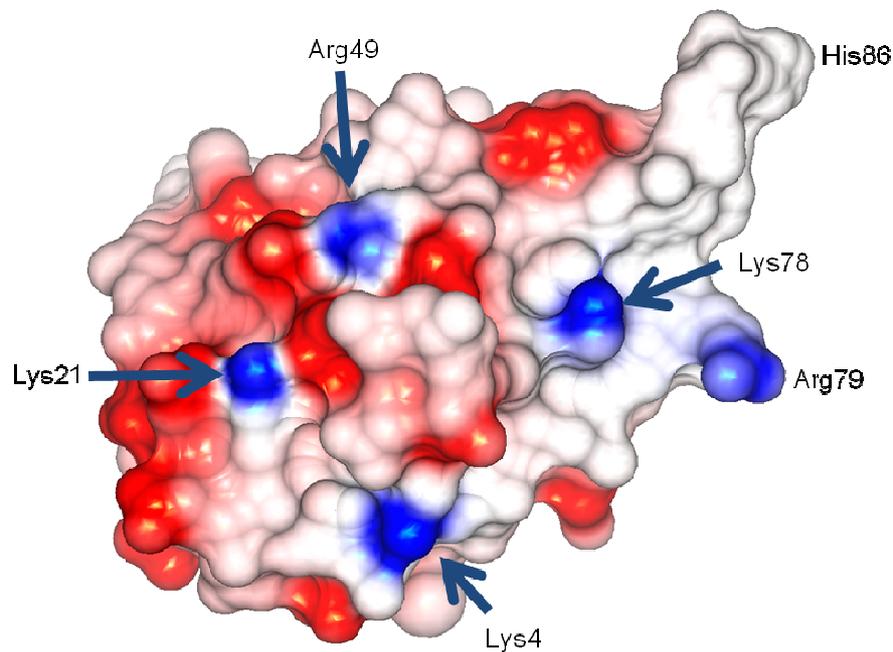


**Abbildung 26:** Die 2fofc-Elektronendichte (blaues Netz, konturiert bei  $1 \sigma$ ) der Reste Arginin 61 bis Asparagin 68 der Struktur von DltC S36A. Die gute Elektronendichte zeigt auch alternative Konformationen wie bei Phenylalanin 59.

Insgesamt besitzt die Struktur durchgehend niedrige B-Faktoren, der Durchschnitt beträgt  $14,8 \text{ \AA}^2$ . Die Werte des Peptidrückgrats betragen maximal  $15 \text{ \AA}^2$ . Einige polare Seitenketten an der Proteinoberfläche besitzen Werte bis zu  $70 \text{ \AA}^2$ , ebenso die des N-terminalen Methionins. Aber selbst die Atome des C-terminalen Histidins zeigen geringe Werte unter  $10 \text{ \AA}^2$ . Dies deutet auf eine geringe thermische Bewegung der einzelnen Atome im Molekül und somit eine stabile Konformation hin.

Dies liegt unter anderem auch daran, dass die Histidine des C-Terminus stark an polaren Wechselwirkungen mit benachbarten DltC-Molekülen im Kristallgitter beteiligt sind, wobei die Interaktionen ausschließlich über die Atome des Proteinrückgrats erfolgt. Durch die raumgruppenbedingte Anordnung der Moleküle im Kristallgitter konzentrieren sich die Interaktionen zwischen den DltC-Molekülen auf vier Kontaktflächen. Auch der N-Terminus mit dem Selenomethionin ist an Kristallkontakten beteiligt. Das Proteininnere ist vom Lösungsmittel komplett abgeschirmt und besteht vollständig aus hydrophoben Aminosäuren. Demzufolge existieren im Protein auch keinerlei Wassermoleküle oder Wasserstoffbrücken.

Der berechnete isoelektrische Punkt (pI) von DltC liegt bei 4,5. Dies bedingt eine insgesamt negativ geladene Oberfläche. Allerdings gibt es positiv geladene Aminosäuren, die einen Bereich negativen Ladung umgeben. Die positiven Stellen werden von den Resten Lysin 4, Lysin 21, Arginin 49, Lysin 78 und Arginin 79 gebildet werden (Abbildung 27). Die positiv geladenen Stellen liegen fast genau auf der gegenüberliegenden Seite von Alanin 36 und damit der Bindestelle für D-Alanin im Wildtyp.



**Abbildung 27:** Die Ladungsverteilung auf der Oberfläche von DltC S36A. Histidin 86 ist zur Orientierung eingefügt. Serin 36 liegt auf der Rückseite. Darstellung erzeugt mit Coot (Emsley *et al.*, 2004)

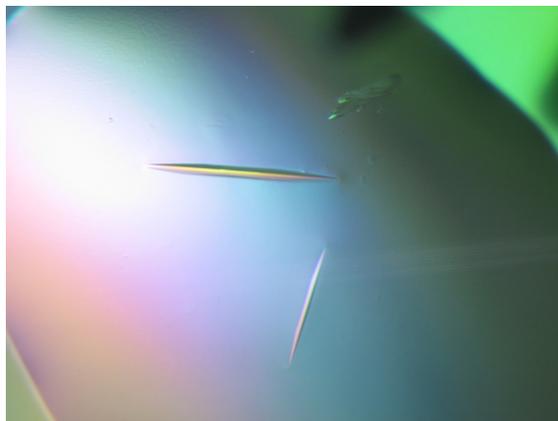
Ob diese Bereiche *in vivo* eine Rolle spielt ist unklar. Das Alanin 36 wird vollständig von der großen negativ geladenen Fläche, die den größten Teil der Oberfläche von DltC bedeckt, umgeben. Einzige Ausnahme ist die positive Ladung von Arginin 61, die sich direkt neben Alanin 36 befindet.

### 3.2.3. Kristallisation und Strukturlösungen von DltC Wildtyp

DltC konnte bereits in der Arbeit von Huma Yonus kristallisiert werden. Es gelang jedoch nicht die gemessenen Röntgenbeugungsdaten zur Strukturlösung zu verwenden, da keine geeigneten Phasen verfügbar waren, obwohl alle zu der Zeit vorhandenen Kristall- und NMR-Strukturen von CPs als Modelle für Molekularen Ersatz versucht wurden. Mit der Struktur der S36A-Mutante von DltC stand jedoch ein Modell zur Verfügung welches zur Strukturbestimmung mittels Molekularem Ersatz verwendet werden konnte. Die Daten zur Struktur von DltC\_wt I sind in Tabelle 9 angegeben.

Die Suche nach Kristallen des Wildtyps von DltC im Rahmen dieser Arbeit ergab zuerst relativ kleine Kristalle, die jedoch keine ausreichenden Beugungsdaten lieferten. In den Bedingungen (i) 100 mM BIS/TRIS pH 5,5; 200 mM Ammoniumacetat; 25 % w/v PEG 3350 sowie (ii) 95 mM Natriumcitrat pH 5,6; 19 % v/v 2-Propanol; 19 % w/v PEG 4000; 5 % v/v Glycerin, unter denen Kristalle im 96 *well* Maßstab wuchsen, wurde daher ein größeres Volumen in einer 24 *well* Platte angesetzt wurden. Die Kristallisationsversuche wurden angesetzt wie für DltC S36A beschrieben. Unter beiden Bedingungen wuchsen größere Kristalle (Abbildung 28), die direkt in der Abteilung vermessen werden konnten. Die Auswertung der Daten ergab, dass diese Kristalle eine andere Raumgruppe und andere Zellkonstanten aufwiesen als die Kristalle von DltC\_wt Kristallform I.

Ebenso wie die Kristalle der Wildtyp Form I, konnte die Struktur von DltC\_wt II mithilfe der Struktur von DltC S36A als Modell für den Molekularen Ersatz berechnet werden. Die Ergebnisse von Datensammlung und Strukturlösung von DltC\_wt II sind in Tabelle 9 zu sehen.



**Abbildung 28:** Kristalle von DltC\_wt Kristallform II (Kristallisationspuffer 95 mM Natriumcitrat pH 5,6; 19 % v/v 2-Propanol; 19 % w/v PEG 4000; 5 % v/v Glycerin).

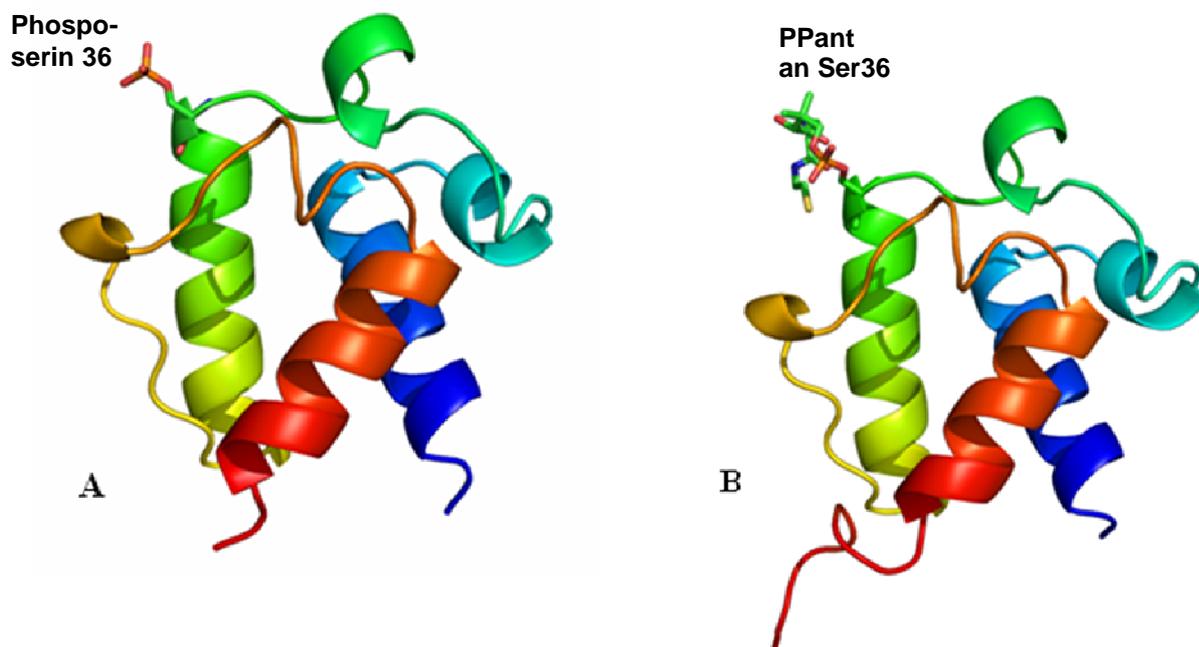
| <i>A. Datensammlung</i>                           | <b>DltC_wt Form I</b>       | <b>DltC_wt Form II</b>                 |
|---|-----------------------------|--|
| Röntgengenerator                                  | BESSY<br>BL 14.1            | Rigaku RA Micro007<br>in der Abteilung |
| Wellenlänge $\lambda$ in Å                        | 0,9184                      | 1,5418                                 |
| Temperatur in K                                   | 100                         | 100                                    |
| Raumgruppe<br>(Moleküle/asymmetrische<br>Einheit) | P6 <sub>1</sub> 22<br>(2)   | P6 <sub>5</sub> 22<br>(1)              |
| Konstanten der Einheitszelle                      |                             |  |
| a, b, c in Å                                      | 72,68<br>72,68<br>110,3     | 49,21<br>49,21<br>146,26               |
| $\alpha, \beta, \gamma$ in °                      | 90<br>90<br>120             | 90<br>90<br>120                        |
| Auflösungsbereich in Å                            | 23,91 – 2,2<br>(2,24 – 2,2) | 40,93 – 1,95<br>(2,0 – 1,95)           |
| Nr. einzigartige Reflexe                          | 9264 (442)                  | 8344 (1174)                            |
| Multiplizität                                     | 11,2 (11,5)                 | 19,5 (19,8)                            |
| Vollständigkeit in %                              | 99,9 (100)                  | 100 (100)                              |
| I / $\sigma$ I                                    | 18,7 (3,8)                  | 27,4 (6,0)                             |
| R <sub>meas</sub> in %                            | 9,6 (80,6)                  | 8,8 (56)                               |
| <b>B. Verfeinerung</b>                            |                             |  |
| R <sub>cryst</sub> in %                           | 20,9                        | 19,0                                   |
| R <sub>free</sub> in %                            | 23,6                        | 24,0                                   |
| r.m.s.d. Bindungslängen in Å                      | 0,002                       | 0,016                                  |
| r.m.s.d. Bindungswinkel in °                      | 0,534                       | 1,44                                   |
| Mittlerer B-Faktor in Å <sup>2</sup>              | 38,76                       | 32,55                                  |
| Ramachandran Plot in %                            |                             |  |
| Bevorzugt   | 96,1                        | 94,8                                   |
| Erlaubt   | 3,9                         | 5,2                                    |
| Nicht erlaubt                                     | 0                           | 0                                      |

**Tabelle 9:** Datenstatistik für die Strukturen von DltC\_wt. Sofern nicht anders angegeben sind Werte in

Klammern für den höchsten Auflösungsbereich.  $R_{\text{meas}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$

$R_{\text{cryst}} = \sum |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| / \sum |F_{\text{obs}}|$

Die erste Kristallform der holo-Form von DltC\_wt, bildete sich in der Raumgruppe  $P6_122$  und zeigt zwei Moleküle DltC in der asymmetrischen Einheit. Daher wurde eine Verfeinerung unter Ausnutzung von nicht-kristallographischer Symmetrieoperationen durchgeführt. Die zweite Kristallform der holo-Form von DltC\_wt, mit der Raumgruppe  $P6_522$ , besitzt im Gegensatz zur ersten Kristallform nur ein Molekül DltC pro asymmetrischer Einheit. Wie die Struktur von DltC S36A, zeigt auch die holo-Form des Wildtypes von DltC in beiden Kristallstrukturen ein verdrehtes, antiparalleles Helix-Bündel, wie es für Carrier-Proteine typisch ist (Abbildung 29).

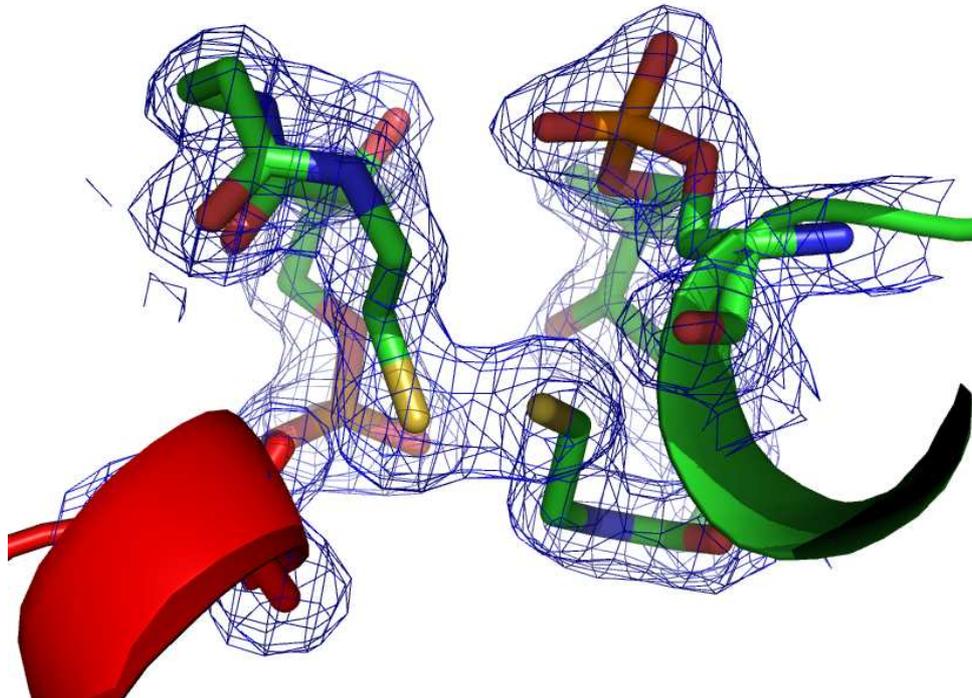


**Abbildung 29:** Die Kristallstrukturen von DltC\_wt. (A) Die Struktur von DltC\_wt Kristallform I, (B) Die Struktur von DltC\_wt II. Phosphoserin 36 beziehungsweise Serin 36 mit PPant sind als *stick* dargestellt. Der Farbverlauf ist von blau am N-Terminus zu rot am C-Terminus.

Die Helices werden bei beiden Wildtypstrukturen von denselben Aminosäureresten gebildet wie bei der S36A-Struktur. Auch die Proteinoberfläche der beiden Kristallstrukturen der holo-Form von DltC ist zum größten Teil negativ geladen. Wie bei der Struktur der S36A-Mutante, zieht sich die negativ geladene Fläche nahezu um das gesamte Molekül. Auch der positive Bereich mit negativer Ladung in der Mitte ist zu sehen. Allerdings besitzt Arginin 49 in den Strukturen von DltC\_wt I und II eine andere Konformation, als in der Struktur von DltC S36A. Die von diesem Arginin 49 erzeugte positive Ladung ist daher in der Struktur von Wildtyp Form I circa 4 Å, und in der Wildtyp Form II Struktur circa 7 Å, weiter von der

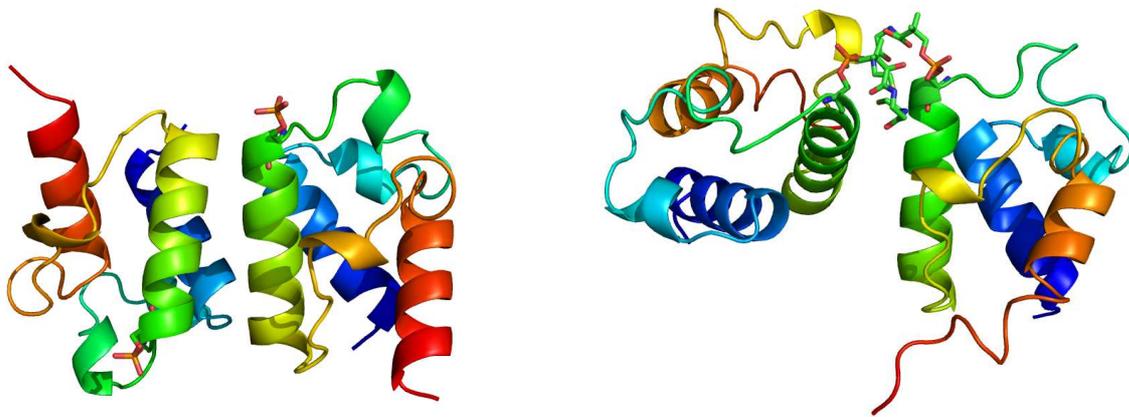
Ladung von Lysin 78 entfernt. Auch bei den Strukturen des Wildtyps von DltC ist das Proteininnere aus hydrophoben Resten aufgebaut und wasserfrei. Insgesamt zeigen alle drei Strukturen von DltC eine sehr große Ähnlichkeit (Anhang II, Abbildung 44). Die über alle Aminosäuren gemittelte Abweichung (*root mean square deviation, rmsd*) beträgt 0,79 beim Vergleich von DltC S36A und Wildtyp Form I, 0,78 bei DltC S36A und Wildtyp Form II und 0,72 zwischen bei den beiden Wildtyp Formen.

Für beide Wildtyp Kristallformen konnte die Anwesenheit des Kofaktors Phosphopantethein festgestellt werden. In der Kristallform I konnte jedoch nur ein Phosphoserin eingebaut werden, da der Rest des Kofaktors zu flexibel war, so dass die Elektronendichte nicht für ein vollständiges Modellieren des Kofaktors ausreichte. In der Kristallform II konnte der Kofaktor vollständig eingebaut werden, da die Schwefelatome der Phosphopantetheine zweier benachbarter DltC-Moleküle eine Disulfidbrücke ausbildeten, wodurch die Flexibilität vermutlich eingeschränkt wurde (Abbildung 30).



**Abbildung 30:** Anhand der 2Fo-Fc Elektronendichte (blaues Netz, konturiert bei  $1 \sigma$ ) des Kofaktors Phosphopantethein (*stick* Darstellung) ist zu erkennen, dass zwischen den terminalen Schwefelatomen der Kofaktoren zweier benachbarter DltC Moleküle (rot und grün) eine Verknüpfung besteht.

Der Dimer in einer Einheitszelle in Kristallform I und der durch die Disulfidverbrückung gebildete Dimer in Kristallform II unterscheiden sich in ihrer Orientierung. In Form I sind die beiden DltC-Moleküle antiparallel angeordnet, in Form II hingegen ist die Anordnung parallel, mit einem Molekül um 90 ° gegenüber dem anderen verdreht. (Abbildung 31). Durch die unterschiedliche Dimerisierung tritt die Disulfidbrücke als Form des Kristallkontaktes nicht in den Kristallen der Kristallform I auf. Dies wäre allerdings zumindest theoretisch möglich gewesen, da auch in dieser Kristallform die Kofaktoren zweier benachbarter DltC-Moleküle, allerdings nicht die des kristallographischen Dimers, nahe genug beieinander positioniert sind. Auch bei anderen Kristallkontakten unterscheiden sich die beiden Kristallformen.

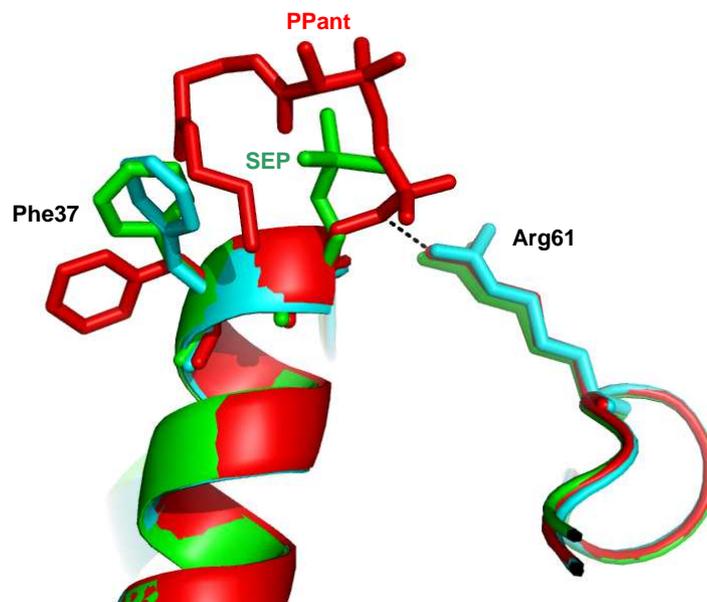


**Abbildung 31:** Die Dimerisierung von DltC in Wildtyp Kristallform I und II. Links der kristallographische Dimer in Kristallform I, bei dem die zwei Moleküle antiparallel angeordnet sind. In Kristallform II, rechts, ist ein Molekül um circa 90 ° gegenüber dem anderen verdreht, so dass es in Draufsicht zu sehen ist. Phosphoserin beziehungsweise PPant sind in *stick*-Form dargestellt. Der Farbverlauf ist von blau am N-Terminus zu rot am C-Terminus.

In Kristallform I beschränken sich die Kontakte auf Helix IV und die *loop*-Region zwischen Helix I und Helix II. Dazu kommen die Kontakte zwischen den beiden Molekülen in einer asymmetrischen Einheit, die entlang der Helices II der beiden Moleküle verteilt sind. Mit vier Aminosäureresten auf beiden Seiten, Phenylalanin 37, Glutamat 41, Asparagin 48 und Arginin 49, ist die Summe der Wechselwirkungen zwischen den zwei Molekülen einer asymmetrischen Einheit relativ schwach. In Kristallform II hingegen finden sich die meisten Kontakte auf der Seite, die dem Kofaktor gegenüber liegt. Die Interaktionen dort finden hauptsächlich durch Aminosäuren des *loops* zwischen Helix I und Helix II statt.

Durch die fixierte Orientierung des Kofaktors in der Kristallform II ergeben sich auch einige Änderungen bei anderen Aminosäuren. So bildet die Seitenkette von Arginin 61 eine Wasserstoffbrücke zur Phosphatgruppe des Phosphotantethins aus. Es ist möglich, dass

Arginin 61 in Kristallform II die Phosphatgruppe des PPant über ionische Wechselwirkungen stabilisiert. Diese Wasserstoffbrücke existiert in der Kristallform I nicht, da das Phosphoserin eine andere Konformation einnimmt und daher weiter von Arginin 61 entfernt ist. Weiterhin ist zu beobachten, wie Phenylalanin 37 vom Kofaktor in Kristallform II beiseite geschoben wird. Während Phenylalanin 37 in der S36A Struktur und in der Kristallform I nahezu die gleiche Konformation besitzt, ist die Seitenkette von Phenylalanin 37 in Kristallform II um circa 90° um die C $\alpha$ -C $\beta$ -Bindung gedreht (Abbildung 32).



**Abbildung 32:** Unterschiede im Bereich der Kofaktoren zwischen DltC\_wt I (grün), DltC\_wt II (rot) und DltC S36A (cyan). Zu sehen sind neben den Kofaktoren (PPant in rot und Phosphoserin (SEP) in grün) die jeweiligen Reste Phenylalanin 37 und Arginin 61. Die gestrichelte Linie stellt die Wasserstoffbrücke zwischen Arginin 61 und PPant dar, die nur in DltC\_wt II vorkommt.

Alle drei Strukturen von DltC zeigen die gleiche Faltung wie die NMR-Struktur von Dcp (Volkman *et al.*, 2001), des Homologen von DltC aus *Lactobacillus rhamnosus*. Die bedeutendsten Unterschiede zwischen den hier präsentierten Strukturen liegen in der Modifikation durch den Kofaktor Phosphopantethein. In der S36A-Mutante ist der Kofaktor nicht vorhanden, da das zu modifizierende Serin gegen ein Alanin ausgetauscht wurde, und das Alanin nicht modifiziert werden kann. Die beiden Strukturen des Wildtyps von DltC hingegen kristallisierten in der holo-Form. Obwohl der Kofaktor in beiden Strukturen anwesend ist, zeigt er unterschiedliches Verhalten. In der Wildtyp Form I, konnte nur der Phosphatrest, der direkt an das Serin gebunden ist, in die Struktur eingebaut werden. Alle weiteren Atome des Kofaktors konnten wegen unzureichender Elektronendichte an den

betroffenen Stellen nicht hinzugefügt werden. Dies deutet auf eine sehr hohe Flexibilität des Kofaktors hin. Aufgrund der Funktion von Carrier-Proteinen ist diese Flexibilität notwendig, da die Fracht am Ende des Kofaktors über große Distanzen von einem Reaktionsort zum nächsten transportiert werden muss. Die Wildtyp Form II hingegen zeigt den Kofaktor in einer klar definierten Form. Durch die Disulfidverbrückung der Kofaktoren von zwei benachbarten DltC-Molekülen ist die Beweglichkeit der Kofaktoren stark eingeschränkt. Die Nähe der Guanidinogruppe von Arginin 61 zum Kofaktor in Form II deutet darüber hinaus auf Wasserstoffbrücken mit der Phosphatgruppe des Kofaktors hin. Dies wurde auch schon bei ACPs mittels *molecular dynamics* Simulationen beobachtet (Chan *et al.*, 2010) und könnte auf eine Stabilisierung der negativen Ladung des Kofaktors durch das Arginin hindeuten. Die beiden hier gezeigten Strukturen der holo-Form zeigen einerseits die Flexibilität des Kofaktors, in Wildtyp Form I, bestätigen aber auch die chemische Struktur und die Reaktivität der terminalen Thiolgruppe des Phosphopantetheins, in Wildtyp Form II. Dabei ist allerdings zu beachten, dass die Disulfidverbrückung von zwei Kofaktoren in der Wildtyp Form II höchstwahrscheinlich ein Kristallisationsartefakt ist. Es gibt keine Hinweise darauf, dass DltC *in vivo* als Dimer vorkommt. *In vitro* kann eine Dimerisierung von holo-DltC in oxidierendem Milieu mittels oxidierender SDS-PAGE und Größenausschlusschromatographie beobachtet werden. Ultrazentrifugationsuntersuchungen in reduzierendem Milieu konnten hingegen keinen Hinweis auf Dimerisierung unabhängig von der Disulfidverbrückung liefern. Aber die Tatsache, dass im Zellplasma reduzierende Bedingungen herrschen und DltC-Dimere nicht mehr mit ihrer Fracht beladen werden könnten, zeigt dass DltC höchstwahrscheinlich nur durch die Kristallisation dimerisiert ist oder bevorzugt Dimere kristallisieren. Des Weiteren konnte keine kovalente Dimerisierung in DltC\_wt Form I beobachtet werden. Obwohl DltC in wt Form I als kristallographisches Dimer in der asymmetrischen Einheit vorkommt, ist auch hier ein natürliches Vorkommen als Dimer unwahrscheinlich, da die Wechselwirkungen zwischen den beiden Molekülen durch nur vier Aminosäurereste verursacht werden, was in einer sehr niedrigen Affinität resultieren würde.

Ein weiterer auffälliger Unterschied zwischen den drei hier vorgestellten Strukturen von DltC ist die Konformation von Phenylalanin 37, wie auch in Abbildung 32 gezeigt. Phenylalanin 37 ist gleichzeitig auch der einzige Aminosäurerest, der sich bei den drei hier gezeigten Strukturen deutlich unterscheidet. In der Struktur von Wildtyp Form I ist der Benzylring des Phenylalanins gegenüber der Konformation in der S36A-Mutante um 45° gedreht. In der Struktur von wt Form II hingegen ist die gesamte Seitenkette um 90° um die C $\alpha$ -C $\beta$ -Bindung

gedreht, der Benzylring hat aber dieselbe Orientierung wie Wildtyp Form II. Für ACPs wurde von Roujeinikova *et al.*, 2002 vorgeschlagen, dass Phenylalanin 37, beziehungsweise die homologe Aminosäure, eine Rolle in der Kofaktorstabilisierung spielen. In den DltC-Strukturen ist zu erkennen, dass der Kofaktor Phenylalanin 37 in eine andere Position drängt. In der Struktur von DltC S36A, in der kein Kofaktor anwesend ist, und in der Struktur der Wildtyp Form II, in der der Kofaktor sehr flexibel ist, befindet sich Phenylalanin 37 in nahezu derselben Konformation. In der Struktur von Wildtyp Form II hingegen ist der Kofaktor durch die Disulfidbrücke zu einem benachbarten Molekül in einer Orientierung fixiert. Dadurch wird vermutlich die Seitenkette von Phenylalanin 37 aus ihrer Konformation gedrängt.

#### **3.2.4. NMR-Messungen mit DltC\_wt und DltC S36A**

Die große Ähnlichkeit der DltC Kristallstrukturen sollte mit dem Verhalten in Lösung verglichen werden. Dazu wurden, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Jochen Balbach am Institut für Physik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, NMR-Messungen durchgeführt. Sowohl für den Wildtyp als auch die S36A-Mutante wurden zuerst mit  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  markiertem Protein Triple Resonanz Spektren HNCA, HNCACAB und HN(CO)CACB aufgenommen, um die Signale den einzelnen Aminosäuren zuordnen zu können. Anschließend wurden  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren aufgenommen um die Proben zu vergleichen. Für die S36A-Mutante konnten alle Kreuzsignale Aminosäuren zugeordnet werden, allerdings konnte kein Signal für Alanin 36 gefunden werden (Anhang II, Abbildung 46). Auch für den Wildtyp konnten alle Signale erfolgreich zugeordnet werden. Zusätzlich konnten zwei Stickstoffsignale für den Kofaktor gefunden werden (Anhang II, Abbildung 47). Eine Überlagerung der Spektren von DltC S36A und des Wildtyps zeigt, dass die Strukturen des Wildtyps und der S36A-Mutante in Lösung keine signifikanten Unterschiede aufweisen (Abbildung 33).



Interaktionspartnern notwendig. Wahrscheinlich ist ein Modell zur Beschreibung der konformationelle Änderungen bei allen CPs ungeeignet. ACPs aus Typ I Fettsäuresynthasen verhalten sich anders als ACPs aus Typ II Fettsäuresynthasen, beide verhalten sich anders als Aryl-Carrier-Proteine aus Polyketid-Synthasen und PCPs aus NRPS verhalten sich wiederum anders (Chan *et al.*, 2010). So scheint es eine Rolle zu spielen, ob ein CP Teil einer größeren Polypeptidkette mit weiteren funktionellen Domänen ist, oder ob es sich als eigenständiges Protein frei bewegen kann. Für die erstgenannte Gruppe wären vermutlich größere konformationelle Änderungen nötig um alle Interaktionspartner zu erreichen. Ungebundene CPs müssten hingegen keine so große konformationelle Flexibilität aufweisen.

Die unterschiedliche Flexibilität liegt vermutlich auch an den unterschiedlichen Umgebungen, in denen Carrier-Proteine ihre Rolle ausüben. CPs die als einzelnes Protein vorliegen, wie DltC oder die ACPs aus Typ I Fettsäuresynthasen in Bakterien können leichter durch Bewegung des ganzen Moleküls die Reaktionsorte erreichen und müssen daher keine so große innere Flexibilität aufweisen. Hingegen sind Peptidyl-Carrier-Proteine Teil eines großen Polypeptides und daher durch kovalente Bindungen in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt. Sie müssen also flexibler sein um die verschiedenen Reaktionsorte der anderen Module der NRPS zu erreichen.

An welchem Reaktionsort und wie DltCs ihre Fracht wieder abgeben ist bisher unklar. Von Volkman *et al.*, 2001 wurde die Existenz eines RKEWD-Motiv, beschrieben und eine Rolle bei der Bindung an LTAs vorgeschlagen. Dieses Motiv besteht bei Dcp aus den Aminosäuren, die Helix III ausbilden. Ein Bereich positiver Ladung um DltCs Arginin 61 würde demzufolge an die negative Ladung der LTA binden. Allerdings ist dieser positive Bereich bei den hier gezeigten DltC-Strukturen deutlich kleiner als bei den NMR-Strukturen, die Volkman *et al.*, 2001 für das DltC-Homologe Dcp ermittelt haben. Da DltC die Sequenz RDVWN anstatt RKEWD besitzt, fehlt die positive Ladung von Lysin. Es konnte experimentell bewiesen werden, dass mit D-Alanin beladenes DltC alleine an LTAs binden kann (Volkman *et al.*, 2001), aber welche Rolle das RKEWD-Motiv dabei spielt ist immer noch unklar. Auffällig ist, dass die Reste des RKEWD-Motivs zwar in der Struktur von Dcp die Helix III bilden, in den hier vorgestellten Strukturen von DltC hingegen in der Region nach Helix III liegen, die von den Resten Isoleucin 55, Threonin 56 und Glutamat 57 gebildet wird. Die vorgeschlagene Bindungsstelle für Teichonsäuren und Helix III konnte also auch bei den hier vorgestellten DltC-Strukturen gefunden werden. Allerdings bilden diese Reste keine helikale Struktur aus. Für die Interaktionen von DltCs könnte es eher unwichtig sein, ob die beteiligten Reste eine Helix bilden oder nicht. Zudem zeigt Arginin 61 bei DltC eine andere Konformation als bei

Dcp, so dass der Bereich positiver Ladung bei DltC deutlich kleiner ausfällt als bei Dcp. All diese Möglichkeiten schließen sich natürlich nicht gegenseitig aus. Weitere Interaktionsstudien sind nötig, um zu zeigen welcher Fall zutrifft.

Sequenzvergleiche zwischen DltCs, ACPs und PCPs bestätigen eine Verwandtschaft zwischen allen drei Carrier-Proteinen. Das Serin, an das der Kofaktor gebunden wird ist bei allen Carrier-Proteinen zu 100 % konserviert. Auch der Bereich von ungefähr 5 Aminosäuren vor und nach der Kofaktorbindungsstelle ist hochgradig konserviert. Aber bei den drei Gruppen von CPs sind jeweils andere Sequenzen konserviert, die zwar innerhalb einer Gruppe, aber nicht zu der Sequenz anderer Gruppen, ähnlich sind. Es zeigte sich auch, dass DltCs mit ACPs enger verwandt sind als mit PCPs (Anhang II, Abbildung 48). PCPs besitzen direkt vor dem modifizierten Serin zwei 100%ig konservierte Glycine gefolgt von einem hoch konservierten Histidin. ACPs und DltCs hingegen haben einen hydrophoben Rest gefolgt von einem sehr stark konservierten Aspartat. Nach dem konservierten Serin ähneln sich PCPs und ACPs mehr, denn sie besitzen dort alle einen hydrophoben Rest wie Valin, Leucin oder Isoleucin. DltCs hingegen haben dort fast alle ein hoch konserviertes Phenylalanin. Die größere Ähnlichkeit zwischen DltCs und ACPs wurde auch von einem Strukturvergleich mit verschiedenen Strukturen von DltCs, ACPs und PCPs unter Benutzung des DALI-Servers (Holm et al., 2008) bestätigt. Allerdings wird dabei auch die Sequenz der Proteine verglichen, was das Ergebnis beeinflussen könnte. Die Strukturen zeigen, dass ACPs und DltCs eine nahezu identische Faltung besitzen und sich nur bei Helix III und der PPant-Bindestelle leicht unterscheiden.

Die großen Struktur- und Sequenzähnlichkeiten zeigen, dass sich DltCs vermutlich unabhängig von den PCPs aus den ACPs entwickelt haben oder DltCs ein früher Vorläufer der PCPs sind. Aufgrund der hohen Konservierung der Proteine des *dlt*-Operons (Neuhaus *et al.*, 2003), das für gram-positiven Bakterien überlebenswichtig ist, muss es sich schon sehr früh entwickelt haben, möglicherweise vor den NRPS. Auch für DltA konnte eine sehr enge Verwandtschaft mit den ACS festgestellt werden. Zum Beispiel wird Coenzym A von DltA am effektivsten von allen NRPS A-Domänen acyliert (Linne *et al.*, 2007). Auch Sequenzvergleiche zeigen, dass DltA näher mit den ACS verwandt ist als mit den NRPS A-Domänen (Linne *et al.*, 2007). Da sowohl DltA als auch DltC näher mit den Proteinen aus der Fettsäuresynthese verwandt sind als mit den Domänen aus NRPS, ist es logisch davon auszugehen, dass sich das *dlt*-Operon direkt aus Proteinen der Fettsäuresynthese entwickelt hat.

### **3.3. Die Interaktion von DltA mit DltC**

#### **3.3.1. NMR-Titrationsen von DltA zu DltC**

Um die Interaktion von DltC mit seinem Bindungspartner DltA zu untersuchen, wurde der Wildtyp von DltA zu Wildtyp DltC (holo-Form), sowie zu DltC S36A (entspricht apo-Form) titriert, und die Signale des  $^{15}\text{N}$ -markierten DltC gemessen. Die Veränderungen wurden mittels der Änderung des  $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ -HSQC-Spektrums nach jedem Titrationsschritt ermittelt. Aminosäuren von DltC, die mit DltA interagieren würden eine Abnahme der Signalintensität zeigen. Konformationelle Änderungen des markierten DltCs würden zur Beobachtung von vorher nicht vorhandenen Kreuzsignalen führen.

Im Vergleich der Spektren nach beendeter Titration sind zwischen Wildtyp DltC und DltC S36A deutliche Unterschiede zu erkennen (Abbildung 34 und Abbildung 35). Die Signale der Aminosäurereste Isoleucin 56 bis Aspartat 62 nehmen sowohl bei DltC S36A als auch bei DltC\_wt ab. Zusätzlich ist beim Wildtyp auch noch eine Signalabnahme der Reste Phenylalanin 37 bis Leucin 44, Valin 54, Valin 63 sowie Tryptophan 64 zu beobachten. Die einzelnen Signale nehmen nur ab und werden nicht verschoben, so dass an anderer Stelle neue Signale erscheinen. Dies weist darauf hin, dass DltC während der Bindung keine Konformationsänderung durchläuft

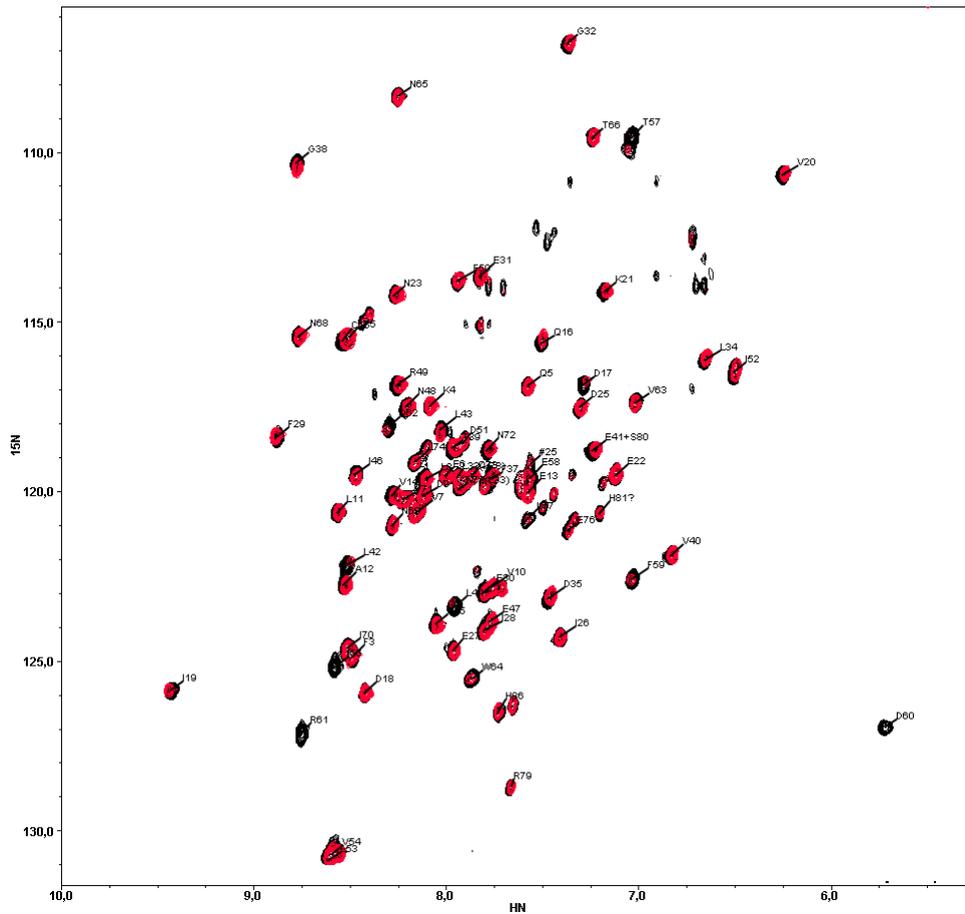


Abbildung 34:  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum vor (schwarz) und nach (rot) der Titration von DltA zu DltC S36A.

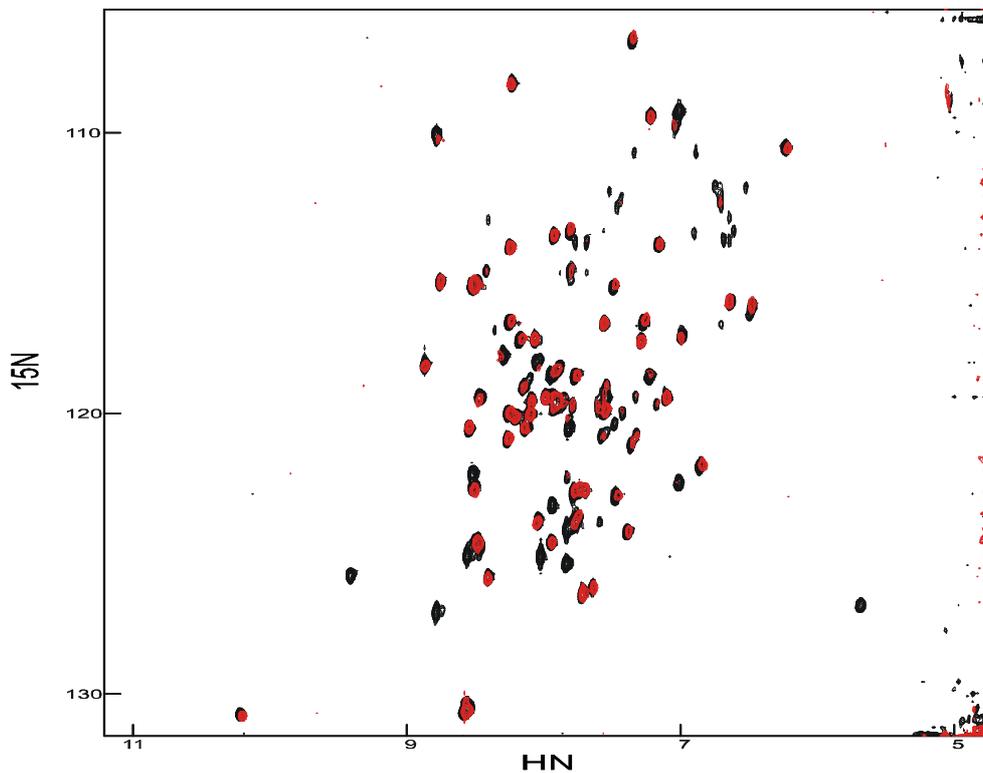
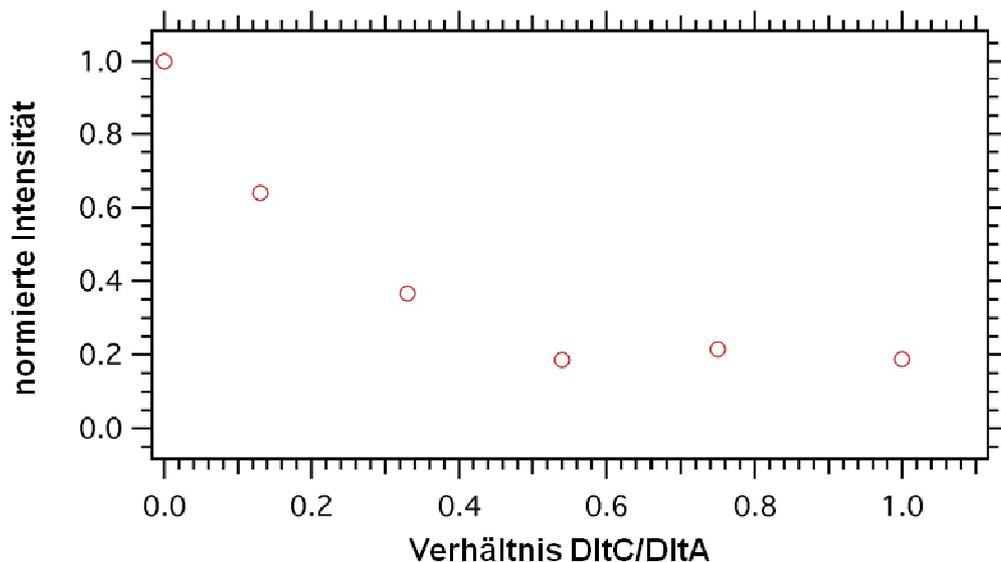


Abbildung 35:  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum vor (schwarz) und nach (rot) der Titration von DltA zu holo-DltC\_wt

In Abbildung 36 ist am Beispiel von Glutamat 58 gezeigt wie das Signal bestimmter Aminosäuren von DltC bei steigender Konzentration von DltA schwächer wird. Bei einer Stöchiometrie DltC S36A zu DltA von 2:1 verschwindet das Kreuzsignal für Glutamat 58 vollständig. Einen weiteren Hinweis auf die Komplexbildung von DltC und DltA geben die veränderten Relaxationszeiten. Während DltC in der apo- bzw. holo-Form eine Relaxationszeit von 10,3 ns bzw. 8,9 ns hat, besitzt der Komplex aus DltC und DltA Relaxationszeiten von 15,7 ns für apo-DltC bzw. 17,0 ns bei holo-DltC<sub>wt</sub>. Die erhöhten Werte der Komplexe lassen sich mit dem langsameren Taumeln von DltC durch das gebundene DltA erklären.



**Abbildung 36:** Die Abnahme der Signalintensität von Glu58 in DltC S36A.

Obwohl die Interaktion von DltC mit DltA sowohl für die S36A-Mutante als auch die holo-Form von DltC mittels NMR nachgewiesen wurde, scheint die Affinität nicht sehr groß zu sein. Die NMR Messungen ergaben eine  $K_D$ -Wert im Bereich 100  $\mu$ M. Größenausschlusschromatographie trennte DltC und DltA, ohne eine Komplexbildung anzuzeigen (Daten nicht gezeigt).

Da DltA während der Aktivierung und Übertragung von D-Ala auf DltC verschiedene Konformationen durchläuft, sollte der Effekt der Konformation von DltA auf die Interaktion mit DltC untersucht. Dafür wurde die Titration in Anwesenheit eines Inhibitors für

DltA durchgeführt. Bisher liegen keine Informationen über das Verhältnis der verschiedenen Konformationen von DltA in Lösung vor. Zur Vereinfachung wird daher von einer gleichmäßigen Verteilung auf die drei Konformationen ausgegangen. Ein Inhibitor der nur von einer bestimmten Konformation gebunden wird, könnte das Verhältnis der einzelnen Spezies ändern, und dies wiederum könnte die Bindung an DltC beeinflussen, das theoretisch nur von der Konformation erkannt werden sollte die D-Ala-AMP auf DltC überträgt.

Dafür wurden zwei Inhibitoren von DltA untersucht. 5'-O-[N-(D-Alanyl)-sulfamoyl]adenosin ist ein Inhibitor, der den Übergangszustand des D-Alanyl-Adenylats imitiert, aber nicht von DltA hydrolysiert werden kann. Dieser Inhibitor sollte also die Konformation von DltA zugunsten einer Konformation verschieben, die DltC bindet. Adenosine-5'-[( $\alpha$ ,- $\beta$ )-methyleno]triphosphat (AMPCPP) ist ein ATP-Analogon, das ebenfalls von DltA nicht hydrolysiert werden kann, da es anstelle des Sauerstoff zwischen der ersten und zweiten Phosphatgruppe eine Methylgruppe besitzt. Dies sollte das Konformationsgleichgewicht zugunsten einer Konformation verschieben, die nicht an DltC bindet.

Die Zugabe von 5'-O-[N-(D-Alanyl)-sulfamoyl]adenosin hatte keinen messbaren Effekt auf die NMR-Signale. DltC verhielt sich in Bezug auf die Bindung an DltA genauso wie in Abwesenheit des Inhibitors. Auch die Zugabe von AMPCPP resultierte in keiner Veränderung (Daten nicht gezeigt). Dies kann mehrere Gründe haben. Entweder kommt DltA in Lösung in mehreren Konformationen vor oder mehr als eine der Konformationen während des Reaktionszyklus kann DltC binden. Aber da die Bindung von DltC an DltA nicht durch Inhibitoren beeinflusst werden konnte, bleibt vorläufig unklar, wie genau die Bindung abläuft und wieso es zwei verschiedene Bindungsbereiche gibt.

Anhand der DltA 7-Ala-Mutante sollte untersucht werden, ob die Wechselwirkung von DltA und DltC durch die Mutationen beeinflusst werden. Es wurde dieselbe Vorgehensweise wie für die Titrations mit dem Wildtyp von DltA verwendet. Bei den Messungen wurde nur isotopenmarkiertes DltC verwendet, daher konnten keine Signale für DltA aufgezeichnet werden. Auf eine Veränderung der Bindung kann also nur über die Signale von DltC geschlossen werden.

Die ausgewerteten Daten der  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektren zeigten allerdings keine Unterschiede zu den Titrations mit DltA\_wt (Daten nicht gezeigt). Sowohl für die apo- als auch die holo-Form von DltC war bei denselben Aminosäuren wie bei DltA\_wt eine Abnahme der Signale mit zunehmender Konzentration der DltA 7-Ala-Mutante zu beobachten.

Offensichtlich bindet die erste Bindungsregion allgemein an DltA, während die Region nach Serin 36 nur bei holo-DltC eine Bindung eingeht, welche vermutlich für die Insertion des Phosphopanthetheins in das aktive Zentrum von DltA verantwortlich ist. Die Reste 54, 63 und 64 verstärken diese Bindung über die Wechselwirkung mit Resten an der Oberfläche von DltA.

### **3.3.2. Kristallisation und Strukturaufklärung des DltC-DltA Komplexes**

Um genauere Informationen über die Art der Interaktion zwischen DltC und DltA zu erhalten, wurde versucht beide Proteine zusammen zu kristallisieren. Dazu wurden holo-DltC<sub>wt</sub> und DltA in den Verhältnissen 1:1, 2:1 und 3:1 gemischt. Um den Einfluss von ATP und D-Ala zu bestimmen, wurden Versuche ohne die beiden Substrate für DltA, nur mit einem der Substrate und mit beiden Substraten, angesetzt. Dabei zeigte sich, dass nur in den Ansätzen mit ATP und D-Ala Proteinkristalle wuchsen. Ebenso war ein 1:2 Verhältnis von DltA zu DltC nötig: bei einem 1:1 Verhältnis konnten keine Kristalle beobachtet werden.

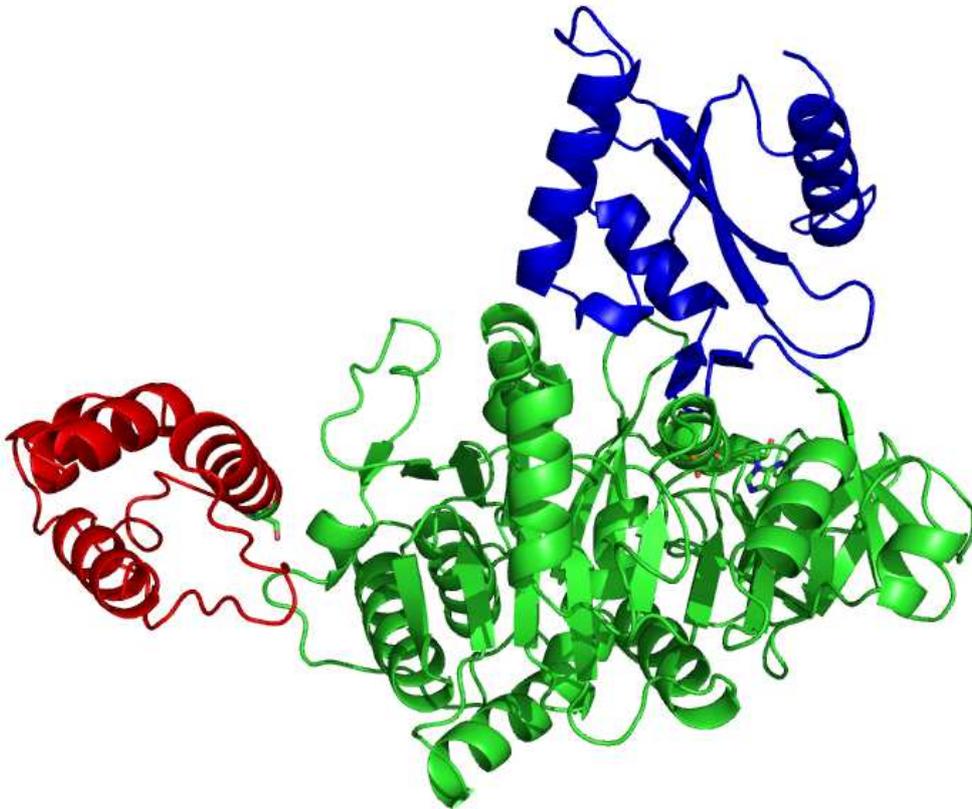
Die verwendeten Kristalle bildeten sich in einem Kristallisationspuffer mit 0,1 M Imidazol, 0,1 M MES, 0,02 M 1,6-Hexandiol, 0,02 M 1-Butanol, 0,02 M 1,2-Propandiol, 0,02 M 2-Propanol, 0,02 M 1,4-Butandiol, 0,02 M 1,3-Propandiol, 12,5% MPD, 12,5% PEG 1000 und 12,5% PEG 3350. Alle Kristalle wurden mit dem Röntgengenerator innerhalb der Abteilung vermessen und besaßen dieselbe Raumgruppe  $P2_12_12_1$ . Für die Strukturaufklärung wurde die Struktur von DltA als Modell für Molekularen Ersatz mittels BALBES (Long *et al.*, 2008) genutzt. Die so erhaltenen Daten zeigten einen großen Bereich positiver Elektronendichte in den die Struktur von DltC erfolgreich eingebaut werden konnte. In Tabelle 10 sind die Daten zur Struktur des DltA-DltC-Komplexes angegeben

| <i>A. Datensammlung</i>   | <b>DltA-DltC-Komplex</b>                             |
|---|--|
| Röntgeneratore  | Rigaku RA Micro007<br>in der Abteilung               |
| Wellenlänge $\lambda$ in Å  | 1,5418   |
| Temperatur in K   | 100  |
| Raumgruppe<br>(Moleküle/asymmetrische<br>Einheit)<br>Konstanten der Einheitszelle | P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub><br>(1) |
| a, b, c in Å  | 64,03<br>95,01<br>99,29                              |
| $\alpha, \beta, \gamma$ in °  | 90<br>90<br>90                                       |
| Auflösungsbereich in Å  | 39,23 – 2,35<br>(2,48 – 2,35)                        |
| Nr. einzigartige Reflexe  | 25944 (3713)   |
| Multiplizität   | 6,0 (4,8)  |
| Vollständigkeit in %  | 100 (99,9)   |
| I / $\sigma$ I  | 7,7 (2,3)  |
| R <sub>meas</sub> in %  | 16,7 (53,8)  |
| <b>B. Verfeinerung</b>  |  |
| R <sub>cryst</sub> in %   | 24,63  |
| R <sub>free</sub> in %  | 25,97  |
| r.m.s.d. Bindungslängen in Å  | 0,006  |
| r.m.s.d. Bindungswinkel in °  | 0,909  |
| Mittlerer B-Faktor in Å <sup>2</sup>  | 40,47  |
| Ramachandran Plot in %  |  |
| Bevorzugt   | 95,5   |
| Erlaubt   | 4,5  |
| Nicht erlaubt   | 0  |

**Tabelle 10:** Datenstatistik für die Struktur des DltA-DltC-Komplexes. Sofern nicht anders angegeben sind Werte in Klammern für den höchsten Auflösungsbereich.  $R_{\text{meas}} = \sum |I - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$

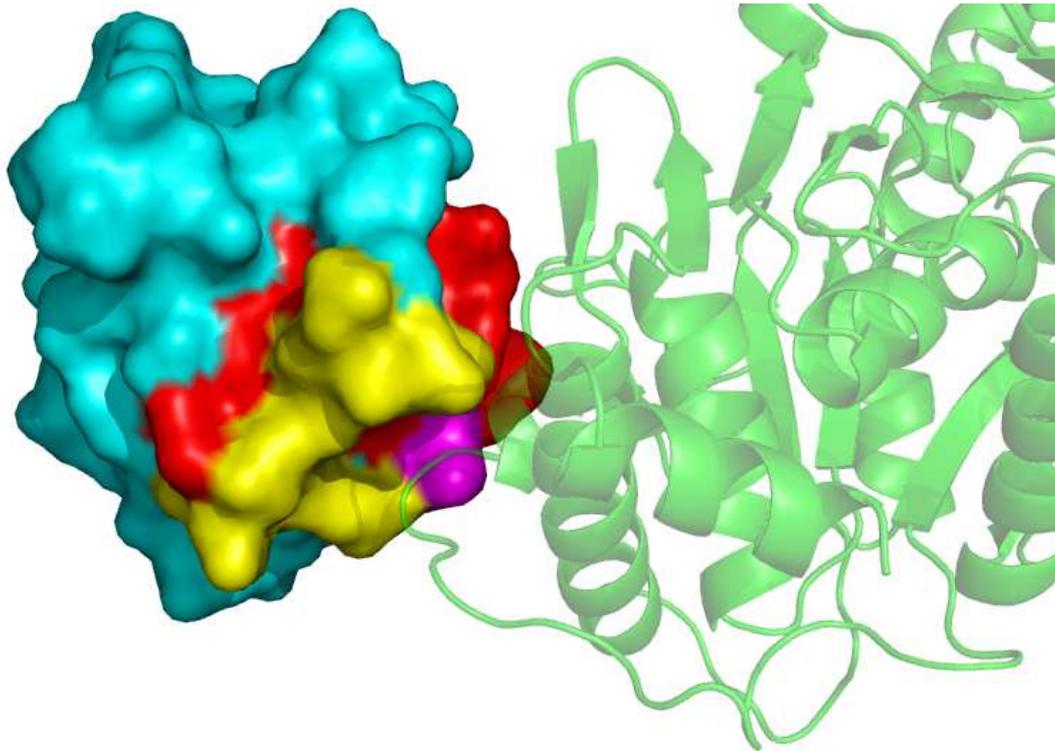
$$R_{\text{cryst}} = \sum |F_{\text{obs}} - |F_{\text{calc}}|| / \sum |F_{\text{obs}}|$$

Der Gesamtkomplex zeigt eine unerwartete Interaktion von DltC mit DltA. DltC bindet nicht zwischen der N-terminalen und C-terminalen Domäne von DltA, sondern nur an der N-terminalen Domäne (Abbildung 37). Diese Bindung findet in relativ großer Entfernung vom aktiven Zentrum von DltA statt. Serin 36 von DltC ist circa 40 Å vom AMP im aktiven Zentrum DltAs entfernt. Damit das aktivierte D-Alanin vom aktiven Zentrum DltAs zu DltC gelangen kann, müsste DltC näher am aktiven Zentrum von DltA binden. Die Rolle der hier gefundenen Bindung ist daher unklar.

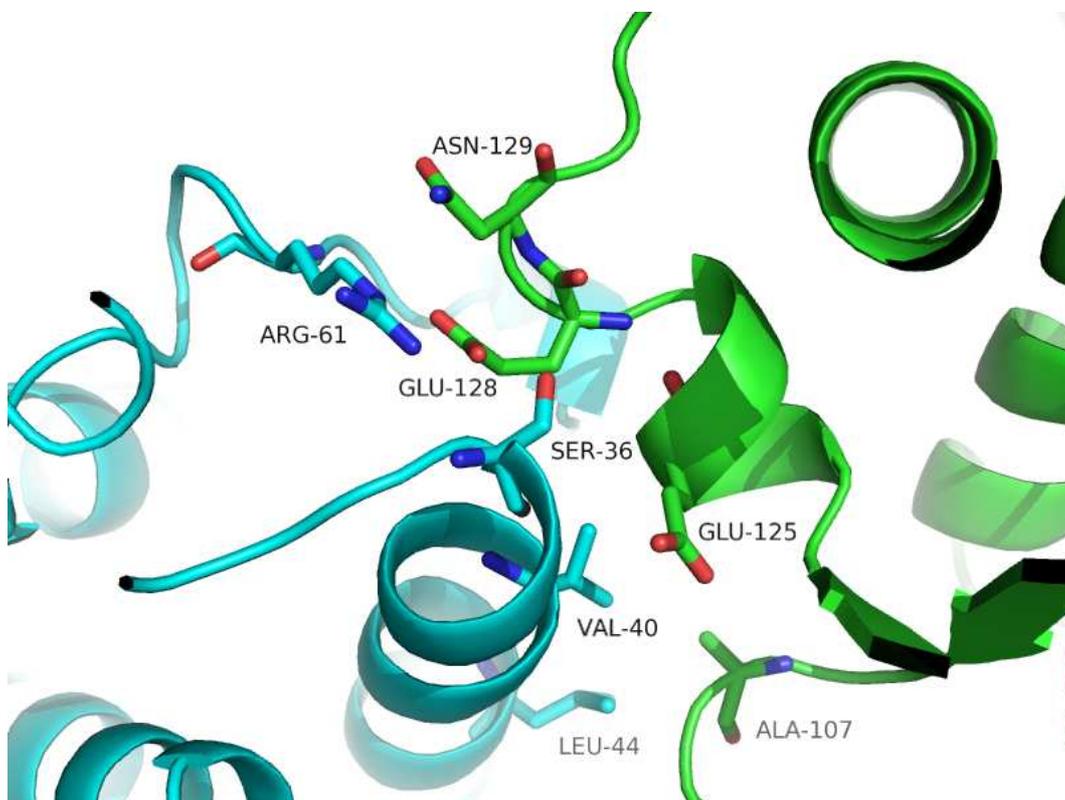


**Abbildung 37:** Der Komplex aus DltA (N-terminale Domäne in grün, C-terminale Domäne in blau) und DltC (rot). AMP im aktiven Zentrum von DltA und DltC Serin 36 sind als *stick* dargestellt.

Die beobachtete Bindung von DltC erfolgt hingegen ausschließlich mit der N-terminalen Domäne von DltA (Abbildung 38). Dabei beträgt die Interaktionsfläche zwischen DltA und DltC circa 400 Å<sup>2</sup>. Auch ist die Anzahl von eindeutig an der Wechselwirkung beteiligten Resten recht gering (Abbildung 39).



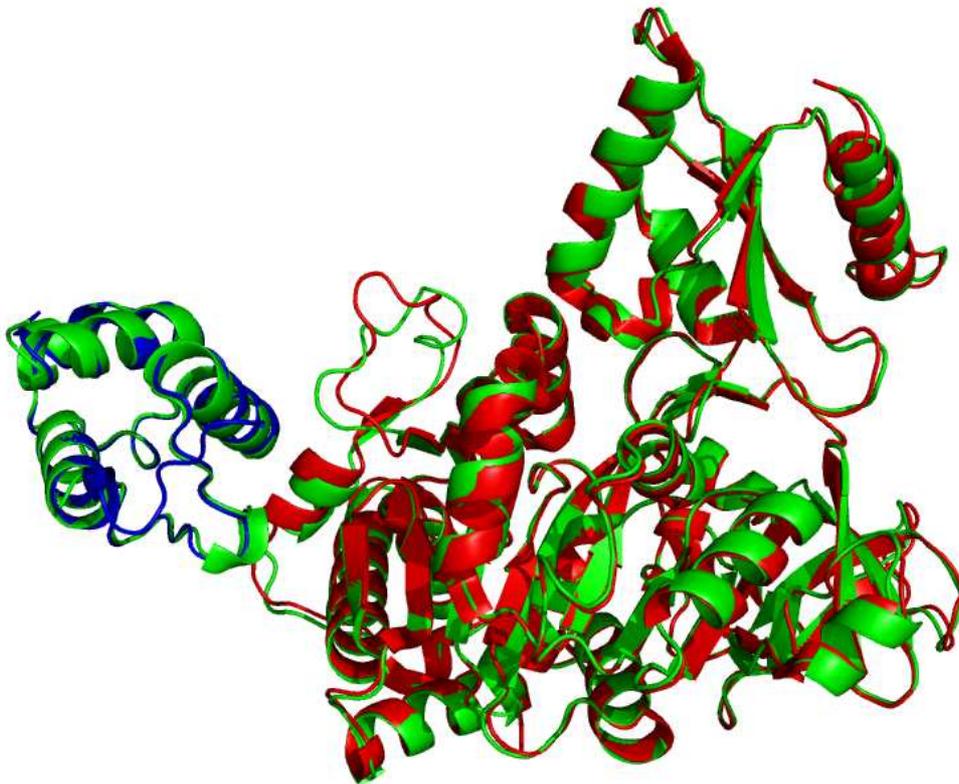
**Abbildung 38:** Die Kontaktfläche von DltA (grün; durchsichtige *cartoon*-Darstellung) und DltC (magenta, cyan, rot, gelb; Oberflächendarstellung) im Komplex. DltC S36A ist magenta gefärbt. Laut NMR interagieren Bereiche in rot und gelb bei holo-DltC\_wt mit DltA. Bei DltC S36A interagieren nur Bereiche in gelb mit DltA. Zu erkennen ist, dass die Wechselwirkung zum größten Teil über Aminosäuren von DltCs Helix III und Helix IV, sowie Aminosäuren direkt vor Helix III, erfolgt.



**Abbildung 39:** Interagierende Reste von DltA und DltC in der der Kristallstruktur des DltA-DltC-Komplexes. DltC ist cyan gefärbt, DltA grün. Interagierende Reste sind als *sticks* dargestellt und mit Namen versehen.

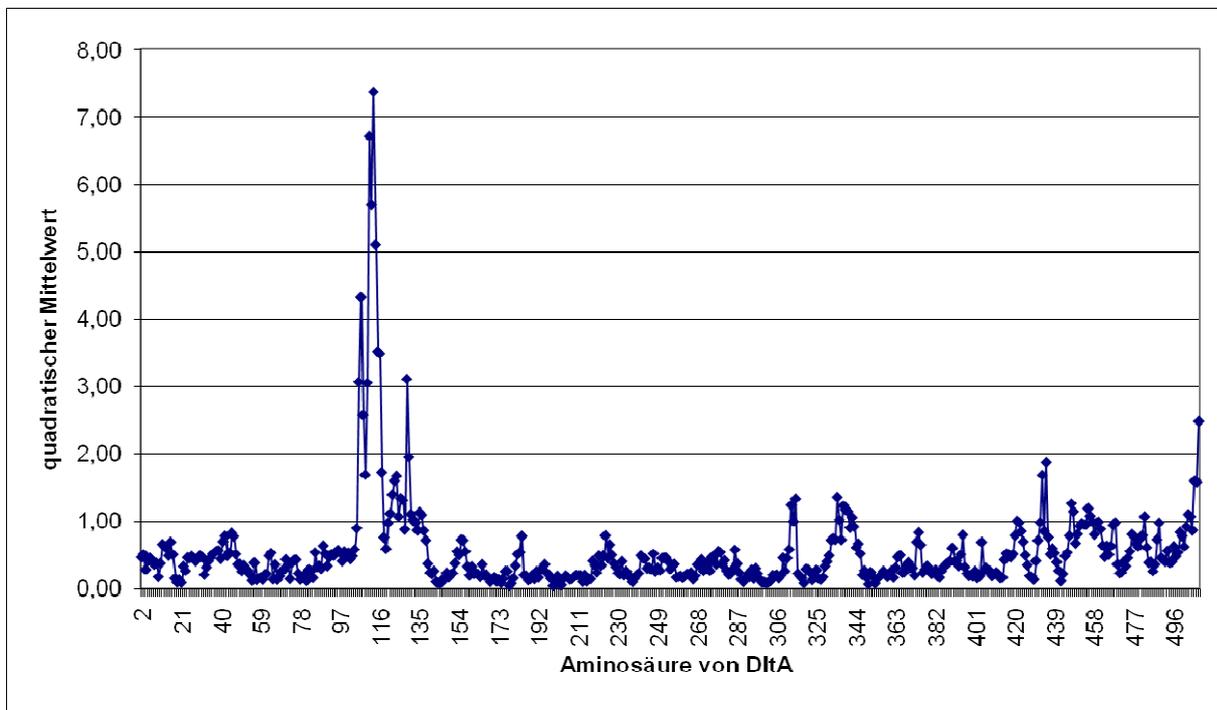
Asparagin 129 bildet Wasserstoffbrücken mit Arginin 61 von DltC. Glutamat 128 von DltA ragt in ebenfalls in DltC hinein und interagiert mit DltC Arginin 61. Das nicht mit PPant modifizierte Serin 36 von DltC geht Wasserstoffbrückenbindungen mit den Carbonylsauerstoffatomen des Peptidrückgrates von Glutamat 125 sowie Glutamat 128 von DltA ein. Valin 40 und Leucin 44 von DltC bilden einen kleinen hydrophoben Bereich an der Oberfläche von DltC, an den Alanin 107 von DltA binden könnte. Bis auf Serin 36 sind alle Reste von DltC auch laut NMR-Titrations an der Interaktion beteiligt.

Leider konnte in der Komplexstruktur keine Elektronendichte gefunden werden, die auf ein Vorhandensein des Kofaktors PPant hinweisen würde. Mit den vorhandenen Daten ist nicht zu klären, ob DltC nicht modifiziert wurde oder ob die Elektronendichte nicht ausreicht, um den sehr flexiblen Kofaktor zum Modell hinzuzufügen. In Abbildung 40 ist eine Überlagerung des DltA-DltC-Komplexes mit freiem DltA und der Kristallstruktur von DltC S36A gezeigt. Abgesehen von der Abwesenheit des Kofaktors ist die Struktur von DltC im Komplex mit einem rmsd von 0,6 ähnlich zur ungebundenen Struktur von DltC. Wie auch schon die NMR-Messungen mit DltC, zeigt die Kristallstruktur des Komplexes dass sich die Konformation von DltC durch Interaktion mit DltA als Bindungspartner nicht ändert.



**Abbildung 40:** Überlagerung des DltA-DltC-Komplexes (grün) mit freiem DltA (rot) und DltC S36A (blau). Die Konformation von DltC wird durch die Wechselwirkung mit DltA nicht verändert. Bei DltA zeigt die Region von Aminosäure 105 bis 130 eine veränderte Konformation.

Auch die Struktur von DltA im Komplex zeigt keine deutlichen Konformationsänderungen im Vergleich zur bereits bekannten Struktur von DltA alleine. Der rmsd zwischen freiem DltA und DltA im Komplex beträgt 0,6. Die größten Unterschiede sind bei den Resten 105 bis 130 zu finden (Abbildung 41). Der Bereich 106 bis 117 zeigte bei der Struktur des freien DltA nur schwache Elektronendichte. In der Komplexstruktur ist dieser Bereich etwas kompakter und zeigt eine bessere Elektronendichte. Der Unterschied zwischen freiem und Komplex-DltA im Bereich Aminosäure 105 bis 130 deutet auf eine Beziehung dieser Region zur DltC-Bindung hin. Der genaue Effekt ist unklar, aber aus Abbildung 40 ist eine „Verschiebung“ des Bereiches in Richtung C-terminale Domäne zu erkennen.



**Abbildung 41:** Unterschiede der C $\alpha$ -Atome von DltA in freier Form und in der Komplexstruktur.

Diese Veränderung beschränkt sich nicht nur auf Aminosäuren in direkter Nähe zu DltC. So zeigen die Reste 105 bis 120 durch einen allosterischen Effekt ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen freiem und Komplex-DltA, obwohl sie im Komplex nicht direkt an der Wechselwirkung beteiligt sind.

Die Kristallstruktur des DltA-DltC-Komplexes passt zu den Ergebnissen der NMR-Titrationen. Die beiden Bindungsregionen von DltC, die ermittelt wurden, sind auch bei der Kristallstruktur nahe an DltA. Die Erkenntnisse über die Bindung von DltC passen zu den

bisherigen Erkenntnissen über die Interaktionen von Carrier-Proteinen. So bilden die Reste 56 bis 62 DltCs Helix III und den Bereich davor, der in ACPs Teil von Helix III ist. Die Reste 37 bis 44, die nur bei der holo-Form binden, befinden sich am Anfang von Helix II, direkt nach dem Serin 36, das mit dem Kofaktor modifiziert ist. Valin 54 befindet sich zwischen Helix II und Helix III, Valin 63 und Tryptophan 64 hingegen hinter Helix III. Bei verschiedenen ACPs und PCPs wurde sowohl für Helix II als auch Helix III schon früher eine Rolle für die Wechselwirkung mit anderen Proteinen gefunden (Frueh *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2006a; Lai *et al.*, 2006c; Lai *et al.*, 2006b; Mofid *et al.*, 2002; Samel *et al.*, 2007; Worsham *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007). Die Beteiligung von Helix II und Helix III von DltC an der Interaktion mit DltA konnte mit NMR-Titrations von DltA zu DltC bestätigt werden.

In der Kristallstruktur des Komplexes findet die Bindung zwischen DltA und DltC nur über einige wenige Aminosäurereste statt. Dies würde auch die schwache Bindung erklären, die mit NMR-Titration, Größenausschlusschromatographie und nativer PAGE beobachtet wurde. Aber dabei muss beachtet werden, dass eine Übertragung des D-Alanins vom aktiven Zentrum des DltA auf den Kofaktor von DltC bei diesem Bindungsmodell nahezu unmöglich ist.

Als grobes Modell, wie PPant mit DltA interagieren könnte, können die Strukturen der ACS herangezogen werden (Reger *et al.*, 2007). Dabei ist zu sehen, wie Coenzym A, der Vorläufer von Phosphopantethein, in das Adenylat-bildende Enzym inseriert. Da der grundlegende Reaktionsmechanismus der ACS derselbe ist wie bei DltA, ist es anzunehmen dass Phosphopantethein von DltC in das aktive Zentrum von DltA auf eine ähnliche Weise vordringen könnte. Daraus folgt, dass die Seitenketten, die nahe bei Serin 36 liegen, in direkten Kontakt mit Aminosäuren von DltA kommen würden. In der gefundenen Kristallstruktur ist diese Form der Insertion allerdings nicht möglich, da sich DltC zu weit vom aktiven Zentrum von DltA befindet. Da der Reaktionsmechanismus sowie die Lokalisation des aktiven Zentrums von DltA eindeutig identifiziert wurden (Du *et al.*, 2008b; Osman *et al.*, 2009; Yonus *et al.*, 2008), muss davon ausgegangen werden, dass die Übertragung des D-Alanins in der hier gezeigten Form des Komplexes nicht vorkommen kann. Ob DltA noch weitere Bindungsstellen für DltC hat oder DltC seine Position während der Reaktion ändert ist unklar. Da die NMR-Titrations ein 1:2 Verhältnis von DltA zu DltC, sowohl bei DltC S36A als auch beim Wildtyp, zeigen, wäre es auch möglich, dass zwei Moleküle DltC an ein DltA binden. Dann würde ein DltC in der Art binden wie es in der Kristallstruktur gesehen werden kann. Die Binderegion für das andere DltC ist unklar, müsste aber wahrscheinlich nahe dem aktiven Zentrum liegen.

## 4. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteinprodukte des *dlt*-Operons untersucht und charakterisiert. Dabei wurden proteinbiochemische Methoden genutzt, um die Proteine herzustellen und zu reinigen. Die so gewonnenen Proteine wurden biophysikalisch und in Bezug auf ihre Wechselwirkungen beschrieben.

Anhand bereits vorhandener Kristallstrukturen von DltA wurden Aminosäuren im oder nahe beim aktiven Zentrum identifiziert, die Einfluss auf die Substratspezifität haben könnten. Mittels Punktmutanten von DltA wurde dieser Einfluss dann experimentell untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine Beteiligung der mutierten Reste an der von Adenylierungsdomänen katalysierten Reaktion.

Weiterhin wurden, ausgehend von den vorher bekannten Kristallstrukturen von DltA, die Aminosäuren Glycin 108 bis Valin 114 in der DltA 7-Ala-Mutante zu Alaninen mutiert. Diese Reste, die in der Nähe der wahrscheinlichen Binderegion für DltC liegen, weisen in der Struktur eine hohe Flexibilität auf und könnten daher möglicherweise an der Bindung zu DltC beteiligt sein. Diese Mutante zeigte aber in NMR-Titrationsexperimenten keinerlei verändertes Bindungsverhalten zu DltC gegenüber dem DltA Wildtyp. In der Struktur des DltC-DltA-Komplexes wurde für diese Region eine besser definierte Elektronendichte und ein allosterischer Effekt durch die DltC-Bindung gefunden.

Von DltC wurde die Kristallstruktur in mehreren Formen gelöst. Mit DltC S36A wurde die apo-Form imitiert, die nicht mit dem Kofaktor Phosphopantethein modifiziert ist. Für die Daten von zwei verschiedenen Kristallformen der holo-Form von DltC wurden ebenfalls die Strukturen gelöst. Alle drei Strukturen zeigen eine identische Konformation. NMR-Messungen mit  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  markierten Proben bestätigten, dass DltC in der holo-Form dieselbe Konformation besitzt wie DltC S36A, das der apo-Form entspricht.

Die Interaktion von DltC und DltA wurde mit NMR-Titration untersucht. Dabei konnten zwei verschiedene Binderegionen von DltC bestimmt werden, die an der Interaktion mit DltA beteiligt sind. Durch Titration von DltA zu DltC wurden die an der Interaktion beteiligten Reste identifiziert, sowie das stöchiometrische Verhältnis und eine Dissoziationskonstante abgeschätzt. Dabei zeigte sich, dass apo-DltC nur mit einer Regionen bindet, holo-DltC hingegen noch mit einer weiteren Region.

DltA und DltC konnten als Komplex kristallisiert und die Struktur gelöst werden. Diese Struktur zeigt eine neue Art der Bindung zwischen den beiden Proteinen. Die Interaktionsbereiche, die mit NMR bestimmt wurden, passen zu der Struktur des Komplexes.

Zusammen mit den vielen bekannten Strukturen von Adenylat-bildenden Enzymen zeigen diese Ergebnisse, dass viele Details des Zusammenspiels zwischen Adenylat-bildenden Enzymen und den Carrier-Proteinen noch nicht ausreichend verstanden sind. Offensichtlich sind die spezifischen Reste, die die Wechselwirkung verursachen, noch nicht klar definiert. Diese Arbeit konnte wichtige Binderegionen von DltC identifizieren. Auch wurde eine Art der Interaktion von DltA und DltC gezeigt, die möglicherweise bei anderen oder allen Adenylat-bildenden Enzymen und CPs vorkommt. Die aktuelle Theorie über die Wechselwirkung und Reaktion von Adenylat-bildenden Enzymen und CPs sieht diese Bindung jedoch nicht vor, und es ist unklar, wozu sie dient. Weitere Untersuchungen werden klären müssen, welche Rolle dieser Proteinkomplex spielt. Die hier vorgestellte Arbeit hat dafür grundlegende Informationen geliefert und neue Richtungen aufgezeigt, in die weiter geforscht werden sollte. Und da die bisher wenig untersuchten Proteine DltB und DltD erfolgreich rekombinant hergestellt werden konnten, sollte es zukünftig möglich sein, die Interaktion aller vier Dlt-Proteine weiter zu untersuchen

## 5. Literatur

Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkoczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C., and Zwart, P.H.; **PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution**; (2010), *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **66**: 213-221

Alekseyev, V.Y., Liu, C.W., Cane, D.E., Puglisi, J.D., and Khosla, C.; **Solution structure and proposed domain-domain recognition interface of an acyl carrier protein domain from a modular polyketide synthase**; (2007), *Protein Science*, **16**: 2093-2107

Andrec, M., Hill, R.B., and Prestegard, J.H.; **Amide Exchange-Rates in Escherichia-Coli Acyl Carrier Protein - Correlation with Protein-Structure and Dynamics**; (1995), *Protein Science*, **4**: 983-993

Arthur, C.J., Williams, C., Pottage, K., Ploskon, E., Findlow, S.C., Burston, S.G., Simpson, T.J., Crump, M.P., and Crosby, J.; **Structure and Malonyl CoA-ACP Transacylase Binding of Streptomyces coelicolor Fatty Acid Synthase Acyl Carrier Protein**; (2009), *Acs Chemical Biology*, **4**: 625-636

Bains, J. and Boulanger, M.J.; **Biochemical and structural characterization of the paralogous benzoate CoA Ligases from Burkholderia xenovorans LB400: Defining the entry point into the novel benzoate oxidation (box) pathway**; (2-11-2007), *Journal of Molecular Biology*, **373**: 965-977

Baltz, R.H.; **Molecular engineering approaches to peptide, polyketide and other antibiotics**; (2006), *Nature Biotechnology*, **24**: 1533-1540

Battye, T.G.G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H.R., and Leslie, A.G.W.; **iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM**; (2011), *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **67**: 271-281

Boyd, D.A., Cvitkovitch, D.G., Bleiweis, A.S., Kiriukhin, M.Y., Debabov, D.V., Neuhaus, F.C., and Hamilton, I.R.; **Defects in D-alanyl-lipoteichoic acid synthesis in Streptococcus mutans results in acid sensitivity**; (2000), *Journal of Bacteriology*, **182**: 6055-6065

Byers, D.M. and Gong, H.S.; **Acyl carrier protein: structure-function relationships in a conserved multifunctional protein family**; (2007), *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie et Biologie Cellulaire*, **85**: 649-662

Challis, G.L. and Naismith, J.H.; **Structural aspects of non-ribosomal peptide biosynthesis**; (2004), *Curr.Opin.Struct.Biol.*, **14**: 748-756

Chan, D.I. and Vogel, H.J.; **Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein (vol 430, pg 1, 2010)**; (15-9-2010), *Biochemical Journal*, **430**: 559

Conti, E., Franks, N.P., and Brick, P.; **Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes**; (15-3-1996), *Structure*, **4**: 287-298

Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A., and Brick, P.; **Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S**; (16-7-1997), *EMBO J.*, **16**: 4174-4183

Cox, K.H., Ruiz-Bustos, E., Courtney, H.S., Dale, J.B., Pence, M.A., Nizet, V., Aziz, R.K., Gerling, I., Price, S.M., and Hasty, D.L.; **Inactivation of DltA modulates virulence factor expression in Streptococcus pyogenes**; (2009), *PLoS.One.*, **4**: e5366

Crump, M.P., Crosby, J., Dempsey, C.E., Parkinson, J.A., Murray, M., Hopwood, D.A., and Simpson, T.J.; **Solution structure of the actinorhodin polyketide synthase acyl carrier protein from *Streptomyces coelicolor* A3(2)**; (20-5-1997), *Biochemistry*, **36**: 6000-6008

Cryle, M.J. and Schlichting, I.; **Structural insights from a P450 Carrier Protein complex reveal how specificity is achieved in the P450(Biol) ACP complex**; (14-10-2008), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**: 15696-15701

Debabov, D.V., Heaton, M.P., Zhang, Q.Y., Stewart, K.D., Lambalot, R.H., and Neuhaus, F.C.; **The D-alanyl carrier protein in *Lactobacillus casei*: Cloning, sequencing, and expression of dltC**; (1996), *Journal of Bacteriology*, **178**: 3869-3876

Debabov, D.V., Kiriukhin, M.Y., and Neuhaus, F.C.; **Biosynthesis of lipoteichoic acid in *Lactobacillus rhamnosus*: Role of DltD in D-alanylation**; (2000), *Journal of Bacteriology*, **182**: 2855-2864

Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A.; **NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes**; (1995), *J.Biomol.NMR*, **6**: 277-293

Donadio, S., Monciardini, P., and Sosio, M.; **Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics**; (2007), *Natural Product Reports*, **24**: 1073-1109

Drake, E.J., Nicolai, D.A., and Gulick, A.M.; **Structure of the EntB multidomain nonribosomal peptide synthetase and functional analysis of its interaction with the EntE adenylation domain**; (2006), *Chemistry & Biology*, **13**: 409-419

Du, L., He, Y., and Luo, Y.; **Crystal structure and enantiomer selection by D-alanyl carrier protein ligase DltA from *Bacillus cereus***; (4-11-2008a), *Biochemistry*, **47**: 11473-11480

Du, L.Q., He, Y.J., and Luo, Y.; **Crystal Structure and Enantiomer Selection by D-Alanyl Carrier Protein Ligase DltA from *Bacillus cereus***; (4-11-2008b), *Biochemistry*, **47**: 11473-11480

Emsley, P. and Cowtan, K.; **Coot: model-building tools for molecular graphics**; (2004), *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **60**: 2126-2132

Eppelmann, K., Stachelhaus, T., and Marahiel, M.A.; **Exploitation of the selectivity-conferring code of nonribosomal peptide synthetases for the rational design of novel peptide antibiotics**; (30-7-2002), *Biochemistry*, **41**: 9718-9726

Evans, S.E., Williams, C., Arthur, C.J., Burston, S.G., Simpson, T.J., Crosby, J., and Crump, M.P.; **An ACP Structural Switch: Conformational Differences between the Apo and Holo Forms of the Actinorhodin Polyketide Synthase Acyl Carrier Protein**; (13-10-2008), *Chembiochem*, **9**: 2424-2432

Evans, S.E., Williams, C., Arthur, C.J., Ploskon, E., Wattana-Amorn, P., Cox, R.J., Crosby, J., Willis, C.L., Simpson, T.J., and Crump, M.P.; **Probing the Interactions of Early Polyketide Intermediates with the Actinorhodin ACP from *S. coelicolor* A3(2)**; (12-6-2009), *Journal of Molecular Biology*, **389**: 511-528

Findlow, S.C., Winsor, C., Simpson, T.J., Crosby, J., and Crump, M.P.; **Solution structure and dynamics of oxytetracycline polyketide synthase acyl carrier protein from *Streptomyces rimosus***; (22-7-2003), *Biochemistry*, **42**: 8423-8433

Finking, R. and Marahiel, M.A.; **Biosynthesis of nonribosomal peptides**; (2004a), *Annual Review of Microbiology*, **58**: 453-488

- Finking, R., Mofid, M.R., and Marahiel, M.A.; **Mutational analysis of peptidyl carrier protein and acyl carrier protein synthase unveils residues involved in protein-protein recognition**; (20-7-2004b), *Biochemistry*, **43**: 8946-8956
- Fischbach, M.A., Lai, J.R., Roche, E.D., Walsh, C.T., and Liu, D.R.; **Directed evolution can rapidly improve the activity of chimeric assembly-line enzymes**; (17-7-2007), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**: 11951-11956
- Fittipaldi, N., Sekizaki, T., Takamatsu, D., Harel, J., Dominguez-Punaro, M.D., Von Aulock, S., Draing, C., Marois, C., Kobisch, M., and Gottschalk, M.; **D-alanylation of lipoteichoic acid contributes to the virulence of *Streptococcus suis***; (2008), *Infection and Immunity*, **76**: 3587-3594
- Franks, N.P., Jenkins, A., Conti, E., Lieb, W.R., and Brick, P.; **Structural basis for the inhibition of firefly luciferase by a general anesthetic**; (1998), *Biophysical Journal*, **75**: 2205-2211
- Frueh, D.P., Arthanari, H., Koglin, A., Vosburg, D.A., Bennett, A.E., Walsh, C.T., and Wagner, G.; **Dynamic thiolation-thioesterase structure of a non-ribosomal peptide synthetase**; (14-8-2008), *Nature*, **454**: 903-U62
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., and Bairoch, A.; **ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis**; (1-7-2003), *Nucleic Acids Research*, **31**: 3784-3788
- Gill, S.C. and Vonhippel, P.H.; **Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino-Acid Sequence Data**; (1-11-1989), *Analytical Biochemistry*, **182**: 319-326
- Gulick, A.M.; **Conformational dynamics in the Acyl-CoA synthetases, adenylation domains of non-ribosomal peptide synthetases, and firefly luciferase**; (16-10-2009), *ACS Chem.Biol.*, **4**: 811-827
- Gulick, A.M., Lu, X., and Dunaway-Mariano, D.; **Crystal structure of 4-chlorobenzoate:CoA ligase/synthetase in the unliganded and aryl substrate-bound states**; (13-7-2004), *Biochemistry*, **43**: 8670-8679
- Gulick, A.M., Starai, V.J., Horswill, A.R., Homick, K.M., and Escalante-Semerena, J.C.; **The 1.75 Å crystal structure of acetyl-CoA synthetase bound to adenosine-5'-propylphosphate and coenzyme A**; (18-3-2003), *Biochemistry*, **42**: 2866-2873
- Heaton, M.P. and Neuhaus, F.C.; **Biosynthesis of D-Alanyl-Lipoteichoic Acid - Cloning, Nucleotide-Sequence, and Expression of the Lactobacillus-Casei Gene for the D-Alanine-Activating Enzyme**; (1992), *Journal of Bacteriology*, **174**: 4707-4717
- Heaton, M.P. and Neuhaus, F.C.; **Role of the D-Alanyl Carrier Protein in the Biosynthesis of D-Alanyl-Lipoteichoic Acid**; (1994), *Journal of Bacteriology*, **176**: 681-690
- Hisanaga, Y., Ago, H., Nakagawa, N., Hamada, K., Ida, K., Yamamoto, M., Hori, T., Arii, Y., Sugahara, M., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., and Miyano, M.; **Structural basis of the substrate-specific two-step catalysis of long chain fatty acyl-CoA synthetase dimer**; (23-7-2004), *J.Biol.Chem.*, **279**: 31717-31726
- Holm, L., Kaariainen, S., Rosenstrom, P., and Schenkel, A.; **Searching protein structure databases with DaliLite v.3**; (1-12-2008), *Bioinformatics*, **24**: 2780-2781
- Hughes, A.J. and Keatinge-Clay, A.; **Enzymatic Extender Unit Generation for In Vitro Polyketide Synthase Reactions: Structural and Functional Showcasing of Streptomyces coelicolor MatB**; (25-2-2011), *Chemistry & Biology*, **18**: 165-176

- Inouye, S.; **Firefly luciferase: an adenylate-forming enzyme for multicatalytic functions**; (2010), *Cell Mol.Life Sci.*, **67**: 387-404
- Jogl, G. and Tong, L.; **Crystal structure of yeast acetyl-coenzyme A synthetase in complex with AMP**; (17-2-2004), *Biochemistry*, **43**: 1425-1431
- Johnson, B.A. and Blevins, R.A.; **Nmr View - A Computer-Program for the Visualization and Analysis of Nmr Data**; (1994), *Journal of Biomolecular Nmr*, **4**: 603-614
- Johnson, M.A., Peti, W., Herrmann, T., Wilson, I.A., and Wuthrich, K.; **Solution structure of As11650, an acyl carrier protein from Anabaena sp PCC 7120 with a variant phosphopantetheinylation-site sequence**; (2006), *Protein Science*, **15**: 1030-1041
- Kabsch, W.; **Xds**; (2010), *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **66**: 125-132
- Kasahara, T. and Kato, T.; **A new redox-cofactor vitamin for mammals**; (24-4-2003), *Nature*, **422**: 832
- Kim, Y., Kovrigin, E.L., and Eletr, Z.; **NMR studies of Escherichia coli acyl carrier protein: Dynamic and structural differences of the apo- and holo-forms**; (17-3-2006), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **341**: 776-783
- Kim, Y. and Prestegard, J.H.; **A Dynamic-Model for the Structure of Acyl Carrier Protein in Solution**; (31-10-1989), *Biochemistry*, **28**: 8792-8797
- Kiriukhin, M.Y. and Neuhaus, F.C.; **D-alanylation of lipoteichoic acid: Role of the D-alanyl carrier protein in acylation**; (2001), *Journal of Bacteriology*, **183**: 2051-2058
- Kochan, G., Pilka, E.S., von Delft, F., Oppermann, U., and Yue, W.W.; **Structural Snapshots for the Conformation-dependent Catalysis by Human Medium-chain Acyl-coenzyme A Synthetase ACSM2A**; (22-5-2009), *Journal of Molecular Biology*, **388**: 997-1008
- Koglin, A., Mofid, M.R., Lohr, F., Schafer, B., Rogov, V.V., Blum, M.M., Mittag, T., Marahiel, M.A., Bernhard, F., and Dotsch, V.; **Conformational switches modulate protein interactions in peptide antibiotic synthetases**; (14-4-2006), *Science*, **312**: 273-276
- Koglin, A. and Walsh, C.T.; **Structural insights into nonribosomal peptide enzymatic assembly lines**; (2009), *Natural Product Reports*, **26**: 987-1000
- Kramer, N.E., Hasper, H.E., van den Bogaard, P.T.C., Morath, S., de Kruijff, B., Hartung, T., Smid, E.J., Breukink, E., Kok, J., and Kuipers, O.P.; **Increased D-alanylation of lipoteichoic acid and a thickened septum are main determinants in the nisin resistance mechanism of Lactococcus lactis**; (2008), *Microbiology-Sgm*, **154**: 1755-1762
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Cummings, N.J., Daniel, R.A., Denizot, F., Devine, K.M., Dusterhoft, A., Ehrlich, S.D., Emmerson, P.T., Entian, K.D., Errington, J., Fabret, C., Ferrari, E., Foulger, D., Fritz, C., Fujita, M., Fujita, Y., Fuma, S., Galizzi, A., Galleron, N., Ghim, S.Y., Glaser, P., Goffeau, A., Golightly, E.J., Grandi, G., Guiseppi, G., Guy, B.J., Haga, K., Haiech, J., Harwood, C.R., Henaut, A., Hilbert, H., Holsappel, S., Hosono, S., Hullo, M.F., Itaya, M., Jones, L., Joris, B., Karamata, D., Kasahara, Y., KlaerrBlanchard, M., Klein, C., Kobayashi, Y., Koetter, P., Koningstein, G., Krogh, S., Kumano, M., Kurita, K., Lapidus, A., Lardinois, S., Lauber, J., Lazarevic, V., Lee, S.M., Levine, A., Liu, H., Masuda, S., Mael, C., Medigue, C., Medina, N., Mellado, R.P., Mizuno, M., Moestl, D., Nakai, S., Noback, M., Noone, D., O'Reilly, M., Ogawa, K., Ogiwara, A., Oudega, B., Park, S.H., Parro, V., Pohl, T.M., Portetelle, D.,

Porwollik, S., Prescott, A.M., Presecan, E., Pujic, P., Purnelle, B., Rapoport, G., Rey, M., Reynolds, S., Rieger, M., Rivolta, C., Rocha, E., Roche, B., Rose, M., Sadaie, Y., Sato, T., Scanlan, E., Schleich, S., Schroeter, R., Scoffone, F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S.J., Serror, P., Shin, B.S., Soldo, B., Sorokin, A., Tacconi, E., Takagi, T., Takahashi, H., Takemaru, K., Takeuchi, M., Tamakoshi, A., Tanaka, T., Terpstra, P., Tognoni, A., Tosato, V., Uchiyama, S., Vandenbol, M., Vannier, F., Vassarotti, A., Viari, A., Wambutt, R., Wedler, E., Wedler, H., Weitzenegger, T., Winters, P., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamane, K., Yasumoto, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H.F., Zumstein, E., Yoshikawa, H., and Danchin, A.; **The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis***; (20-11-1997), *Nature*, **390**: 249-256

Laemmli, U.K.; **Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4**; (1970), *Nature*, **227**: 680-&

Lai, J.R., Fischbach, M.A., Liu, D.R., and Walsh, C.T.; **A protein interaction surface in nonribosomal peptide synthesis mapped by combinatorial mutagenesis and selection**; (4-4-2006a), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**: 5314-5319

Lai, J.R., Fischbach, M.A., Liu, D.R., and Walsh, C.T.; **Localized protein interaction surfaces on the EntB carrier protein revealed by combinatorial mutagenesis and selection**; (30-8-2006b), *Journal of the American Chemical Society*, **128**: 11002-11003

Lai, J.R., Koglin, A., and Walsh, C.T.; **Carrier protein structure and recognition in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis**; (19-12-2006c), *Biochemistry*, **45**: 14869-14879

Lambalot, R.H. and Walsh, C.T.; **Cloning, Overproduction, and Characterization of the Escherichia-Coli Holo-Acyl Carrier Protein Synthase**; (20-10-1995), *Journal of Biological Chemistry*, **270**: 24658-24661

Lautru, S. and Challis, G.L.; **Substrate recognition by nonribosomal peptide synthetase multi-enzymes**; (2004), *Microbiology-Sgm*, **150**: 1629-1636

Li, Q., Khosla, C., Puglisi, J.D., and Liu, C.W.; **Solution structure and backbone dynamics of the holo form of the frenolicin acyl carrier protein**; (29-4-2003), *Biochemistry*, **42**: 4648-4657

Linne, U., Doekel, S., and Marahiel, M.A.; **Portability of epimerization domain and role of peptidyl carrier protein on epimerization activity in nonribosomal peptide synthetases**; (25-12-2001), *Biochemistry*, **40**: 15824-15834

Linne, U., Schafer, A., Stubbs, M.T., and Marahiel, M.A.; **Aminoacyl-coenzyme A synthesis catalyzed by adenylation domains**; (6-3-2007), *Febs Letters*, **581**: 905-910

Long, F., Vagin, A.A., Young, P., and Murshudov, G.N.; **BALBES: a molecular-replacement pipeline**; (2008), *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **64**: 125-132

Lu, D., Wormann, M.E., Zhang, X.D., Schneewind, O., Grundling, A., and Freemont, P.S.; **Structure-based mechanism of lipoteichoic acid synthesis by *Staphylococcus aureus* LtaS**; (3-2-2009), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**: 1584-1589

Marahiel, M.A., Stachelhaus, T., and Mootz, H.D.; **Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis**; (1997), *Chemical Reviews*, **97**: 2651-2673

Marshall, C.G., Burkart, M.D., Meray, R.K., and Walsh, C.T.; **Carrier protein recognition in siderophore-producing nonribosomal peptide synthetases**; (2-7-2002), *Biochemistry*, **41**: 8429-8437

Matias, V.R.F. and Beveridge, T.J.; **Lipoteichoic Acid Is a Major Component of the *Bacillus subtilis* Periplasm**; (2008), *Journal of Bacteriology*, **190**: 7414-7418

- May, J.J., Finking, R., Wiegeshoff, F., Weber, T.T., Bandur, N., Koert, U., and Marahiel, M.A.; **Inhibition of the D-alanine : D-alanyl carrier protein ligase from Bacillus subtilis increases the bacterium's susceptibility to antibiotics that target the cell wall**; (2005), *Febs Journal*, **272**: 2993-3003
- May, J.J., Kessler, N., Marahiel, M.A., and Stubbs, M.T.; **Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases**; (17-9-2002), *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **99**: 12120-12125
- Mccoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J.; **Phaser crystallographic software**; (2007), *Journal of Applied Crystallography*, **40**: 658-674
- Mofid, M.R., Finking, R., and Marahiel, M.A.; **Recognition of hybrid peptidyl carrier proteins/Acyl carrier proteins in nonribosomal peptide synthetase modules by the 4'-phosphopantetheinyl transferases AcpS and Sfp**; (10-5-2002), *Journal of Biological Chemistry*, **277**: 17023-17031
- Mootz, H.D., Finking, R., and Marahiel, M.A.; **4'-phosphopantetheine transfer in primary and secondary metabolism of Bacillus subtilis**; (5-10-2001), *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 37289-37298
- Moretti, S., Armougom, F., Wallace, I.M., Higgins, D.G., Jongeneel, C.V., and Notredame, C.; **The M-Coffee web server: a meta-method for computing multiple sequence alignments by combining alternative alignment methods**; (2007), *Nucleic Acids Res.*, **35**: W645-W648
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J.; **Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method**; (1-5-1997), *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **53**: 240-255
- Neuhaus, F.C. and Baddiley, J.; **A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria**; (2003), *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, **67**: 686-723
- Neuhaus, F.C., Heaton, M.P., Debabov, D.V., and Zhang, Q.Y.; **The dlt operon in the biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid in Lactobacillus casei**; (1996), *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease*, **2**: 77-84
- Osman, K.T., Du, L.Q., He, Y.J., and Luo, Y.; **Crystal Structure of Bacillus cereus D-Alanyl Carrier Protein Ligase (DltA) in Complex with ATP**; (1-5-2009), *Journal of Molecular Biology*, **388**: 345-355
- Pape, T. and Schneider, T.R.; **HKL2MAP: a graphical user interface for macromolecular phasing with SHELX programs**; (2004), *Journal of Applied Crystallography*, **37**: 843-844
- Parris, K.D., Lin, L., Tam, A., Mathew, R., Hixon, J., Stahl, M., Fritz, C.C., Seehra, J., and Somers, W.S.; **Crystal structures of substrate binding to Bacillus subtilis holo-(acyl carrier protein) synthase reveal a novel trimeric arrangement of molecules resulting in three active sites**; (15-8-2000), *Structure with Folding & Design*, **8**: 883-895
- Perego, M., Glaser, P., Minutello, A., Strauch, M.A., Leopold, K., and Fischer, W.; **Incorporation of D-Alanine Into Lipoteichoic Acid and Wall Teichoic-Acid in Bacillus-Subtilis - Identification of Genes and Regulation**; (30-6-1995), *Journal of Biological Chemistry*, **270**: 15598-15606
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R.W., Kalbacher, H., Jung, G., and Gotz, F.; **Inactivation of the dlt operon in Staphylococcus aureus confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides**; (26-3-1999), *Journal of Biological Chemistry*, **274**: 8405-8410
- Peschel, A., Vuong, C., Otto, M., and Gotz, F.; **The D-alanine residues of Staphylococcus aureus teichoic acids alter the susceptibility to vancomycin and the activity of autolytic enzymes**; (2000), *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**: 2845-2847

Ploskon, E., Arthur, C.J., Evans, S.E., Williams, C., Crosby, J., Simpson, T.J., and Crump, M.P.; **A mammalian type I fatty acid synthase acyl carrier protein domain does not sequester acyl chains**; (4-1-2008), *Journal of Biological Chemistry*, **283**: 518-528

Qiu, X.Y. and Janson, C.A.; **Structure of apo acyl carrier protein and a proposal to engineer protein crystallization through metal ions**; (2004), *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*, **60**: 1545-1554

Rafi, S., Novichenok, P., Kolappan, S., Zhang, X.J., Stratton, C.F., Rawat, R., Kisker, C., Simmerling, C., and Tonge, P.J.; **Structure of acyl carrier protein bound to FabI, the FASII enoyl reductase from Escherichia coli**; (22-12-2006), *Journal of Biological Chemistry*, **281**: 39285-39293

Reger, A.S., Carney, J.M., and Gulick, A.M.; **Biochemical and crystallographic analysis of substrate binding and conformational changes in Acetyl-CoA synthetase**; (5-6-2007), *Biochemistry*, **46**: 6536-6546

Reger, A.S., Wu, R., Dunaway-Mariano, D., and Gulick, A.M.; **Structural characterization of a 140 degrees domain movement in the two-step reaction catalyzed by 4-Chlorobenzoate : CoA ligase**; (5-8-2008), *Biochemistry*, **47**: 8016-8025

Reuter, K., Mofid, M.R., Marahiel, M.A., and Ficner, R.; **Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme Sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily**; (1-12-1999), *Embo Journal*, **18**: 6823-6831

Richardt, A., Kemme, T., Wagner, S., Schwarzer, D., Marahiel, M.A., and Hovemann, B.T.; **Ebony, a novel nonribosomal peptide synthetase for beta-alanine conjugation with biogenic amines in Drosophila**; (17-10-2003), *Journal of Biological Chemistry*, **278**: 41160-41166

Roujeinikova, A., Baldock, C., Simon, W.J., Gilroy, J., Baker, P.J., Stuitje, A.R., Rice, D.W., Slabas, A.R., and Rafferty, J.B.; **X-ray crystallographic studies on butyryl-ACP reveal flexibility of the structure around a putative acyl chain binding site**; (2002), *Structure*, **10**: 825-835

Roujeinikova, A., Simon, W.J., Gilroy, J., Rice, D.W., Rafferty, J.B., and Slabas, A.R.; **Structural studies of fatty acyl-(acyl carrier protein) thioesters reveal a hydrophobic binding cavity that can expand to fit longer substrates**; (5-1-2007), *Journal of Molecular Biology*, **365**: 135-145

Samel, S.A., Schoenafinger, G., Knappe, T.A., Marahiel, M.A., and Essen, L.O.; **Structural and functional insights into a peptide bond-forming bidomain from a nonribosomal peptide synthetase**; (2007), *Structure*, **15**: 781-792

Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, J.C., Hutchison, C.A., Slocombe, P.M., and Smith, M.; **Nucleotide-Sequence of Bacteriophage Phichi174 Dna**; (1977), *Nature*, **265**: 687-695

Schagger, H., Aquila, H., and Von Jagow, G.; **Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis**; (15-8-1988), *Anal.Biochem.*, **173**: 201-205

Schmelz, S. and Naismith, J.H.; **Adenylate-forming enzymes**; (2009), *Current Opinion in Structural Biology*, **19**: 666-671

Schneider, A., Stachelhaus, T., and Marahiel, M.A.; **Targeted alteration of the substrate specificity of peptide synthetases by rational module swapping**; (1998), *Molecular and General Genetics*, **257**: 308-318

Schwarzer, D., Finking, R., and Marahiel, M.A.; **Nonribosomal peptides: from genes to products**; (2003), *Nat.Prod.Rep.*, **20**: 275-287

Schwarzer, D., Mootz, H.D., Linne, U., and Marahiel, M.A.; **Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases**; (29-10-2002), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**: 14083-14088

Shah, M.B., Ingram-Smith, C., Cooper, L.L., Qu, J., Meng, Y., Smith, K.S., and Gulick, A.M.; **The 2.1 angstrom crystal structure of an acyl-CoA synthetase from *Methanosarcina acetivorans* reveals an alternate acyl-binding pocket for small branched acyl substrates**; (15-11-2009), *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, **77**: 685-698

Sheldrick, G.M.; **A short history of SHELX**; (2008), *Acta Crystallographica Section A*, **64**: 112-122

Shiratsuchi, A., Shimizu, K., Watanabe, I., Hashimoto, Y., Kurokawa, K., Razanajatovo, I.M., Park, K.H., Park, H.K., Lee, B.L., Sekimizu, K., and Nakanishi, Y.; **Auxiliary role for d-alanylated wall teichoic acid in Toll-like receptor 2-mediated survival of *Staphylococcus aureus* in macrophages**; (2010), *Immunology*, **129**: 268-277

Sieber, S.A. and Marahiel, M.A.; **Learning from nature's drug factories: Nonribosomal synthesis of macrocyclic peptides**; (2003), *Journal of Bacteriology*, **185**: 7036-7043

Sieber, S.A. and Marahiel, M.A.; **Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: Approaches to new antibiotics**; (2005), *Chemical Reviews*, **105**: 715-738

Stachelhaus, T., Mootz, H.D., and Marahiel, M.A.; **The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases**; (1999), *Chem.Biol.*, **6**: 493-505

Stachelhaus, T., Schneider, A., and Marahiel, M.A.; **Rational Design of Peptide Antibiotics by Targeted Replacement of Bacterial and Fungal Domains**; (7-7-1995), *Science*, **269**: 69-72

Strieker, M., Tanovic, A., and Marahiel, M.A.; **Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics**; (2010), *Current Opinion in Structural Biology*, **20**: 234-240

Tabuchi, Y., Shiratsuchi, A., Kurokawa, K., Gong, J.H., Sekimizu, K., Lee, B.L., and Nakanishi, Y.; **Inhibitory Role for D-Alanylation of Wall Teichoic Acid in Activation of Insect Toll Pathway by Peptidoglycan of *Staphylococcus aureus***; (15-8-2010), *Journal of Immunology*, **185**: 2424-2431

Tanovic, A., Samel, S.A., Essen, L.O., and Marahiel, M.A.; **Crystal structure of the termination module of a nonribosomal peptide synthetase**; (1-8-2008), *Science*, **321**: 659-663

Vanduyne, G.D., Standaert, R.F., Karplus, P.A., Schreiber, S.L., and Clardy, J.; **Atomic Structures of the Human Immunophilin Fkbp-12 Complexes with Fk506 and Rapamycin**; (5-1-1993), *Journal of Molecular Biology*, **229**: 105-124

Velez, M.P., Verhoeven, T.L.A., Draing, C., Von Aulock, S., Pfitzenmaier, M., Geyer, A., Lambrichts, I., Grangette, C., Pot, B., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S.C.J.; **Functional analysis of D-alanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG**; (2007), *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 3595-3604

Volkman, B.F., Zhang, Q.Y., Debabov, D.V., Rivera, E., Kresheck, G.C., and Neuhaus, F.C.; **Biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid: The tertiary structure of apo-D-alanyl carrier protein**; (10-7-2001), *Biochemistry*, **40**: 7964-7972

Walsh, C.T.; **Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Modularity and versatility**; (19-3-2004), *Science*, **303**: 1805-1810

Weber, T., Baumgartner, R., Renner, C., Marahiel, M.A., and Holak, T.A.; **Solution structure of PCP, a prototype for the peptidyl carrier domains of modular peptide synthetases**; (15-4-2000), *Structure with Folding & Design*, **8**: 407-418

Weber, T. and Marahiel, M.A.; **Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases**; (10-1-2001), *Structure*, **9**: R3-R9

Wecke, J., Madela, K., and Fischer, W.; **The absence of D-alanine from lipoteichoic acid and wall teichoic acid alters surface charge, enhances autolysis and increases susceptibility to methicillin in *Bacillus subtilis***; (1997), *Microbiology-Uk*, **143**: 2953-2960

Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G., McCoy, A., McNicholas, S.J., Murshudov, G.N., Pannu, N.S., Potterton, E.A., Powell, H.R., Read, R.J., Vagin, A., and Wilson, K.S.; **Overview of the CCP4 suite and current developments**; (2011), *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.*, **67**: 235-242

Wong, H.C., Liu, G.H., Zhang, Y.M., Rock, C.O., and Zheng, J.; **The solution structure of acyl carrier protein from *Mycobacterium tuberculosis***; (3-5-2002), *Journal of Biological Chemistry*, **277**: 15874-15880

Worsham, L.A.S., Earls, L., Jolly, C., Langston, K.G., Trent, M.S., and Ernst-Fonberg, M.L.; **Amino acid residues of *Escherichia coli* acyl carrier protein involved in heterologous protein interactions**; (14-1-2003), *Biochemistry*, **42**: 167-176

Wu, B.N., Zhang, Y.M., Rock, C.O., and Zheng, J.J.; **Structural modification of acyl carrier protein by butyryl group**; (2009a), *Protein Science*, **18**: 240-246

Wu, R., Reger, A.S., Cao, J., Gulick, A.M., and Dunaway-Mariano, D.; **Rational redesign of the 4-chlorobenzoate binding site of 4-chlorobenzoate: Coenzyme A ligase for expanded substrate range**; (18-12-2007), *Biochemistry*, **46**: 14487-14499

Wu, R., Reger, A.S., Lu, X.F., Gulick, A.M., and Dunaway-Mariano, D.; **The Mechanism of Domain Alternation in the Acyl-Adenylate Forming Ligase Superfamily Member 4-Chlorobenzoate: Coenzyme A Ligase**; (19-5-2009b), *Biochemistry*, **48**: 4115-4125

Xu, G.Y., Tam, A., Lin, L., Hixon, J., Fritz, C.C., and Powers, R.; **Solution structure of B-subtilis acyl carrier protein**; (7-4-2001), *Structure*, **9**: 277-287

Yamanaka, K., Maruyama, C., Takagi, H., and Hamano, Y.; **epsilon-Poly-L-lysine dispersity is controlled by a highly unusual nonribosomal peptide synthetase**; (2008), *Nature Chemical Biology*, **4**: 766-772

Yonus, H., Neumann, P., Zimmermann, S., May, J.J., Marahiel, M.A., and Stubbs, M.T.; **Crystal Structure of DltA Implications for the Reaction Mechanism of Non-Ribosomal Peptide Synthetase Adenylation Domains**; (21-11-2008), *Journal of Biological Chemistry*, **283**: 32484-32491

Zhang, Y.M., Rao, M.S., Heath, R.J., Price, A.C., Olson, A.J., Rock, C.O., and White, S.W.; **Identification and analysis of the acyl carrier protein (ACP) docking site on beta-ketoacyl-ACP synthase III**; (16-3-2001), *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 8231-8238

Zhang, Y.M., Wu, B.N., Zheng, J., and Rock, C.O.; **Key residues responsible for acyl carrier protein and beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase (FabG) interaction**; (26-12-2003), *Journal of Biological Chemistry*, **278**: 52935-52943

Zhang, Z.N., Zhou, R., Sauder, J.M., Tonge, P.J., Burley, S.K., and Swaminathan, S.; **Structural and Functional Studies of Fatty Acyl Adenylate Ligases from *E. coli* and *L. pneumophila***; (18-2-2011), *Journal of Molecular Biology*, **406**: 313-324

Zhou, Z., Lai, J.R., and Walsh, C.T.; **Interdomain communication between the thiolation and thioesterase domains of EntF explored by combinatorial mutagenesis and selection**; (2006), *Chemistry & Biology*, **13**: 869-879

Zhou, Z., Lai, J.R., and Walsh, C.T.; **Directed evolution of aryl carrier proteins in the enterobactin synthetase**; (10-7-2007), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**: 11621-11626

Zmasek, C.M. and Eddy, S.R.; **ATV: display and manipulation of annotated phylogenetic trees**; (2001), *Bioinformatics*, **17**: 383-384

Zornetzer, G.A., Fox, B.G., and Markley, J.L.; **Solution structures of spinach acyl carrier protein with decanoate and stearate**; (25-4-2006), *Biochemistry*, **45**: 5217-5227

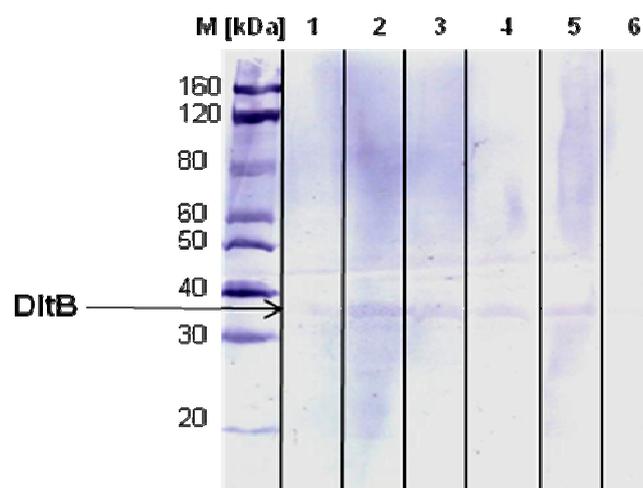
## 6. Anhang

### Anhang I: Klonierung und Expression von DltD und DltB

Für spätere Untersuchungen der Wechselwirkungen mit DltB und DltD wurden geeignete Konstrukte zur Expression dieser beiden Membranproteine generiert.

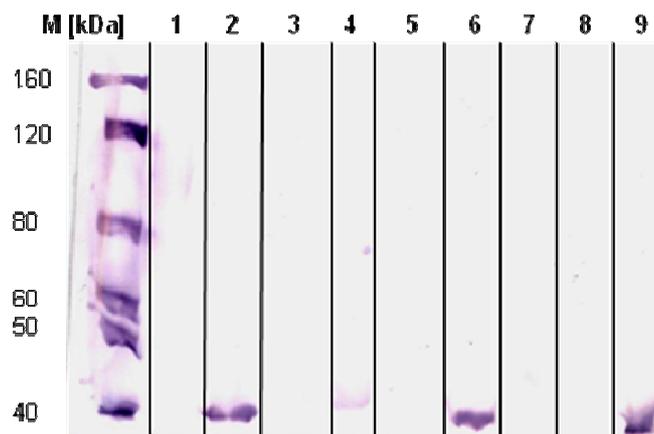
So wurde die DNA-Sequenz von *dltB* aus *Bacillus subtilis* in die Vektoren pET-15b, pET-15b TEV, pET-19b, pET-21a und pET-28b kloniert. Alle Vektoren besitzen einen His-tag. Die Klonierung erfolgte mit den in Tabelle 5, Kapitel 2.2 angegebenen Oligonukleotiden unter Verwendung der Restriktionsenzyme NheI und XhoI. Alle Vektoren wurden in BL21 (DE3) Zellen unter verschiedenen Temperaturen und mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen auf Expression getestet. Untersucht wurden Temperaturen von 4 °C und 37 °C, sowie IPTG-Konzentrationen von 0,1 mM, 0,2 mM und 0,5 mM. Als effektivste Expressionsbedingungen wurde eine Induktion mit 1 mM IPTG bei einer optischen Dichte von ungefähr 1 und einer Expression über Nacht bei 30 °C gefunden.

Bei keinem Expressionsversuch konnte DltB in einem mit Commassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgel detektiert werden. Daher wurde *Immunoblotting* mit einem anti-His-tag Antikörper zur Detektion verwendet. Mittels dieser Methode konnte eine sehr schwache Expression von DltB gefunden werden (Abbildung 42). Bemerkenswerterweise konnte für alle verwendeten Konstrukte mit DltB schwache Expression beobachtet werden. Dabei war die Expression mit pET-15b am stärksten und mit pET-28a am schwächsten.



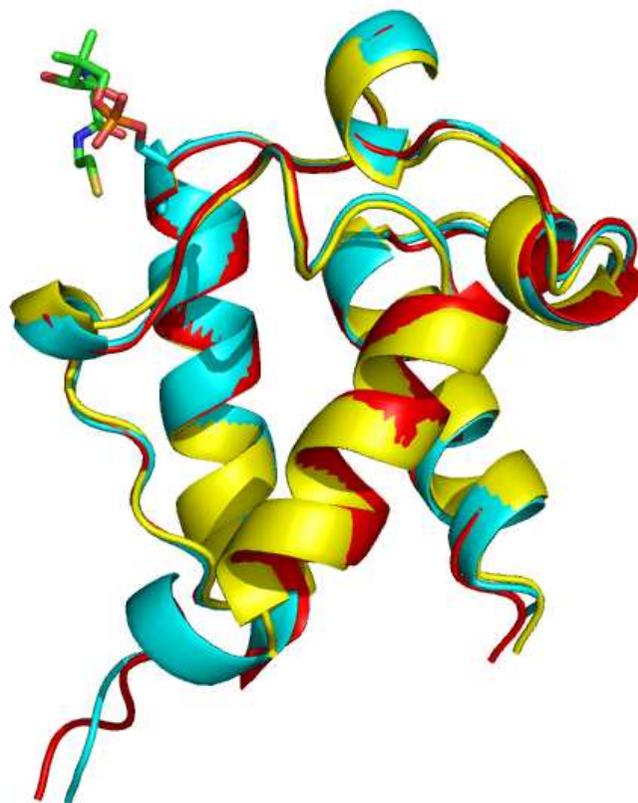
**Abbildung 42:** Immunoblotting-Membran zum Nachweis der Expression von DltB (43 kDa); M: Proteinstandard in Kilodalton, 1: leer, 2: pET15b/*dltB*, 3: pET-15b TEV/*dltB*, 4: pET-19b/*dltB*, 5: pET-21a/*dltB*, 6: pET-28a/*dltB*. Die Detektion erfolgte mit Alkalischer Phosphatase.

Für DltD wurden zwei verschiedene Varianten generiert. Einmal wurde das vollständige Protein verwendet. Als zweites wurde eine Mutante generiert, die um die N-terminalen 26 Aminosäuren verkürzt wurde. Diese 26 Aminosäuren sind hydrophob und dienen wahrscheinlich als Membrananker für DltD. Durch das Entfernen dieser Aminosäuren sollte eine lösliche Form von DltD geschaffen werden, die im Zellplasma vorkommt und damit in größerer Menge produziert werden und leichter gereinigt werden kann. Für die Vollängenform von DltD, im weiteren DltD\_wt genannt, wurden das Gen *dltD* aus *Bacillus subtilis* in die Vektoren pET-15b, pET-15b TEV, pET-19b, pET-20b, pET-21a, pET-22b und pET-28a kloniert. Die um 26 Aminosäuren verkürzte Mutante, im weiteren DltD\_tr genannt, wurde in den Vektor pET-20b kloniert. Die Untersuchung der Expressionsbedingungen erfolgte auf die gleiche Art wie bei DltB. Die größte Menge an exprimierten DltD und DltD\_tr wurde bei einer Induktion mit 1 mM IPTG bei einer optischen Dichte von ungefähr 1, und darauf folgend einer Inkubation über Nacht bei 37 °C erhalten. Auch hier konnte die erfolgreiche Expression nur mit Immunoblotting detektiert werden, obwohl die Banden deutlich ausgeprägter waren als bei DltB, was auf eine stärkere Expression hindeutet. Ein Immunoblot eines Expressionstest von DltD\_wt und DltD\_tr ist in Abbildung 43 gezeigt. Für DltD\_wt konnte mit pET-20b, pET-21a, pET-22b und pET-28a Expression festgestellt werden. Auch die N-terminal verkürzte Variante DltD\_tr konnte in pET-20b erfolgreich exprimiert werden.



**Abbildung 43:** Immunoblotting-Membran zum Nachweis der Expression von DltD (43 kDa); M: Proteinstandard in Kilodalton, 1: pET-15b/*dltD*\_wt, 2: pET-21a/*dltD*\_wt, 3: pET-28a/*dltB*, 4: pET-28a/*dltD*\_wt, 5: pET-15b TEV/*dltB*, 6: pET-20b/*dltD*\_tr, 7: pET-19b/*dltD*\_wt, 8: pET-19b/*dltB*, 9: pET-22b/*dltD*\_wt. Die Detektion erfolgte mit Alkalischer Phosphatase.

## Anhang II: Zusätzliche Abbildungen



**Abbildung 44:** Strukturelle Überlagerung der drei Strukturen von ungebundenem DltC. DltC S36A ist rot dargestellt, DltC\_wt Form I in gelb und DltC\_wt Form II in cyan. Der Kofaktor PPant der Struktur von DltC\_wt II ist zur Orientierung als *stick* dargestellt.

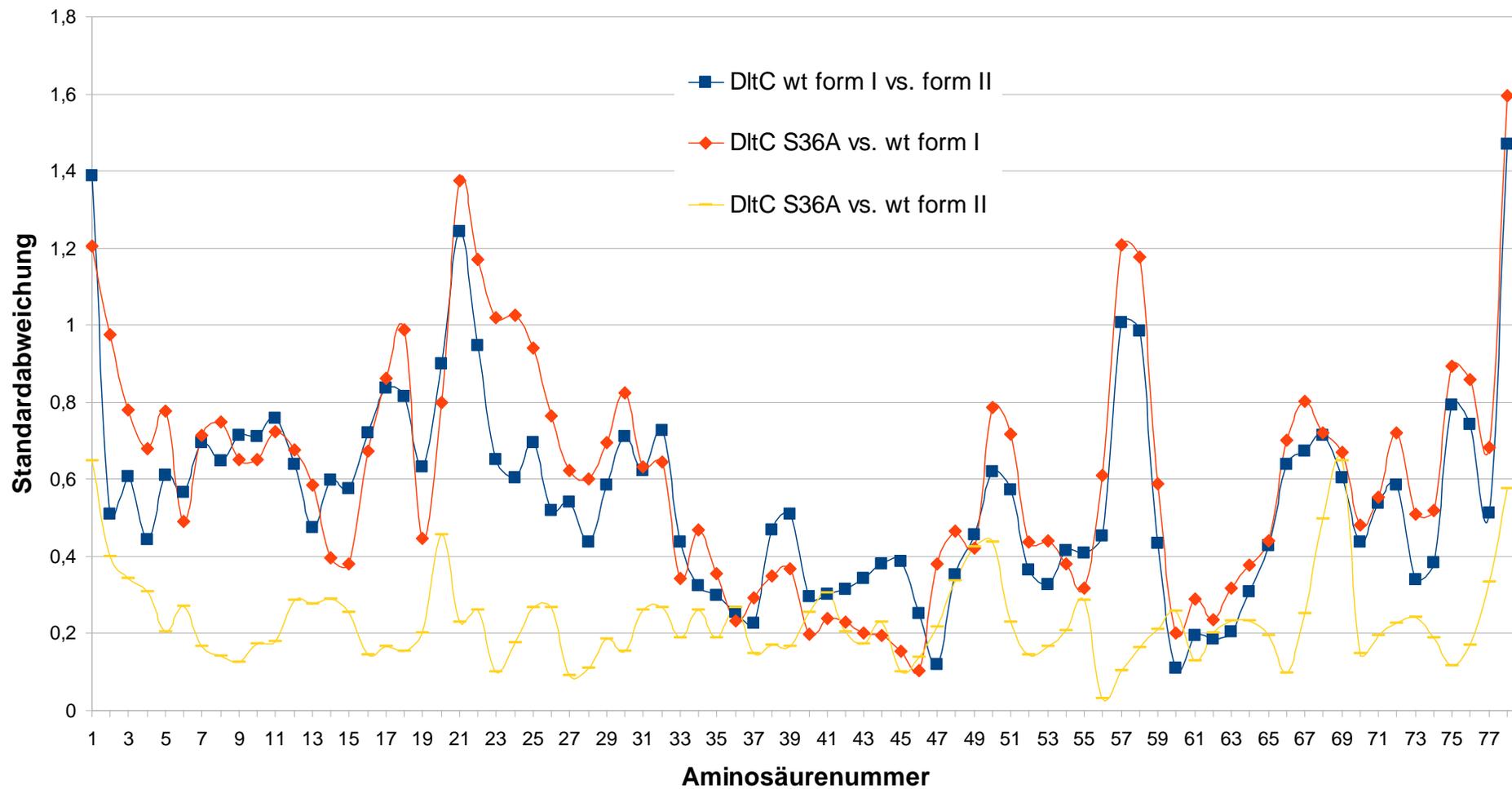


Abbildung 45: Die Standardabweichung der einzelnen Aminosäurereste bei einer Überlagerung der drei Strukturen von DltC.

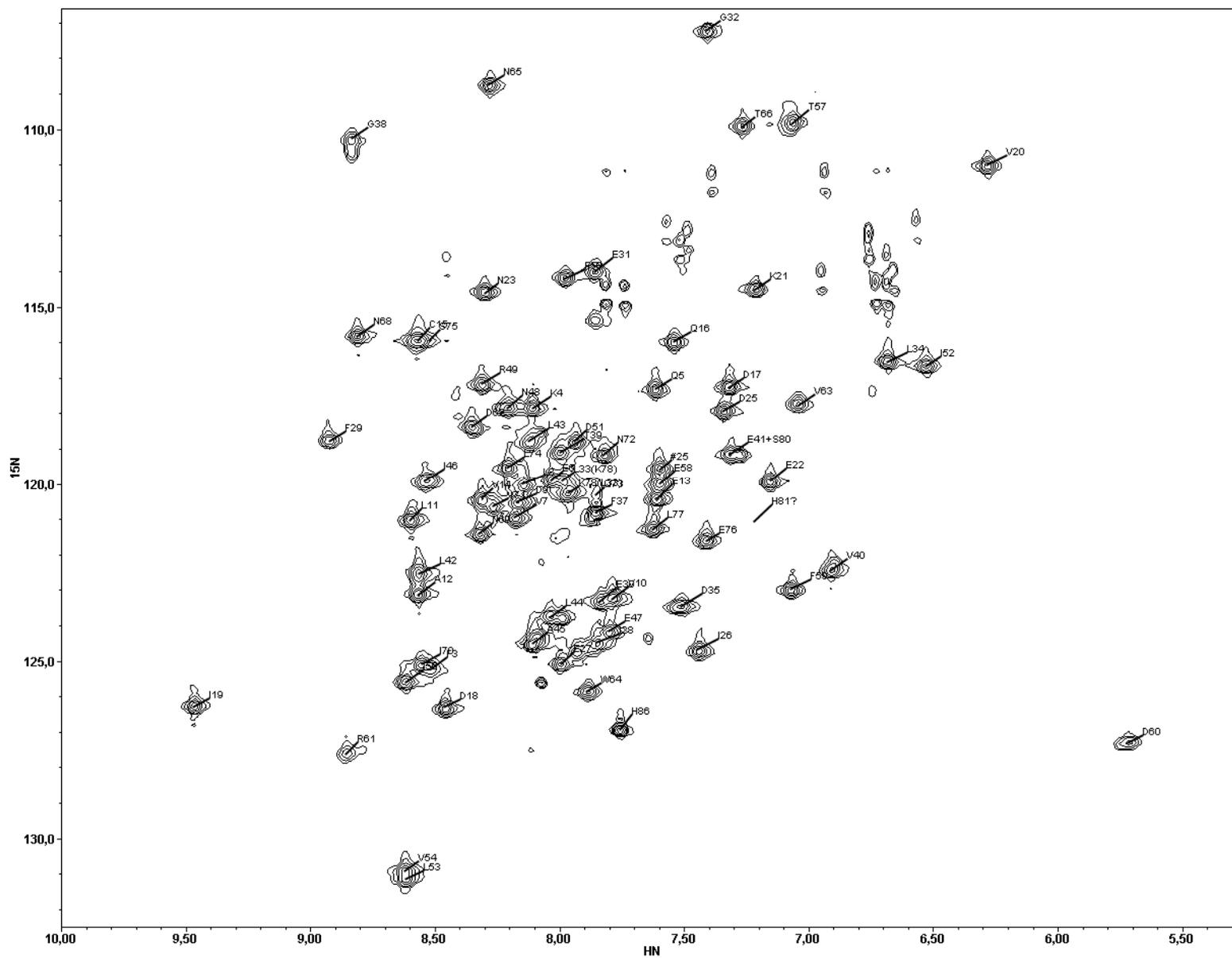
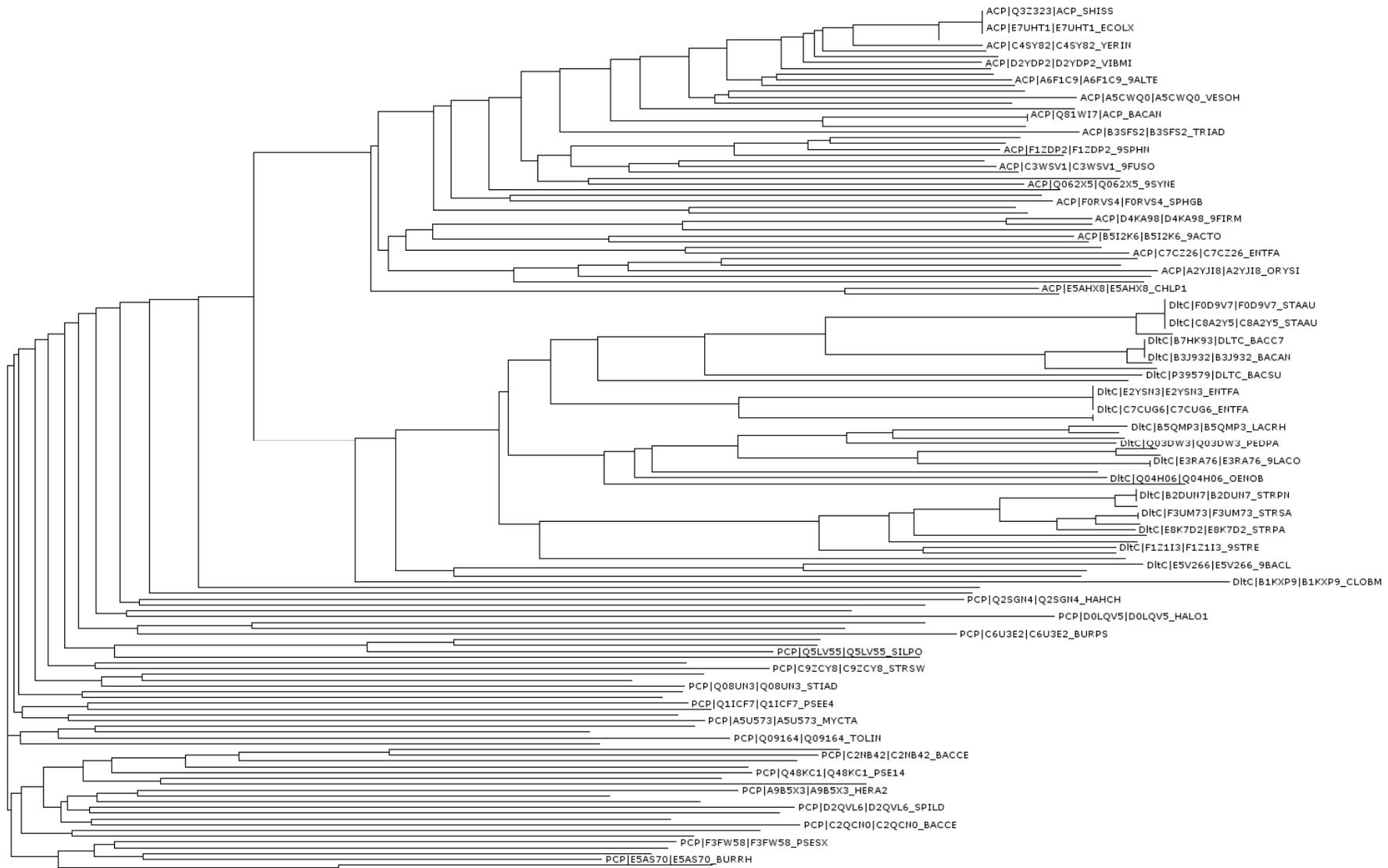


Abbildung 46: Das  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum von DltC S36A





**Abbildung 48:** Phylogenetischer Baum von DltCs, ACPs und PCP. ACPs, PCPs und DltCs bilden je eine eigene Gruppe. DltCs sind näher mit ACPs verwandt als mit PCPs. Vergleich erstellt mit T-Coffee (Moretti et al., 2007) und graphisch aufbereitet mit ATV (Zmasek et al., 2001).

## Anhang III: Verwendete Abkürzungen und Fachbegriffe

|       |   |
|-------|---|
| Abu   | Aminobuttersäure  |
| ACP   | Acyl-Carrier-Protein  |
| ACS   | Acyl-Coenzym A-Synthase   |
| Ala   | Alanin  |
| AMP   | Adenosin-Monophosphat   |
| Arg   | Arginin   |
| Asn   | Asparagin   |
| ATP   | Adenosin-Triphosphat  |
| Asp   | Aspartat  |
| BCIP  | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat   |
| CAMP  | <i>cationic antimicrobial peptide</i> (Kationisches antimikrobielles Peptid)                                    |
| CoA   | Coenzym A   |
| Cys   | Cystein   |
| DMF   | Dimethylformamid  |
| DNA   | <i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)  |
| Gln   | Glutamin  |
| Glu   | Glutamat  |
| Gro-P | 3-Phosphoglycerin   |
| Gly   | Glycin  |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure  |
| His   | Histidin  |
| IgG   | Immunoglobulin G  |
| Ile   | Isoleucin   |
| IMAC  | <i>immobilized metal ion affinity chromatography</i> (Affinitätschromatographie mit immobilisierten Metalionen) |
| IPTG  | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid  |
| LB    | <i>lysogeny broth</i>   |
| Leu   | Leucin  |
| LPS   | Lipopolysaccharid   |
| LTA   | <i>lipoteichoic acid</i> (Lipoteichonsäure)   |
| Lys   | Lysin   |
| MAD   | Multiple anomale Dispersion   |
| Met   | Methionin   |
| NBT   | Nitroblau-Tetrazoliumchlorid  |
| NMR   | Nuklearmagnetresonanz   |
| NRPS  | Nichtribosomale Peptidsynthetasen   |

|                 |   |
|-----------------|---|
| NTP             | Nukleosidtriphosphate   |
| OD              | Optische Dichte   |
| PCP             | Peptidyl-Carrier-Protein  |
| PCR             | <i>polymerase chain reaction</i><br>(Polymerasekettenreaktion)            |
| PDB             | Proteindatenbank  |
| Phe             | Phenylalanin  |
| PPant           | 4'-Phosphopantethein  |
| PP <sub>i</sub> | Pyrophosphat  |
| Pro             | Prolin  |
| PVDF            | Polyvinylidenfluorid  |
| SDS             | <i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)                      |
| SEC             | <i>size exclusion chromatography</i><br>(Größenausschlusschromatographie) |
| Ser             | Serin   |
| TA              | <i>teichoic acid</i> (Teichonsäure)                                       |
| TEMED           | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin  |
| Thr             | Threonin  |
| TRIS            | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan   |
| tRNA            | Transfer-Ribonukleinsäure   |
| Trp             | Tryptophan  |
| Tyr             | Tyrosin   |
| wt              | Wildtyp   |
| WTA             | <i>wall teichoic acid</i> (Zellwandteichonsäure)                          |
| Val             | Valin   |

*Mein besonderer Dank geht an*

*Prof. Milton T. Stubbs für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe an einem sehr interessante Thema und in einem sehr guten Arbeitsumfeld diese Arbeit anfertigen zu dürfen.*

*Dr. Piotr Neumann, Dr. Christoph Parthier und Dr. Petr Kolenko für die Hilfe bei vielen, vor allem computerisierten Fragen.*

*Dr. Annett Weidner und Dr. Constanze Breithaupt-Than für das Korrekturlesen und viele Anregungen und Verbesserungsvorschläge.*

*Kati Franzke für das Durchführen vieler meiner Laborarbeiten, auch wenn ich mal wieder einfach nur was ausprobieren wollte.*

*Und der gesamten AG Stubbs für Vorschläge, Tipps und Hilfe bei so ziemlich jedem denkbaren und undenkbaeren Problem und ein immer nettes, freundliches und vor allem lustiges Arbeitsklima.*

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnomme Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen Einrichtung eingereicht.

Halle/Saale, August 2011

## Lebenslauf

Stephan Zimmermann

geboren am 20.04.1982

in Halle/Saale

### Ausbildung:

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Juni 2000                     | Abitur, Christian-Wolff-Gymnasium Halle/Saale   |
| Juli 2000 – April 2001        | Wehrdienst  |
| Oktober 2001 – September 2006 | Studium der Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss als Diplom-Biochemiker |
| Oktober 2006 – August 2011    | Anfertigung der vorliegenden Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Milton T. Stubbs           |