

Struktur- und Funktionsuntersuchungen
von Dlt-Proteinen aus
Streptococcus pneumoniae

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

(Biowissenschaften)

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Frau Birthe Steigemann

geboren am 02.08.1987 in Lönigen

Betreuer: Prof. Dr. Milton T. Stubbs

1. Gutachter: Prof. Dr. Milton T. Stubbs
2. Gutachter: Prof. Dr. Gary R. Sawers
3. Gutachter: Prof. Dr. Wulf Blankenfeldt

Datum der öffentlichen Verteidigung: 27.05.2021

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr. Frank Bordusa

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	v
1 Einleitung	1
1.1 Bakterielle Zellwände und Teichonsäuren	1
1.2 D-Alanylierung von Teichonsäuren	5
1.2.1 DltA	6
1.2.2 DltC	11
1.2.3 DltB	11
1.2.4 DltD	12
1.3 Postulierte Modelle für die D-Alanylierung von Teichonsäuren	14
1.4 Zielstellung	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Materialien	19
2.1.1 Chemikalien	19
2.1.2 Geräte	21
2.1.3 Kommerzielle Kits	22
2.1.4 FPLC-Säulen	23
2.1.5 Bakterienstämme	24
2.1.6 Vektoren	24
2.2 Molekularbiologische Arbeiten	24
2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	24
2.2.2 Reinigung von PCR-Produkten	27
2.2.3 Restriktionsverdau von PCR-Produkten und Vektoren	27
2.2.4 Reinigung von geschnittener DNA	27
2.2.5 Ligation	27
2.2.6 Präparation von Plasmid-DNA	28
2.2.7 Bestimmung der DNA-Konzentration	28
2.2.8 DNA-Sequenzierung	28
2.2.9 Agarosegele	28
2.3 Proteinexpression	29
2.3.1 Herstellung von Stammlösungen zur Expression	29
2.3.2 Herstellung von chemisch kompetenten Zellen	29
2.3.3 Transformation	30
2.3.4 Vorkulturen	30
2.3.5 Hauptkultur	30
2.3.6 Glycerinkulturen	30

2.4	Proteinreinigung	31
2.4.1	Zellaufschluss	31
2.4.2	Erste IMAC	31
2.4.3	TEV-Proteaseverdau	31
2.4.4	Zweite IMAC	32
2.4.5	Größenausschlusschromatographie (SEC)	32
2.5	Proteinanalytik	32
2.5.1	Glycin-SDS-PAGE	32
2.5.2	Coomassiefärbung	33
2.5.3	UV-Vis-Spektroskopie	33
2.5.4	CD-Spektroskopie (Zirkulardichroismus)	34
2.5.5	Massenspektrometrie	34
2.5.6	Analytische Ultrazentrifugation	35
2.6	Kristallisation und Strukturbestimmung	36
2.6.1	Initiale Kristallisationsscreenings	36
2.6.2	Optimierung der Kristallisation	36
2.6.3	Röntgendiffraktion und Prozessierung	37
2.6.4	Phasenbestimmung - <i>molecular replacement</i>	37
2.6.5	Strukturverfeinerung und Auswertung	37
2.7	Ermittlung der Funktion von <i>SpDltD_{tr}</i>	38
2.7.1	Inhibierungsversuche	38
2.7.2	Thioestersynthese	39
2.7.3	Thioesterabbau	40
3	<i>SpDltA</i>	41
3.1	Ergebnisse zu <i>SpDltA</i>	41
3.1.1	Klonierung, Proteinpräparation und Proteinanalytik	41
3.1.2	Interaktionsstudien (analytische Ultrazentrifugation)	43
3.1.3	Strukturuntersuchungen an <i>SpDltA</i>	44
3.2	Diskussion zu <i>SpDltA</i>	58
3.2.1	Die offenen Konformationen	58
3.2.2	Die Transferkonformation	67
3.3	Zusammenfassung der neuen Erkenntnisse zu <i>SpDltA</i>	70
4	<i>SpDltD_{tr}</i>	73
4.1	Ergebnisse zu <i>SpDltD_{tr}</i>	73
4.1.1	Klonierung, Proteinpräparation und Proteinanalytik	73
4.1.2	Mutagenese	77
4.1.3	Interaktionsstudien (analytischer Ultrazentrifugation)	78
4.1.4	Kristallisation, Röntgendiffraktion und Strukturaufklärung	80

4.1.5	Kristallstruktur	82
4.1.6	Ähnlichkeiten zu anderen dreidimensionalen Strukturen	92
4.1.7	Inhibierung und Aktivitätsmessungen von <i>SpDltD_{tr}</i> . .	95
4.2	Diskussion zu <i>SpDltD_{tr}</i>	96
4.2.1	Interaktionen mit <i>SpDltA</i> und <i>SpDltC</i>	96
4.2.2	Multimere von <i>SpDltD_{tr}</i>	97
4.2.3	Hypothetische katalytische Triade	99
4.2.4	Vergleich von DltD mit SGNH-Hydrolasen	101
4.3	Zusammenfassung und Ausblick zu <i>SpDltD_{tr}</i>	105
Zusammenfassung		106
Anhang		I
A.1	Sequenzvergleiche	I
A.2	Reinigung	IV
A.3	Analyse des Syntheseprodukts	VIII
A.4	Multiples Sequenzalignment und ConSurf	X
A.5	Thiolassay	XI
Literaturverzeichnis		XII
Abbildungsverzeichnis		XXIII
Tabellenverzeichnis		XXVI
Danksagung		XXVIII
Lebenslauf		XXIX
Eidesstattliche Erklärung		XXXI

Abkürzungen

Abkürzung	Voller Name
Å	Ångström
AATGal	2-Acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxygalactose
ACAT	Acyl-Coenzym A: Cholesterol Acyltransferase
ACP	<i>acyl carrier protein</i>
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
<i>alg</i>	<i>acetylation of alginate</i>
AMPCPP	Adenosin-5'-[(α,β)-methyleno]triphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bis-Acrylamid	Acrylamid-Bisacrylamid Mischung
<i>BcDltA</i>	DltA aus <i>Bacillus cereus</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
<i>BsDltA</i>	DltA aus <i>Bacillus subtilis</i>
CAMP	<i>cationic antimicrobial peptide</i>
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
DCM	Dichlormethan
DGAT	Diacylglycerol-O-Acyltransferase
<i>dlt</i>	<i>D-alanylation of lipoteichoic acids</i>
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP	Diethyl- <i>p</i> -Nitrophenylphosphat
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
<i>g</i>	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
Glc	Glucose
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
[His] ₆ -Tag	Histidintag mit 6 Histidinen
LABLAT	<i>lipid A biosynthesis late acyltransferase</i>
LB	Luria-Bertani
LTA	Lipoteichonsäure (<i>lipoteichoic acid</i>)
Luc	Leuchtkäfer-Luciferase
MBOAT	<i>membrane bound O-acetylation transferase</i>

Abkürzung	Voller Name
<i>m.w.c.o.</i>	<i>molecular weight cut off</i>
NRPS	<i>non-ribosomal peptide synthetase</i>
<i>p-loop</i>	<i>phosphate-binding loop</i>
PCP	<i>peptide carrier protein</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG (Nummer)	Polyethylenglycol (durchschnittliche Polymermasse)
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
Rib-P	Ribitolphosphat
<i>r.m.s.d</i>	<i>root mean square deviation</i>
S	Svedberg (Einheit Sedimentationskoeffizient)
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate</i> <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
Sfp	4'-Phosphopantetheinyl-Transferase
SGNH-Hydrolase	Serin-Glycin-Asparagin-Histidin-Hydrolase
SOB	<i>super optimal broth</i>
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
<i>SpDltA</i>	DltA aus <i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>SpDltC</i>	DltC aus <i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>SpDltD_{tr}</i>	gekürztes DltD aus <i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>SpyDltA</i>	DltA aus <i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>tag</i>	<i>teichoic acid glycerol-Operon</i>
<i>tar</i>	<i>teichoic acid ribitol-Operon</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)-phosphin
WTA	Wandteichonsäure (<i>wallteichoic acid</i>)

Zusätzlich werden die üblichen Buchstabencodes für Aminosäuren und Nucleinsäuren sowie die Abkürzung nach IUPAC verwendet. Englische Begriffe sowie die Bakterienstämme sind kursiv gedruckt.

1 Einleitung

Eine Vielzahl schwerwiegender bakterieller Erkrankungen erfordert eine Behandlung mit Antibiotika. Zu diesen Krankheiten gehören beispielsweise Milzbrand, Endokarditis sowie Sepsis, die unter anderem durch *Bacillus anthracis* und *Staphylococcus aureus* ausgelöst werden [Tong *et al.*, 2015; Pilo und Frey, 2018]. Nach der Entdeckung des Penicillins durch Sir Alexander Fleming im Jahr 1928 wurden viele Neu- und Weiterentwicklungen auf den Markt gebracht [Coates *et al.*, 2011]. In den letzten Jahrzehnten konnten jedoch nur wenige neue Substanzen in klinischen Studien überzeugen [Wright, 2012; Bassetti *et al.*, 2013]. Zusammen mit der verstärkten Entwicklung von Resistenzen, teilweise aufgrund nicht vollständig durchgeführter Therapien, besteht mittlerweile eine größer werdende Dringlichkeit, neue Antibiotika zu entwickeln [Duin und Paterson, 2016; McGann *et al.*, 2016; Wijesekara *et al.*, 2017]. Auch gegenüber *Streptococcus pneumoniae*, einem diploiden, gram-positiven, humanpathogenen Bakterium, ist die Standardtherapie mit Antibiotika aufgrund von resistenten Stämmen gefährdet [Reinert, 2009; Caballero und Rello, 2011]. Dieses Bakterium kann vor allem bei immungeschwächten Personen, Kleinkindern und Älteren schwerwiegende, teilweise tödlich verlaufende Erkrankungen wie Meningitis, Lungenentzündung und Sepsis hervorrufen [O'Brien *et al.*, 2009; Bogaert *et al.*, 2004; Keller *et al.*, 2016].

Bei der Suche nach neuen pharmazeutisch relevanten Zielstrukturen konnte unter anderem die D-Alanylierung der Teichonsäuren, einem Bestandteil der Zellmembran gram-positiver Bakterien, als mögliche Zielstruktur gefunden werden [Bertsche *et al.*, 2013]. Die für diese Modifikation notwendigen Proteine werden als Dlt-Proteine bezeichnet (*D-alanylation of lipoteichoic acids*) [Heaton und Neuhaus, 1992] und konnten bisher zum Teil strukturell und funktionell aufgeklärt werden [Yonus *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2008; Zimmermann *et al.*, 2015; Pfennig, 2015]. Genauere Kenntnisse des Reaktionsmechanismus sowie der Strukturen der beteiligten Proteine können bei der Entwicklung neuer Pharmazeutika von Nutzen sein. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit neue strukturelle und funktionelle Erkenntnisse zu den Dlt-Proteinen gewonnen werden.

1.1 Bakterielle Zellwände und Teichonsäuren

Die Einteilung von Bakterien erfolgt oft aufgrund ihres Verhaltens in der Gram-Färbung. Nachdem die Bakterien mit Kristallviolett und Iod-Kaliumiodid-Lösung gefärbt wurden, erfolgt ein Entfärbeschritt mit Ethanol. Je nach Aufbau der Zellwand bleiben einige Bakterienarten gefärbt (gram-positive), während andere

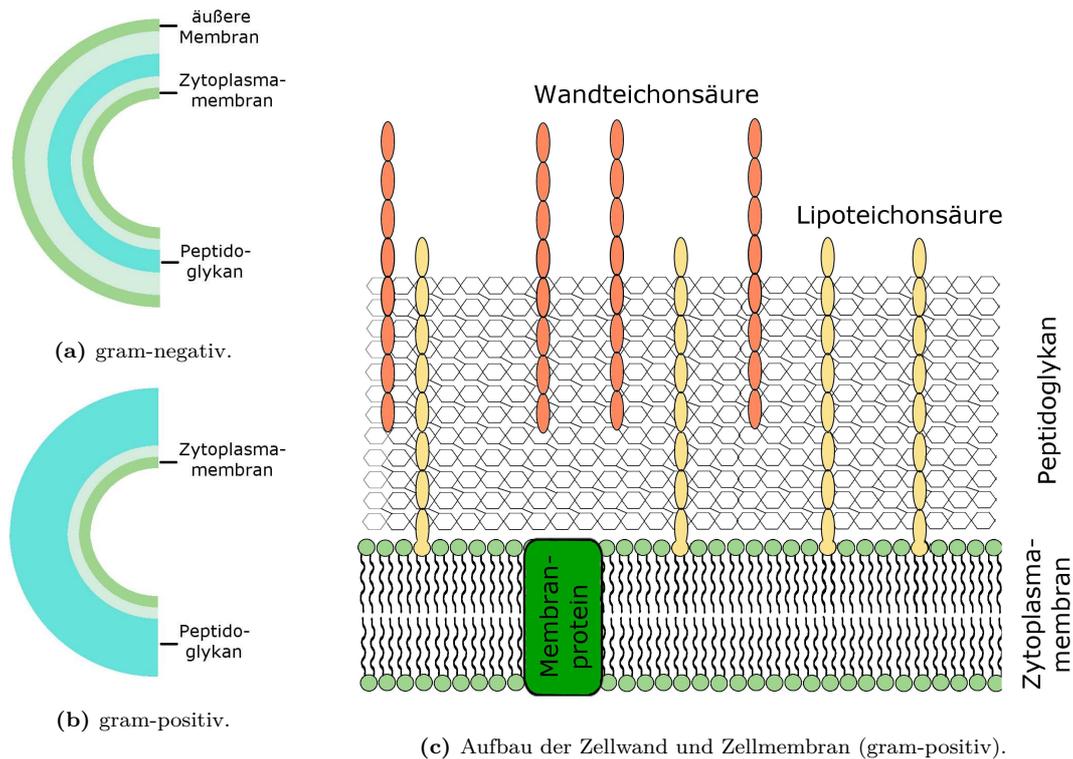


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Zellwand und Zellmembran von Bakterien. (a) Schematischer Aufbau der gram-negativen Zellwand. (b) Schematischer Aufbau der gram-positiven Zellwand. (c) Detaillierterer Aufbau der gram-positiven Zellwand. Das Zytosol wird durch die Zytoplasmamembran und die aufgelagerte Peptidoglykanschicht, bestehend aus N-Acetylglucosamin- und N-Acetylmuraminsäureeinheiten, von der Außenwelt abgeschirmt. Teichonsäuren, anionische Polymere, die sich aufgrund ihrer Lokalisation in Lipoteichonsäuren und Wandteichonsäuren einordnen lassen, sind in die Peptidoglykanschicht eingelagert. (Abbildung angelehnt an Brown *et al.* [Brown *et al.*, 2015]).

wieder entfärbt werden (gram-negative) [Coico, 2006]. Das unterschiedliche Verhalten lässt sich durch den Aufbau der Zellwand erklären, die in beiden Untergruppen eine Abgrenzung gegenüber der Umwelt darstellt. In gram-negativen Bakterien ist eine einschichtige Peptidoglykanschicht sowie eine zweite Lipidmembran auf die Zytoplasmamembran aufgelagert (Abb. 1.1(a)) [Brown *et al.*, 2015]. Anstelle der zweiten Lipidmembran ist in gram-positiven Bakterien die Peptidoglykanschicht dicker und komplexer aufgebaut und kann durch ein Tetrapeptid (L-Alanin, D-Isoglutamin, L-Lysin, D-Alanin) direkt oder über eine poly-Glycin-Brücke quervernetzt werden [Scheffers und Pinho, 2005; Vollmer *et al.*, 2008; Radkov *et al.*, 2018]. Sie bilden dadurch eine zellmembranumlaufende Schicht mit mehreren quervernetzten Lagen [Beeby *et al.*, 2013] (Abb. 1.1(b) und Abb. 1.1(c)).

Bereits im Jahr 1958 konnten Polymere mit einem hohen Ribitolphosphat-Anteil als weiterer Bestandteil der Zellwand gram-positiver Bakterien nachgewiesen werden [Armstrong *et al.*, 1958]. Sie wurden als Teichonsäuren bezeichnet. Mittlerweile umfasst dieser Begriff Polymere der Zellwand, die sich durch Polyole mit Phosphodiesterbindungen sowie teilweise auch Zuckerresten und D-Alaninen auszeichnen

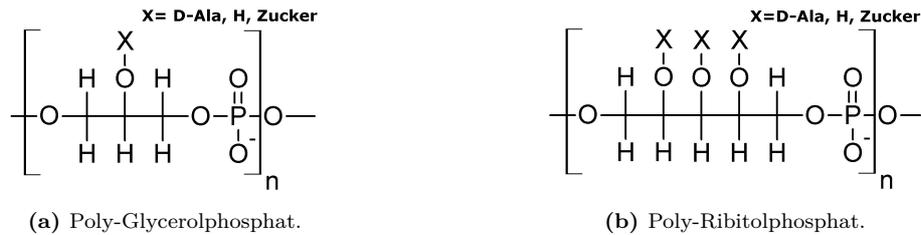


Abb. 1.2: Strukturen von Teichonsäuren. (a) Poly-Glycerolphosphat-Teichonsäuren wie sie z. B. in *Bacillus subtilis* 168 in der LTA und WTA vorkommen. (b) Poly-Ribitolphosphat-Teichonsäuren wie sie z. B. in *B. subtilis* W23 in der WTA vorkommen.

[Baddiley, 1970; Ward, 1981; Brown *et al.*, 2013]. Eingebettet in die Peptidoglykanschicht tragen sie zum Schutz des Bakteriums gegen die Außenwelt bei [Neuhaus und Baddiley, 2003]. Die einfachsten Formen der Teichonsäure bestehen, je nach Organismus, aus poly-Glycerolphosphat- oder poly-Ribitolphosphat-Einheiten (Abb. 1.2). Teichonsäuren lassen sich in zwei Untergruppen, die Wandteichonsäuren (WTA) und die Lipoteichonsäuren (LTA), einteilen (Abb. 1.1(c)) [Brown *et al.*, 2013; Percy und Gründling, 2014]. Lipoteichonsäuren werden über einen Glykolipidanker in der Membran verankert [Duckworth *et al.*, 1975; Neuhaus und Baddiley, 2003] und bestehen bis auf wenige Ausnahmen (z. B. *S. pneumoniae*) aus Polyglycerolphosphat-Einheiten [Neuhaus und Baddiley, 2003; Fischer, 1997; Percy und Gründling, 2014]. Die Anzahl der Wiederholungseinheiten variiert stark (z. B. von 5 bis 50 in *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7468 [Pollack *et al.*, 1992]). Wandteichonsäuren sind hingegen über einen Saccharidlinker an die Peptidoglykanschicht gebunden [Kojima *et al.*, 1985; Araki und Ito, 1989] und weisen eine höhere Diversität im Aufbau auf [Brown *et al.*, 2013]. So unterscheiden sich z. B. die WTA-Struktur in *Bacillus* in den Unterarten *B. subtilis* 168 und *B. subtilis* W23 (Glycerolphosphat- bzw. Ribitolphosphateinheiten) [Iwasaki *et al.*, 1986].

In *S. pneumoniae* gibt es deutliche Unterschiede zu den eben gezeigten Charakteristika. Die Wiederholungseinheit enthält sowohl in den LTAs als auch in den WTAs 2-Acetamido-4-amino-2,4,6-trideoxygalactose (AATGal), Glucose (Glc), Ribitolphosphat (Rib-P) und zwei N-Acetylgalactosamine (GalNAc) (Abb. 1.3). Auffällig ist, neben der ungewöhnlichen Aminoglucose, die Veresterung der N-Acetylgalactosamine mit Phosphorylcholin [Fischer, 1997; Seo *et al.*, 2008]. *S. pneumoniae* ist von exogenem Cholin abhängig und das Ersetzen des Phosphorylcholins durch Aminoalkohole führt zum Verlust der Zellteilung und Autolyse [Badger, 1944; Tomasz, 1968].

Die Biosynthese von LTA und WTA ist nur teilweise aufgeklärt und wird durch Proteine katalysiert, die in den sogenannten *tar*- bzw. *tag*-Operons codiert werden [Swoboda *et al.*, 2010]. Aufgrund der unterschiedlichen Stereochemie der Vorläufer der Teichonsäuren wird davon ausgegangen, dass die Substrate für den Aufbau der Glycerol-LTAs und Glycerol-WTAs aus unterschiedlichen Quellen stammen. Die

Mit den zahlreichen Phosphatgruppen im Polymer bilden die Teichonsäuren zusammen mit dem Peptidoglykan eine anionische Matrix und tragen mit dazu bei, dass z. B. Magnesiumionen für Enzyme in dieser Matrix gebunden werden [Neuhaus und Baddiley, 2003; Heptinstall *et al.*, 1970; Hughes *et al.*, 1971]. Daneben sind sie in die Bildung von Biofilmen [Vergara-Irigaray *et al.*, 2008] sowie in die Bindung an die Wirtszellen und an artifizielle Oberflächen involviert [Weidenmaier *et al.*, 2004; Gross *et al.*, 2001; Xia *et al.*, 2010]. Bakterien mit Mutationen in der WTA- oder LTA-Synthese sind temperatursensitiv und zeigen teilweise Wachstumsdefizite und Morphologieabweichungen. Ohne die Synthese von Teichonsäuren sind Bakterien nicht überlebensfähig [D'Elia *et al.*, 2006; Oku *et al.*, 2008; Schirner *et al.*, 2009]. Die Hydroxylgruppen der Glycerol- bzw. Ribitoleinheiten können durch Zuckermoleküle sowie D-Alanin modifiziert werden, wobei die Glykosylierung wenig untersucht ist [Winstel *et al.*, 2014]. Bisherige Versuche in *S. aureus* zeigen jedoch, dass durch die Glykosylierung eine höhere Resistenz gegenüber β -Lactamantibiotika [Brown *et al.*, 2012] und erhöhte Phagenadsorption gegeben ist [Chatterjee, 1969; Park *et al.*, 1974]. Wesentlich besser charakterisiert ist die D-Alanylierung von Teichonsäuren, die durch die Dlt-Proteine katalysiert wird.

1.2 D-Alanylierung von Teichonsäuren

Dringen Bakterien in einen Wirt ein, so kann dieser über das angeborene Immunsystem CAMPs (*cationic antimicrobial peptides*) entsenden, die mit den negativ geladenen Teichonsäuren interagieren [Hancock und Diamond, 2000]. Die Modifikation der Teichonsäure mit D-Alanin durch das Bakterium bringt eine positive Ladung in das negativ geladene Polymer der Teichonsäure ein. Somit wird die negative Gesamtladung der Teichonsäuren reduziert und Kationen der Umgebung interagieren weniger stark mit den Teichonsäuren. Neben der Änderung der Ladung hat die Modifikation einen Einfluss auf die Konformation der LTAs und resultiert in einer geringeren Permeabilität der Zellwand [Saar-Dover *et al.*, 2012]. Daneben spielt die D-Alanylierung eine wichtige Rolle in der Regulation der Kationenhomöostase [Archibald *et al.*, 1973], der Autolyse [Velez *et al.*, 2007; Steen *et al.*, 2004], der Adhäsion und Invasion von Wirtszellen [Abachin *et al.*, 2002; Kristian *et al.*, 2005] sowie der Biofilmproduktion [Fabretti *et al.*, 2006].

Im Jahr 1995 wurde für *Bacillus subtilis* gezeigt, dass die Proteine, die für die D-Alanylierung zuständig sind, im *dlt*-Operon (*D-alanylation of lipo teichoic acid*) codiert sind [Perego *et al.*, 1995]. Die Existenz eines solchen Operons konnte sukzessiv für andere gram-positive Bakterien wie z. B. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* und *Streptococcus pneumoniae* nachgewiesen werden. Im Operon sind codierende Sequenzen für vier bis fünf Proteine vorhanden, von denen nur vier als essentiell



Abb. 1.4: Schematische Darstellung des *dlt*-Operons. Angegeben ist jeweils die Anzahl an Aminosäuren in dem zugehörigen Protein, sowie die Größe des Proteins in *S. pneumoniae*. (AS = Aminosäuren, kDa = Kilodalton)

gelten [Perego *et al.*, 1995; Peschel *et al.*, 1999; Khattar *et al.*, 2009; Kristian *et al.*, 2005; Kovacs *et al.*, 2006]. Diese vier Proteine werden als DltA, DltB, DltC und DltD bezeichnet (Abb. 1.4). Die Proteine aus *S. pneumoniae* werden im Folgenden mit *SpDltA*, *SpDltB*, *SpDltC* und *SpDltD* abgekürzt. Im Gegensatz zu den teilweise voneinander unabhängigen Wegen für die Synthese von LTA und WTA erfolgt die Modifikation der Teichonsäure mittels der erwähnten Proteine an der Lipoteichonsäure. Für die Übertragung von D-Alanin von der Lipoteichonsäure auf die Wandteichonsäure konnte bisher kein Enzym nachgewiesen werden. Möglicherweise erfolgt dies enzymunabhängig mit LTA als Substrat [Haas *et al.*, 1984; Childs *et al.*, 1985; Brown *et al.*, 2013]. Insbesondere die Untersuchungsergebnisse, dass in Stämmen ohne LTA nur geringste Anteile an D-Alanin in WTAs nachgewiesen werden konnten [Reichmann *et al.*, 2013] und die Anzahl an D-Alanin in WTAs geringer als in LTAs ist, weisen in diese Richtung [Fischer, 1994].

1.2.1 DltA

DltA ist ein cytosolisches Protein von circa 57 kDa [Heaton und Neuhaus, 1992; Reichmann *et al.*, 2013] und in die ersten Schritte der D-Alanylierung von Teichonsäuren involviert. Das Enzym wird der Gruppe der adenylylatbildenden Enzyme zugeordnet, zu denen z. B. die Adenylierungsdomänen von NRPS (*non ribosomal peptide synthetases*) gehören. Diese multifunktionalen Enzyme katalysieren die Synthese von Peptiden, die teilweise pharmazeutisch genutzt werden (z. B. das Antibiotikum Daptomycin oder das Immunosuppressivum Cyclosporin) [Marahiel, 1992; Strieker *et al.*, 2010]. Des Weiteren gehören zu dieser Enzymgruppe Acyl- und Aryl-CoA-Synthetasen und Luciferasen aus Leuchtkäfern [Conti *et al.*, 1996; Du *et al.*, 2008]. Einige dieser Proteine sind strukturell sowie funktionell aufgeklärt. Sie katalysieren in einem ersten Schritt die Aktivierung einer Aminosäure oder Fettsäure mit ATP und weisen untereinander eine ähnliche Tertiärstruktur auf [Heaton und Neuhaus, 1992; Marahiel *et al.*, 1997]. DltA katalysiert im Cytosol die Reaktion von D-Alanin mit ATP zu D-Alaninadenylat unter Freisetzung von Pyrophosphat (Abb. 1.5). Nach der Synthese des D-Alaninadenylats bilden DltA und DltC einen

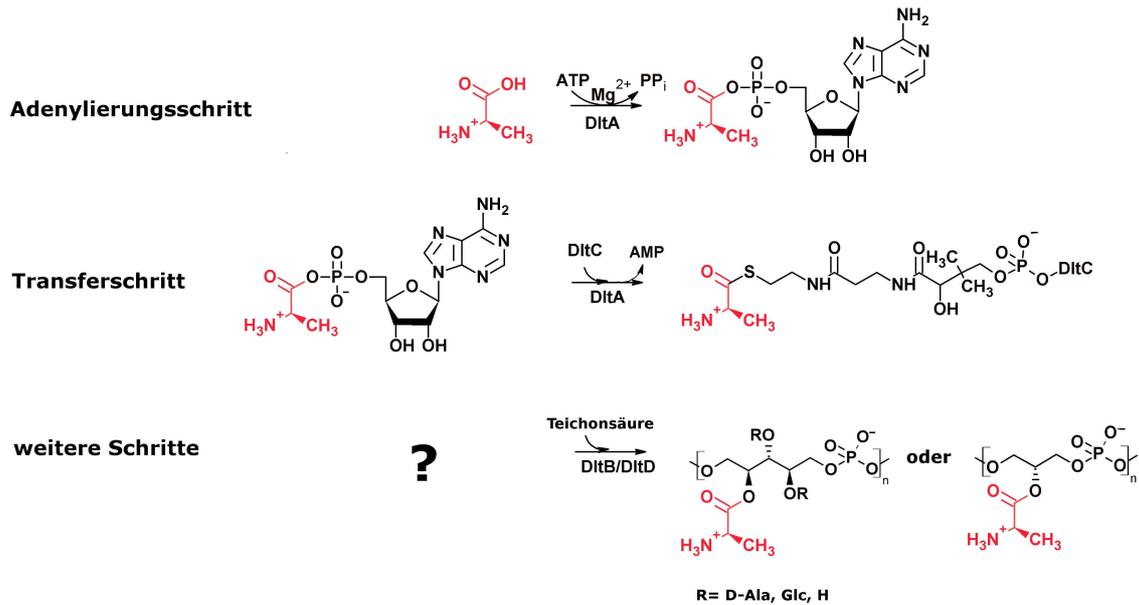


Abb. 1.5: Mechanismus der Modifizierung von Teichonsäure mit D-Alanin. DltA kondensiert D-Alanin und ATP zum D-Alaninadenylat und überträgt danach D-Alanin auf 4'-Phosphopantethein von DltC. Die nachfolgenden Schritte sind nicht geklärt, wahrscheinlich werden sie durch DltB und DltD katalysiert. Das Endprodukt dieser Reaktionen sind Teichonsäuren mit D-Alaninmodifikationen an den Hydroxylgruppen. Im Fall der Teichonsäuren mit Ribitolphosphat ist noch nicht abschließend geklärt, welche der drei möglichen Positionen modifiziert werden.

Komplex, der die Übertragung von D-Alanin auf das an DltC gebundene 4'-Phosphopantethein ermöglicht [Heaton und Neuhaus, 1992, 1994; Du *et al.*, 2008; Yonus *et al.*, 2008].

Bisher wurden die DltA-Strukturen aus *B. subtilis*, *S. pyogenes* und *B. cereus* aufgeklärt (pdb-Codes: *B. subtilis* 3e7w (Abb. 1.6), 3e7x; *S. pyogenes* 3l8c, 3lgx; *B. cereus* 3fce, 4pzp, 3fcc, 3dhv) [Yonus *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2008; Osman *et al.*, 2009; Du und Luo, 2014]. DltA lässt sich in eine große Domäne (circa 400 Aminosäuren), eine *linker*-Region (vier Aminosäuren) und eine kleine Domäne (circa 100 Aminosäuren) einteilen. Die große Domäne besteht hierbei aus drei Subdomänen. Subdomänen A und B bilden jeweils ein zentrales β -Faltblatt mit umgebenden α -Helices, während Subdomäne C ein verzerrtes β -Fass aufweist. Die kleine Domäne entspricht einer α - β -gemischten Struktur [Conti *et al.*, 1996; Yonus *et al.*, 2008]. Die Bindung von ATP sowie die Reaktion mit D-Alanin erfolgen im Bereich zwischen der kleinen und der großen Domäne (Abb. 1.6). Vergleiche bisheriger Strukturen adenylylatbildender Enzyme ergaben im Jahr 2008 ein Modell zu den strukturellen Änderungen von DltA während der Reaktion (Abb. 1.7) [Yonus *et al.*, 2008]. Hierbei sollen sich drei Hauptkonformationen unterscheiden lassen, die sich unter anderem durch unterschiedliche Positionen der kleinen zur großen Domäne auszeichnen.

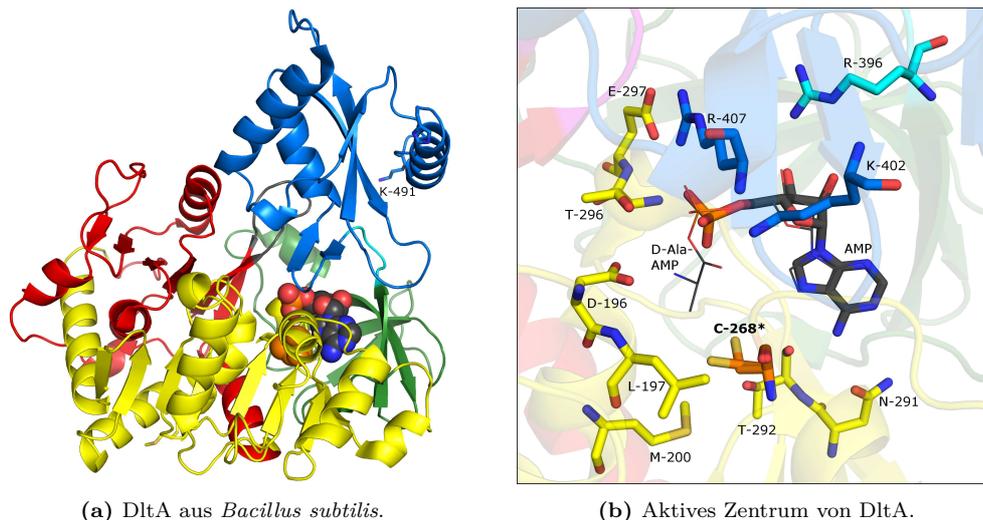


Abb. 1.6: Schematische Darstellung von *BsDltA*. (a) Gezeigt ist die Übersicht über die Struktur von DltA aus *B. subtilis* (pdb-Code 3e7w) angelehnt an Yonus *et al.* [Yonus *et al.*, 2008]. Die Unterdomänen der großen Domäne sind in rot, gelb und grün (A, B, C) hervorgehoben während die kleine Domäne blau gefärbt ist. Wichtig für die Funktion sind die *linker*-Region (cyan), der *p-loop* (grau), Cystein-268 (orange, Kugeldarstellung), Lysin-491 (blau, *sticks*) und AMP (Kugeldarstellung). (b) Im aktiven Zentrum von DltA befinden sich verschiedene Aminosäuren, die z. B. das ATP bzw. das D-Alaninadenylat binden. Für die Substratspezifität ist Cystein-268 zuständig. Die feinen Linien zeigen das D-Alaninadenylat aus der Struktur von *B. cereus* DltA (pdb-Code 3dhv). * Cystein-268 konnte in der angegebenen Kristallstruktur in zwei Konformationen gefunden werden. Beide sind hier in dieser Abbildung gezeigt.

Vor der Bindung von ATP und D-Alanin ist die kleine Domäne von der großen Domäne abgewandt und kann aufgrund weniger Wechselwirkungen mit der großen Domäne verschiedene Orientierungen einnehmen. Diese Hypothese beruht auf der offenen Konformation von Luciferase aus Leuchtkäfern (pdb-Code 1ba3) [Conti *et al.*, 1996; Franks *et al.*, 1998; Yonus *et al.*, 2008]. Bisherige Versuche, DltA ohne Liganden zu kristallisieren, schlugen fehl (nicht publizierte Daten der Arbeitsgruppe) oder zeigten eine Adenylierungskonformation auf [Du und Luo, 2014]. Die Struktur von DltA aus *S. pyogenes* (pdb-Code 3l8c), die ohne Ligand gemessen wurde, ist Teil eines *structural genomics*-Projekts. Die Struktur ist zwar gelöst und in der Datenbank zugänglich, jedoch wurde die Konformation sowie Besonderheiten dieser Struktur bisher nicht analysiert. Daher erfolgt die Betrachtung der Struktur als Teil der Diskussion dieser Arbeit.

Nach der Bindung von D-Alanin und ATP erfolgt eine Annäherung der kleinen Domäne an die große Domäne zur Abschirmung der Substratbindetasche. Für DltA aus *B. cereus* konnte eine (post)-Adenylierungskonformation mit D-Alaninadenylat im aktiven Zentrum gezeigt werden (pdb-Code 3dhv) [Du *et al.*, 2008].

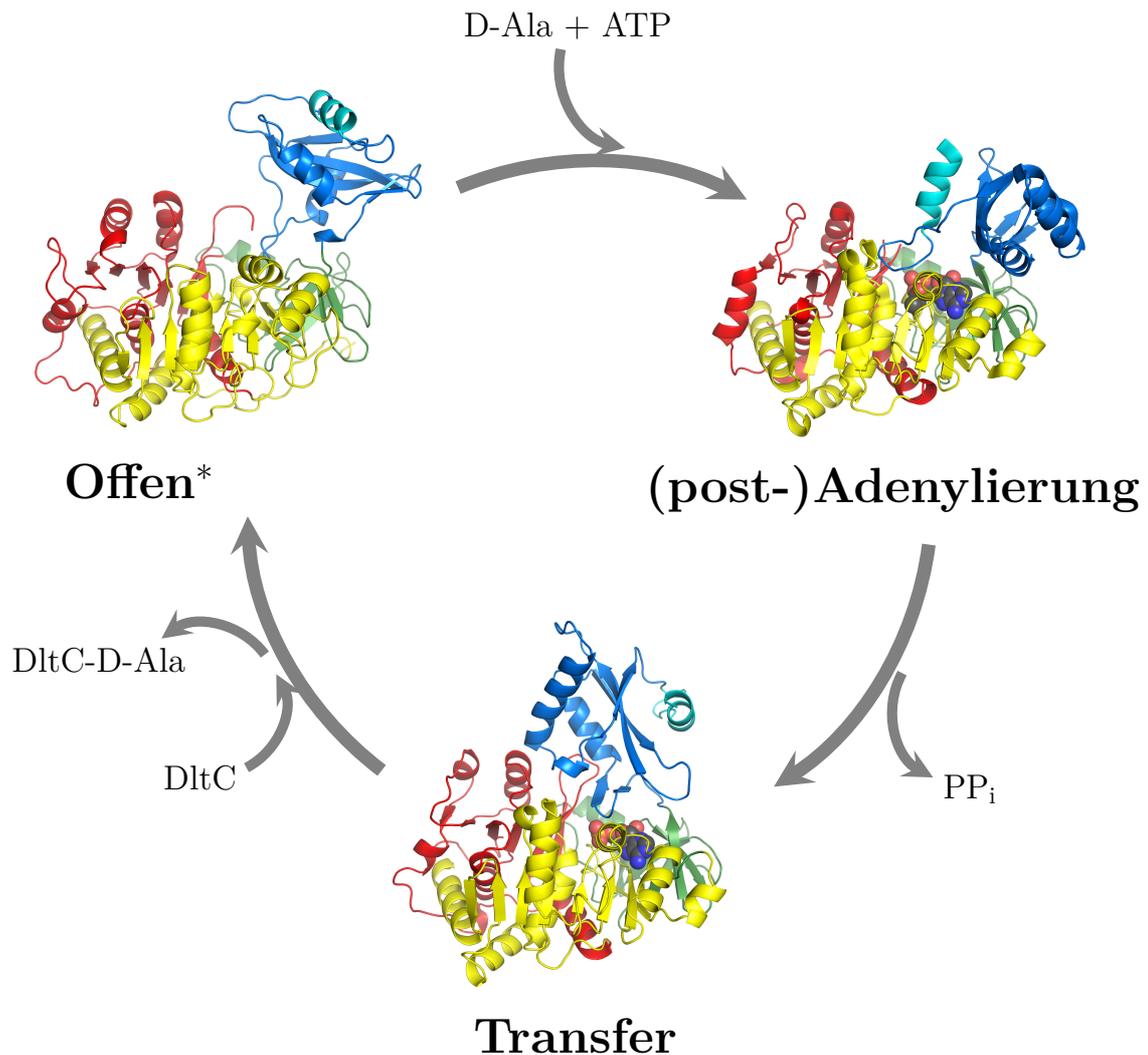


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der nachgewiesenen und hypothetischen Konformationen von DltA. Die große Domäne ist in gelb, rot und grün, die kleine Domäne in blau dargestellt. *Die offene Konformation wird auf Grundlage der Struktur von Luciferase des Leuchtkäfers (pdb-Code 1ba3 [Franks *et al.*, 1998]) gezeigt. Die Adenylierungskonformation basiert auf der Struktur von *BcDltA* (pdb-Code 3dhv [Du *et al.*, 2008]), während der Transferzustand für *BsDltA* gezeigt ist [Pfennig, 2015]. Der Übergang zwischen den verschiedenen Konformationen beruht wahrscheinlich auf Änderung der Elektrostatik aufgrund von Substratbindung und Produktbildung (nach Yonus *et al.* [Yonus *et al.*, 2008] und Pfennig [Pfennig, 2015]). Zur besseren Beurteilung der Domänenwanderung wurde die C-terminale Helix der kleinen Domäne in cyan markiert.

Im Anschluss an die Freisetzung des Pyrophosphates aus dem aktiven Zentrum führen Domänenwanderungen und -drehungen zu der Transferkonformation. In dieser Orientierung kann D-Alanin auf die prosthetische Gruppe von DltC übertragen werden. Die Co-Kristallisation von DltC und DltA aus *B. subtilis* zeigt neben der Domänenorientierung eine Zugangsmöglichkeit für das 4'-Phosphopantethein von DltC zum aktiven Zentrum [Yonus *et al.*, 2008; Zimmermann, 2011; Pfennig, 2015].

Für die Funktion von DltA sind verschiedene Strukturelemente von Bedeutung. Hierzu zählen der *phosphate-binding loop* (*p-loop*), die *linker*-Region (insbesondere Arginin-396), Lysin-402 und Lysin-491 der kleinen Domäne sowie Cystein-268, welches zur Stereospezifität des Enzyms beiträgt (Abbildung 1.6). Die Nummerierungen beziehen sich hierbei auf DltA aus *B. subtilis* (*BsDltA*).

Der Bereich von Threonin-151 bis Lysin-159 (*B. subtilis*) wird aufgrund seiner Ähnlichkeit zu dem Walker-A-Motiv bzw. *phosphate-binding loop* auch in adenylyatbildenden Enzymen, wie DltA, als *p-loop* bezeichnet. Dieser interagiert mit dem β - und dem γ -Phosphat des ATPs [Yonus *et al.*, 2008; Du und Luo, 2014; Saraste *et al.*, 1990; Walker *et al.*, 1982]. Ebenso wie in anderen adenylyatbildenden Enzymen (z. B. PheA aus *Bacillus brevis* [Conti *et al.*, 1997]) ist dieser *p-loop* in bisher bekannten Strukturen von DltA nicht immer strukturiert. In den beiden Strukturen von DltA aus *B. subtilis* (pdb-Codes 3e7w, 3e7x), die in der Transferkonformation kristallisierten, ist er jedoch sichtbar und interagiert mit der kleinen Domäne.

Vier weiteren Aminosäuren, eine aus der großen Domäne, zwei aus der kleinen Domäne und eine aus der *linker*-Region sind für die Reaktion bzw. die Enzymspezifität wichtig. Die *linker*-Region ist an der Domänenwanderung beteiligt und insbesondere Arginin-396 (*BsDltA*) wird eine Rolle in der Konformationsänderung zugeschrieben. In der offenen Konformation der Leuchtkefer-Luciferase, einer zu DltA homologen Struktur, ist das äquivalente Arginin-437 vom aktiven Zentrum abgewandt und interagiert mit Glutamat-455 aus der kleinen Domäne (pdb-Code 1ba3) [Conti *et al.*, 1996; Yonus *et al.*, 2008]. In der (post)-Adenylierungskonformation sowie der Transferkonformation ist der Rest durch Wechselwirkungen mit Resten der großen Domäne dem aktiven Zentrum zugewandt. Des Weiteren sind für die Substratbindung und Produktbildung Lysin-402 und Lysin-491 aus der kleinen Domäne wichtig. Lysin-402 stabilisiert in der Transferkonformation die negative Ladung des Phosphatrestes [Pfennig, 2015]. Die Seitenkette von Lysin-491 ist in der offenen Konformation zum aktiven Zentrum gerichtet und nimmt nach ATP-Bindung eine Position in der Nähe der α - β -Anhydridbindung ein [Yonus *et al.*, 2008; Yonus, 2015; Pfennig, 2015]. Die Stereoselektivität von DltA erfolgt durch Cystein-268 (*B. subtilis*) und bewirkt, dass L-Alanin aufgrund sterischer Hinderung nicht umgesetzt werden kann. Dieses Cystein ist in vielen Spezies konserviert [Yonus *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2008], in Streptokokken befindet sich an der äquivalenten Position ein Aspartat (Aspartat-275 in *SpDltA*).

Lange blieb das Vorhandensein der D-Alanylierung in *S. pneumoniae* unentdeckt, da eine Punktmutation in DltA aus *S. pneumoniae* R6, einem häufig genutzten Laborstamm, eine Verkürzung sowie Veränderung der Proteinsequenz (*frame shift*-Mutation) bewirkt [Kovacs *et al.*, 2006]. Durch Untersuchungen weiterer Stämme (D39, TIGR4) sowie die Rückmutation in R6 konnte die Modifikation mit D-Alanin

jedoch auch in *S. pneumoniae* nachgewiesen werden [Draing *et al.*, 2006; Denapaité *et al.*, 2012; Gisch *et al.*, 2013].

Gegen DltA existiert bereits ein Inhibitor: 5'-O-[N-(D-alanyl)-sulfomoyl]-Adenosin ist ein Substratanalogon, das zu einer Erhöhung der Sensitivität gegenüber Vancomycin beiträgt [May *et al.*, 2005].

1.2.2 DltC

DltC ist, ebenso wie DltA, ein cytosolisches Protein mit einer Größe von circa 9 kDa. Das Protein enthält eine reaktive Thiolgruppe innerhalb des kovalent an Serin-35 (*SpDltC*) gebundenen Cofaktors 4'-Phosphopantethein. In der Zelle erfolgt die Beladung von DltC mit diesem Cofaktor mit Hilfe von 4'-Phosphopantethein-Transferasen [Lambalot *et al.*, 1996; Reuter, 1999; Zimmermann *et al.*, 2015].

DltC ist homolog zu den ACPs (*acyl carrier proteins*) und PCPs (*peptide carrier proteins*) und übernimmt D-Alanin von DltA. Hierbei überträgt DltA das D-Alanin kovalent auf die Thiolgruppe des 4'-Phosphopantetheins des DltCs [Heaton und Neuhaus, 1994; Debabov *et al.*, 1996; Volkman *et al.*, 2001; Crosby und Crump, 2012]. Diese Interaktion wurde bereits biochemisch und strukturell untersucht. Dabei konnten zwei verschiedene Komplexe von DltA und DltC, ein produktiver und ein alternativer Komplex, kristallisiert werden [Zimmermann *et al.*, 2015; Pfennig, 2015].

Die nachfolgenden Aufgaben von DltC sind nicht geklärt. In den bisherigen Modellen wird entweder davon ausgegangen, dass DltC an der Übertragung des D-Alanins auf eine Membrankomponente beteiligt ist [Perego *et al.*, 1995; Fischer, 1994] oder über die Zellwand transportiert wird und die Übertragung des D-Alanins an die LTA vornimmt [Neuhaus und Baddiley, 2003]. Auf beide Modelle wird später noch eingegangen (Abschnitt 1.3). Neue Untersuchungen von Ma *et al.* konnten in *pull-down*-Versuchen und Kristallisationsansätzen eine Interaktion von DltC mit DltB aufzeigen [Ma *et al.*, 2018].

1.2.3 DltB

DltB ist, ebenso wie die zuvor genannten Proteine, für die Modifikation der Teichonsäuren mit D-Alanin essentiell. Aufgrund von Strukturvoraussagen wurde davon ausgegangen, dass es sich um ein Membranprotein mit zehn bis zwölf membran-durchdringenden Helices handelt [Perego *et al.*, 1995; Neuhaus *et al.*, 1996]. Das circa 49 kDa große Protein wird funktionell den MBOAT-Proteinen (*membrane bound O-acetylation transferase*) zugeordnet, zu denen z. B. Acyl-Coenzyme A: Cholesterol Acyltransferase (ACAT), Diacylglycerol-O-Acyltransferase (DGAT) und AlgI (Acetylierung von Alginat) gehören. Diese Proteine übertragen organische Säuren auf Hydroxylgruppen und zeigen konservierte polare Reste in Membrannähe

[Hofmann, 2000]. Die Aufgabe von DltB könnte in der Übertragung des D-Alanins auf eine Membrankomponente und dessen Transfer [Perego *et al.*, 1995] oder dem Transport von DltC aus dem Cytoplasma bestehen [Neuhaus und Baddiley, 2003]. Bisher konnte nur gezeigt werden, dass die Synthese von D-Alanin-LTA amphomycin-sensitiv ist, was auf einen Na⁺-Transporter innerhalb der Reaktion hinweist [Heaton und Neuhaus, 1994].

In einer Ende 2018 veröffentlichten Studie von Ma *et al.* konnte die Kristallstruktur von DltB im Komplex mit DltC gezeigt werden. DltB besitzt elf Transmembranhelices und bildet im extrazellulären Teil einen Trichter, der bis zur Mitte der Membran reicht. An dessen Ende sitzt ein konservierter Histidin-Rest (Histidin-336 in DltB aus *Streptococcus thermophilus*). Zur intrazellulären Seite ragt ein Tunnel, der mit konservierten Resten ausgekleidet ist. Möglicherweise gelangt D-Alanin-4'-Phosphopantethein des DltCs in diesen Tunnel und Histidin-336 übernimmt eine katalytische Rolle. Aufgrund fehlender Dichte für 4'-Phosphopantethein in der Kristallstruktur konnte diese Hypothese bisher nicht strukturell belegt werden [Ma *et al.*, 2018].

1.2.4 DltD

Die Aufgabe von DltD in der Reaktionsfolge zur Modifikation von Teichonsäuren mit D-Alanin ist bisher nicht geklärt. Durch die Analyse eines DltD-defizienten *B. subtilis* Stammes konnte jedoch gezeigt werden, dass dieses circa 49 kDa umfassende Protein für die D-Alanylierung essentiell ist [Perego *et al.*, 1995]. Sequenzuntersuchungen lassen einen N-terminalen hydrophoben Bereich erkennen, der wahrscheinlich einen helikalen Membrananker ausbildet [Perego *et al.*, 1995]. Da die Funktion sowie die Orientierung von DltD in der Zelle nicht bekannt sind, entwickelten sich zwei konträre Modelle bezüglich der Funktion von DltD (Abschnitt 1.3).

Frühere Untersuchungen an DltD zeigten eine Thioesteraseaktivität gegenüber D-Alanin-ACP [Debabov *et al.*, 2000]. ACPs (Acylcarrierproteine) sind Bestandteil der Fettsäuresynthese und zeigen Homologien zu DltC auf. Sie können, ebenso wie DltC von DltA mit D-Alanin beladen werden [Heaton und Neuhaus, 1994; Neuhaus *et al.*, 1996]. Da D-Alanin-ACP jedoch nicht als Substrat für die Synthese von D-alanylierten Lipoteichonsäuren genutzt werden kann, stellt D-Alanin-ACP ein unerwünschtes Nebenprodukt dar [Volkman *et al.*, 2001]. Eine Thioesteraseaktivität von DltD könnte dieser Fehlreaktion entgegenwirken und wäre im Falle einer cytosolischen Lokalisation von DltD möglich [Debabov *et al.*, 1996, 2000]. Neuere Untersuchungen gehen jedoch von einer Position von DltD auf der Außenseite der Membran aus [Reichmann *et al.*, 2013] (Abschnitt 1.3).

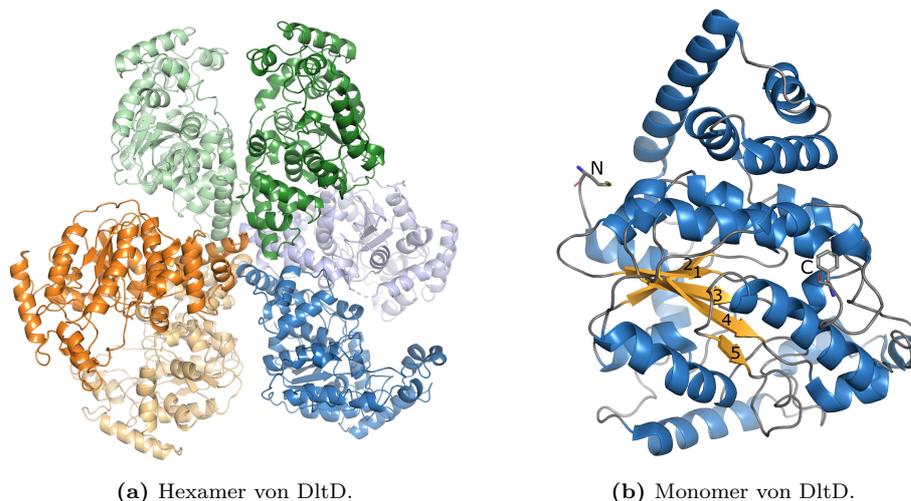


Abb. 1.8: Cartoon-Darstellung von DltD. Die Struktur beruht auf der hinterlegten Struktur mit dem pdb-Code 3bma. (a) Hexamer von DltD wie es in der Elementarzelle vorkommt. Die drei Dimere sind in grün, blau und orange dargestellt. Jeweils eines der Monomere bildet mit zwei anderen ein Trimer mit deutlich geringerer Interaktionsfläche aus. (b) Ein Monomer von DltD mit dem zentralen fünfsträngigen β -Faltblatt und umgebenden α -Helices.

Im Jahr 2008 konnte im Rahmen eines *structural genomics*-Projektes die Struktur eines N-terminal gekürzten DltDs aus *S. pneumoniae* bestimmt werden (Abb. 1.8). In der hinterlegten Struktur wird die biologische Einheit als Hexamer angegeben. Ob das Protein als Hexamer gereinigt wurde oder diese Einteilung auf anderen Versuchen beruht, kann nicht festgestellt werden, da lediglich die Sequenz und die Kristallisationsbedingung, nicht aber die weiteren Experimente hinterlegt sind. DltD besteht aus einem zentralen β -Faltblatt aus fünf parallelen β -Strängen, das von α -Helices umgeben wird, so dass sich eine $\alpha/\beta/\alpha$ -Topologie ergibt. Die nähere Untersuchung der β -Stränge lässt eine Anordnung in der Reihenfolge 21345 erkennen. Dieses Faltungsmuster wird als Flavodoxin-ähnlich bezeichnet und ist auch in der von Upton *et al.* im Jahr 1995 beschriebenen Klasse von Hydrolasen aufzufinden [Upton und Buckley, 1995]. Charakteristisch für diese als SGNH-Hydrolasen bezeichneten Enzyme ist zudem die Präsenz der namensgebenden Reste Serin (S), Glycin(G), Asparagin (N) und Histidin (H) im aktiven Zentrum [Upton und Buckley, 1995]. Dabei bilden die namensgebenden Serin- und Histidinreste zusammen mit einem Aspartat oder Glutamat eine katalytische Triade. Eine solche katalytische Triade ist auch z. B. in α/β -Hydrolasen, die ähnliche Reaktionen katalysieren, vorhanden [Ollis *et al.*, 1992]. Jedoch weisen beide Klassen deutliche Unterschiede auf. Im Gegensatz zu den α/β -Hydrolasen ist das katalytische Serin in SGNH-Hydrolasen nicht in einer engen Schleife, sondern einem weitläufigeren *loop* am N-Terminus des Proteins organisiert. Die zwei weiteren Reste der Triade werden durch zwei Reste voneinander separiert [Upton und Buckley, 1995; Lo *et al.*, 2003; Mølgaard *et al.*, 2000; Brzuszkiewicz *et al.*, 2009]. Die Reste Glycin und Asparagin werden als Teil

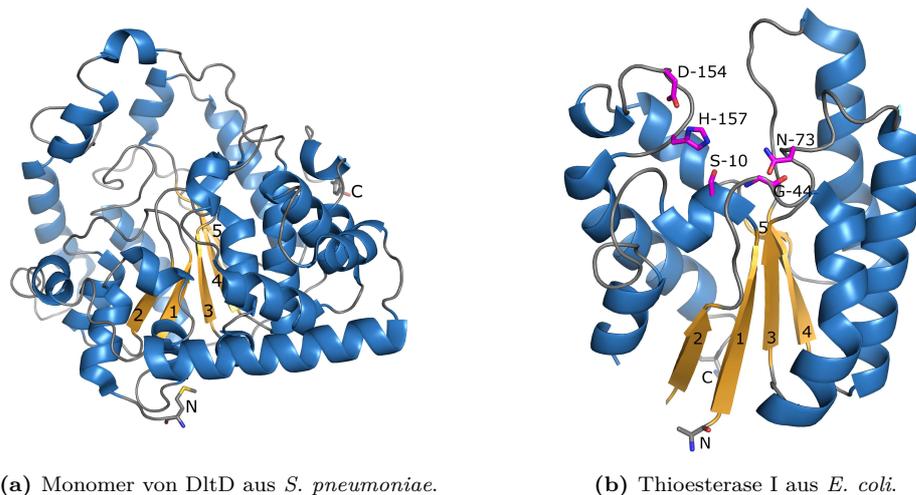
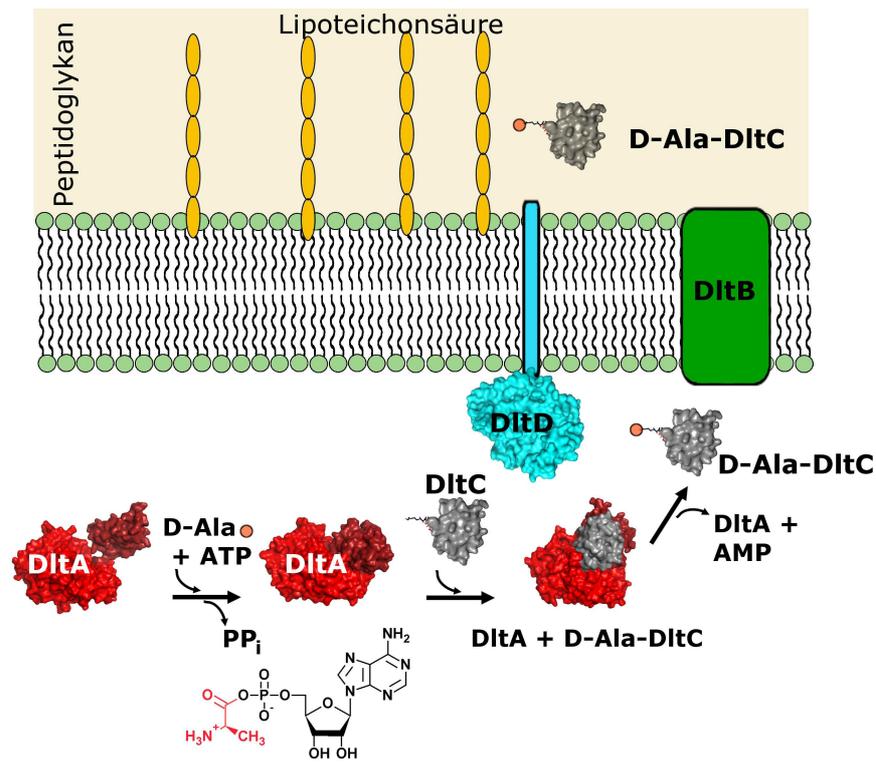
(a) Monomer von DltD aus *S. pneumoniae*.(b) Thioesterase I aus *E. coli*.

Abb. 1.9: Cartoon-Darstellung von DltD und Thioesterase I. Beide Proteine zeigen ein Flavodoxin-ähnliches Faltungsmuster auf. (a) Monomer von DltD aus *S. pneumoniae*. (b) Thioesterase I aus *E. coli* als Beispiel einer typische SGNH-Hydrolase (pdb-Code 1jrl) [Lo *et al.*, 2003]. Zur katalytischen Triade gehören Serin-10, Aspartat-154 und Histidin-157, während das *oxyanion hole* unter anderem von den Resten Serin-10, Glycin-44 und Asparagin-73 gebildet wird.

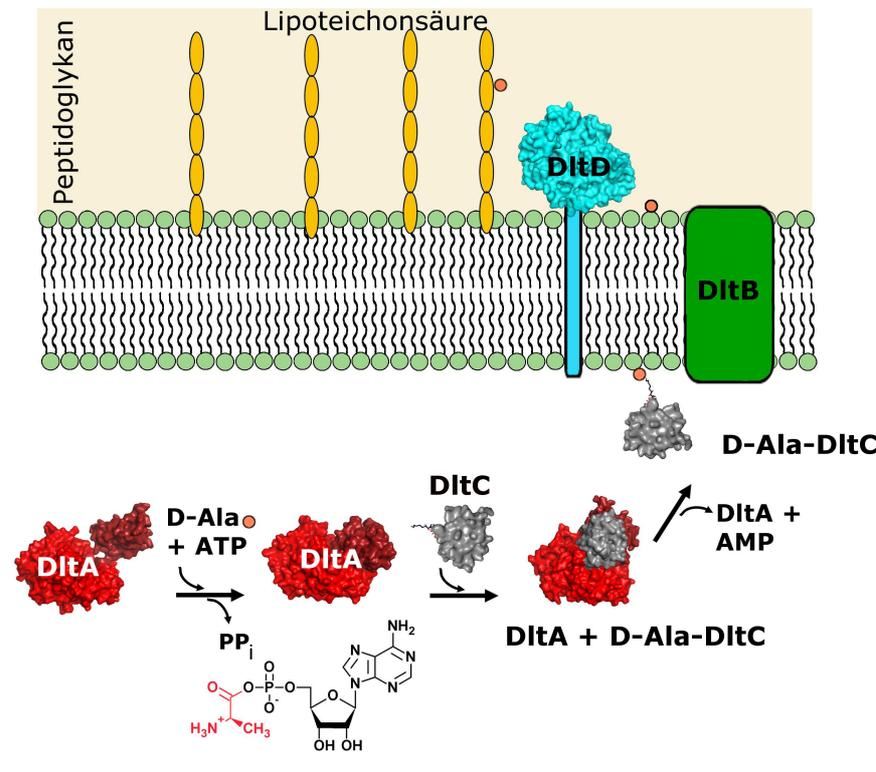
des *oxyanion hole* für die Stabilisierung des gebildeten Anions benötigt [Upton und Buckley, 1995]. Vertreter der SGNH-Hydrolasen sind unter anderem Thioesterase I aus *E. coli* (TAP, auch Protease I oder Lysophospholipase L₁ genannt) [Lo *et al.*, 2003], Rhamnogalacturonan Acetylerase [Mølgaard *et al.*, 2000] oder EstA aus *Pseudoalteromonas sp.* 643A [Brzuszkiewicz *et al.*, 2009], die unterschiedliche Reaktionen katalysieren. Der Vergleich der Struktur von DltD mit der Struktur der Thioesterase I zeigt bei DltD deutlich mehr α -Helices als bei der Thioesterase I (Abb. 1.9).

1.3 Postulierte Modelle für die D-Alanylierung von Teichonsäuren

Die bisherigen Untersuchungen der Dlt-Proteine führten zur Postulierung von zwei möglichen Modellen für die D-Alanylierung von Teichonsäuren. Beide Modelle, sowohl das von Neuhaus und Baddiley (Abb. 1.10(a)) [Neuhaus und Baddiley, 2003], als auch das von Fischer (Abb. 1.10(b)) [Fischer, 1994] gehen von DltB als Membranprotein und einem membrangebundenen DltD aus. Im Gegensatz zu den experimentell bestätigten Aufgaben von DltA und DltC als Adenylatbildendes Enzym bzw. Carrierprotein sind die Funktionen und Orientierungen von DltB und DltD nicht bestätigt.



(a) Modell von Neuhaus und Baddiley.



(b) Modell von Fischer.

Abb. 1.10: Modelle der D-Alanylierung von Teichonsäuren. Die Darstellung ist an Reichmann *et al.* [Reichmann *et al.*, 2013] angelehnt. Nach der Aktivierung von D-Alanin durch DltA wird D-Alanin auf DltC übertragen. Nachfolgende Reaktionen werden unterschiedlich beschrieben. **(a)** Modell von Neuhaus und Baddiley: DltD interagiert mit DltA und DltC. Beladenes DltC wird durch DltB auf die Zellaußenseite transportiert um dort D-Alanin auf die Lipoteichonsäure zu übertragen. **(b)** Modell von Fischer: DltC überträgt D-Alanin mit Hilfe von DltB an eine Membrankomponente (möglicherweise Undecaprenylphosphat), die durch DltB durch die Cytoplasmamembran transportiert wird. Auf der Zellaußenseite wird D-Alanin mit Hilfe von DltD auf die Lipoteichonsäure übertragen.

Das Modell von Neuhaus und Baddiley (Abb. 1.10(a)) sieht vor, dass DltD an der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran gebunden ist und als Mediator der DltA-Reaktion wirkt. Es konnte für *Lactobacillus rhamnosus* gezeigt werden, dass der lösliche Teil von DltD an DltC binden kann und die Beladung von DltC mit D-Alanin, aber nicht die Beladung von ACP aus *E. coli*, erhöht [Debabov *et al.*, 2000]. Versuche mit gereinigter Membran zeigten eine Thioesterasefunktion von DltD gegenüber fälschlicherweise mit D-Alanin beladenem ACP. Diese korrigierende Aufgabe würde somit den verfügbaren D-Alanin Gehalt im Cytoplasma erhöhen [Debabov *et al.*, 1996]. Gemäß des Modells von Neuhaus und Baddiley wird D-Alanin-DltC mit Hilfe von DltB durch die Membran transportiert. In der Nähe zur Cytoplasmamembran könnte D-Alanin von DltC auf die Lipoteichonsäure übertragen werden, wobei eine nicht spezifizierte Membrankomponente notwendig ist [Reusch und Neuhaus, 1971; Heaton und Neuhaus, 1994; Neuhaus und Baddiley, 2003].

Im Modell von Fischer überträgt DltC das D-Alanin an eine Membrankomponente, möglicherweise Undecaprenylphosphat [Fischer, 1994]. Wahrscheinlich ist DltB an dieser Übertragung beteiligt und tranferiert anschließend die Membrankomponente. Der letzte Schritt, die Übertragung von D-Alanin auf die Lipoteichonsäure, erfolgt dann mit Hilfe von DltD. Es ist bekannt, dass Zellwandrückstände für die letzten Schritte der Beladung von Lipoteichonsäuren mit D-Alanin notwendig sind [Reusch und Neuhaus, 1971].

Die letzten Untersuchungen bezüglich des Mechanismus zur D-Alanylierung der Teichonsäuren wurden im Jahr 2013 und 2018 publiziert [Reichmann *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2018]. Die Untersuchung von Reichmann *et al.* beinhalten zwei wesentliche Aussagen, die das Modell von Fischer unterstützen. DltC lässt sich nur im Cytoplasma nachweisen. Ein Transport von DltC über die Membran, wie von Neuhaus und Baddiley vorgeschlagen, konnte nicht gezeigt werden. Des Weiteren zeigten zwei Versuche mit Fusionsproteinen mit DltD eine „N-Terminus innen C-Terminus außen“-Topologie, was dem Modell von Fischer und einer Position auf der periplasmatischen Seite entspricht. Auf einen Einfluss des Fusionsproteins auf die Topologie wurde nicht eingegangen. Ma *et al.* konnten durch Struktur- und Interaktionsuntersuchungen von DltB und DltC zeigen, dass die beiden Proteine miteinander interagieren. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass DltC und DltB an den weiteren Reaktionen zur D-Alanylierung beteiligt sind [Ma *et al.*, 2018].

1.4 Zielstellung

Die Entdeckung neuer multiresistenter Bakterienstämme erfordert die Entwicklung weiterer Strategien zur Bekämpfung ebendieser [Baquero *et al.*, 1991; Adam, 2002; Hao *et al.*, 2012; Petchiappan und Chatterji, 2017]. Die von Bertsche *et al.* im Jahr 2013 durchgeführten Untersuchungen von Daptomycin und Methicillin resistenten *Staphylococcus aureus* zeigten erhöhte Expressionsraten für Gene der Teichonsäurebiosynthese sowie für das *dlt*-Operon [Bertsche *et al.*, 2013]. Außerdem führte der Verlust der Dlt-Proteine zu einer erhöhten Sensitivität der Bakterien gegenüber Antibiotika [Velez *et al.*, 2007; Steen *et al.*, 2004]. Somit stellen diese Proteine ein mögliches Ziel für Pharmazeutika dar.

Im *dlt*-Operon werden vier essentielle Proteine (DltA, DltB, DltC und DltD) codiert, die die D-Alanylierung der Teichonsäure, einem Bestandteil der Zellwand, durchführen. Insbesondere die Strukturen der beiden cytosolischen Proteine DltA und DltC sind bereits gut untersucht, auch wenn einzelne Fragen noch nicht beantwortet werden konnten. Es ist bekannt, dass sich das aktive Zentrum von *SpDltA* (DltA aus *S. pneumoniae*) von DltA aus anderen Bakterienarten, wie z. B. *Bacillus subtilis*, unterscheidet. Unbekannt sind hingegen Details, ob und wie sich dies auf die D-Alanylierung auswirkt. Außerdem konnte für DltA bisher nur eine (post)-Adenylierungskonformation sowie eine Transferkonformation als Kristallstruktur beschrieben werden. Die Kristallisation in der hypothetischen, offenen Konformation konnte hingegen bisher nur in strukturverwandten Proteinen gezeigt werden. Daher war ein Ziel dieser Arbeit, Kristallisationsansätze von *SpDltA* mit und ohne Substrat bzw. Produkt herzustellen und diese zu analysieren. In diesem Rahmen sollten auch weitere Aussagen zu hypothetischen offenen Konformationen getätigt werden.

Die Erforschung möglicher Angriffspunkte in der D-Alanylierung von Teichonsäuren erfordert jedoch auch weitergehende Untersuchungen der bisher nicht charakterisierten Proteine DltB und DltD. Daher wurde zunächst ein Konstrukt erstellt, das lösliches DltD lieferte. Danach erfolgte die Reinigung sowie die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse des Konstrukts. Durch vergleichende Analysen der Tertiärstruktur der Proteinsequenzen von DltD aus diversen Organismen sowie Umsatzmessungen eines Substrates sollte es ermöglicht werden eine detailliertere Aussage zur Funktion von DltD zu tätigen. Auch mögliche Interaktionen zwischen *SpDltA*, *SpDltC* und *SpDltD_{tr}* waren Teil der Untersuchungen zur Aufgabe von DltD. Diese strukturellen und funktionellen Untersuchungen von DltD könnten weitere Hinweise auf mögliche Substrate zur Inhibierung der Aktivität liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Tab. 2.1: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Sigma-Aldrich, Steinheim
Acetonitril	Carl Roth, Karlsruhe
Acrylamid (Rotiphorese)	Carl Roth, Karlsruhe
Adenosin 5'-monophosphat (Natriumsalz)	Fluka, Steinheim
Adenosin 5'-triphosphat (Natriumsalz)	Fluka, Steinheim
Adenosin-5'-[(α,β)-methyleno]triphosphat	Jena Bioscience, Jena
Agar-Agar	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
D-Alanin	Fluka, Steinheim
4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent</i>	BioRad, München
Bis-Tris-Propan	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
N-(tert-Butoxycarbonyl)-D-Alanin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Chloroform-D	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie Brilliant Blau R250	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau G250	Merck, Darmstadt
Dichlormethan	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dicyclohexylcarbodiimid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diethylether	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diethyl- <i>p</i> -nitrophenylphosphat (DNP)	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg
4-(Dimethylamino)-pyridin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)	Carl Roth, Karlsruhe

Chemikalie	Hersteller
Dithiothreitol	AppliChem, Darmstadt
Essigsäure	VWR, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham
<i>GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham
α -D-Glucose (Monohydrat)	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Guanidiniumhydrochlorid	NIGU Chemie, Waldkraiburg
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe
Hexan	Sigma-Aldrich, Steinheim
Imidazol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropyl-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumpermanganat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid (Hexahydrat)	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
N-Acetylcysteamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat (Dihydrat)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Nickel(II)-chlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyethylenglykol 400	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyethylenglykol 8.000	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propan-2-ol	VWR, Darmstadt
Salzsäure	VWR, Darmstadt
Silica	Sigma-Aldrich, Steinheim

Chemikalie	Hersteller
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth, Karlsruhe
Trypton	Carl Roth, Karlsruhe

2.1.2 Geräte

Tab. 2.2: Genutzte Geräte.

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	-	Varioklav
CD-Spektralanalysator	J-810	Jasco
CCD Detektor	Saturn 944+	Rigaku
Elektrophorese	<i>Gel Caster Hoefer 260</i>	Amersham Biosc.
Elektrophorese	Hoefer SE 260	Amersham Biosc.
Elektrophorese	<i>Powersupply 300/301 260</i>	Amersham Biosc.
Elektrophorese	<i>Easy Cast Modell B1A</i>	OWL Consort
Elektrophorese	<i>Maxi Powersupply E835</i>	OWL Consort
FPLC	Äkta FPLC U-900	GE Healthcare
Heizblock	<i>Block Heater</i>	Stuart Scientific
Hochdruckhomogenisator	Micron Lab 40	APV
Konzentratoren	Amicon <i>Ultra centrifuge filter</i> <i>mwco: 5.000 Da & 10.000 Da</i>	Millipore
Kryosystem	X-stream 2000	Rigaku
Küvette (CD)	106-QS	Hellma Analytics
Küvette (UV-Vis)	105.202-QS	Hellma Analytics
Laminarflowbox	Hera Safe	Heraeus Instr.
Magnetrührer	HR Hei-Mix L	Heidolph
Membranpumpe	Vacuum system ME2	Vaccubrand
PCR Cycler	<i>Professional Thermocycler</i>	Biometra
pH-Meter	WTW	Inolab
Pipetten	Eppendorf Research	Eppendorf
Pippettierroboter	Microsys 4000	Zinsser Analytics
Platten-Imager	MinstrelUV	Rigaku
Röntgengenerator	Micromax 007	Rigaku

Gerät	Typ	Hersteller
Rührer	MR Hei-MixL	Heidolph
Schüttelinkubator	TH 30	Edmund Bühler
Thermomixer	<i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf
Ultraschallgenerator	VibraCell	Bioblock Scientific
UV-Transilluminator	Kaiser RS1	Kaiser
UV-Vis-Spektrometer	Ultraspec 3300 pro	GE Healthcare
UV-Vis-Spektrometer	Jasco V-630	Jasco
Waage	TE3102S	Sartorius
Waage	New Classic MS	Mettler Toledo
Zentrifuge	5804-R	Eppendorf
Zentrifuge	Micro120	Hettich
Zentrifuge	Avanti J-20/-30	Beckmann
Zentrifuge	Sigma 2-16K	Sartorius

2.1.3 Kommerzielle Kits

PCR

Die PCR-Ansätze wurden mit Phusion (Polymerase) und Lösungen von NEB (New England BioLabs, Frankfurt) angesetzt.

PCR-Reinigungskit

Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte mittels „QIAquick PCR Purification Kit“ (Quiagen, Hilden).

Plasmid-Reinigungskit

Die Plasmide wurden mit dem „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ (Thermo Fisher Scientific, Berlin) gereinigt.

DNA-Gelreinigungskit

Die DNA wurde mit dem „Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit“ (Zymo Research, Freiburg) aus der Agarose gelöst und gereinigt.

Restriktionsenzyme und Puffer

Tab. 2.3: Restriktionsenzyme und Puffer.

Enzymname	Hersteller	Aktivität
NdeI	New England BioLabs, Frankfurt	20.000 U/mL
XhoI	New England BioLabs, Frankfurt	20.000 U/mL
CIP	New England BioLabs, Frankfurt	10.000 U/mL
T4 DNA Ligase	New England BioLabs, Frankfurt	400.000 U/mL
Puffer 3	New England BioLabs, Frankfurt	-
Ligasepuffer	New England BioLabs, Frankfurt	-

Kristallisationskits

Initiale Kristallversuche erfolgten mit Hilfe kommerziell erhältlicher Kits (Tab. 2.4).

Tab. 2.4: Kristallisationsscreenings.

Name	Hersteller
<i>JBScreen classic 1-10</i>	Jena Bioscience, Jena
<i>JBScreen JCSG++</i>	Jena Bioscience, Jena
<i>Crystal screen HR2-110 und HR2-112</i>	Hampton Research, Aliso Viejo (USA)
<i>Cryo crystallization kit</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Low ionic strength crystallization kit</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Morpheus</i>	Molecular Dimensions, Suffolk (UK)

2.1.4 FPLC-Säulen

Tab. 2.5: Säulenmaterial für die FPLC.

Säulenname	Hersteller	Bindepkapazität
His-Trap HP 5 mL / 1 mL	GE Healthcare, Chicago	40 mg/mL
Superdex75-sepharose 16/600	GE Healthcare, Chicago	-
Superdex200-sepharose 16/600	GE Healthcare, Chicago	-

2.1.5 Bakterienstämme

Zur Expression der gewünschten Proteine wurde *E. coli* BL21 (DE3) genutzt. Für molekularbiologische Arbeiten wurde *E. coli* XL1 blue genutzt (Tab. 2.6).

Tab. 2.6: Bakterienstämme und ihre Spezifikationen.

Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	lon- ompT recA1 endA1 gyrA96 thi-1	Novagen
<i>E. coli</i> XL1 blue	hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔ M15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene

2.1.6 Vektoren

Die Sequenzen von *SpDltA*, *SpDltC* und *SpDltD_{tr}* wurden in pET21a beziehungsweise pET15bTEV Vektoren eingebracht. Erster trägt einen nicht proteolytisch entfernbaren C-terminalen [His]₆-Tag. Im Gegensatz dazu besitzt pET15bTEV eine *tobacco-etch-virus*-Protease-Schnittstelle (TEV-Protease-Schnittstelle) zwischen dem N-terminalen [His]₆-Tag und dem zu exprimierenden Gen. Während der Reinigung ist es somit möglich, den [His]₆-Tag zu entfernen. Für die Beladung von *SpDltC* mit 4'-Phosphopantethein wurde zusätzlich der pREP4 Sfp Vektor genutzt. Dieser trägt das Gen zur Expression von Sfp, einer 4'-Phosphopantethein-Transferase aus *B. subtilis*. Vor der Expression von *SpDltC* wurde zunächst der pREP4 Sfp Vektor in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Aus den Transformanten wurden chemisch kompetente Zellen hergestellt. In diese Zellen wurde anschließend der Vektor mit *SpDltC* transformiert. Die Selektion der Klone mit pET15bTEV Plasmid erfolgte mit Ampicillin, die Selektion der Klone mit pREP4 Plasmid erfolgte mit Kanamycin.

2.2 Molekularbiologische Arbeiten

2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Herstellung der Plasmidkonstrukte von *SpDltA*, *SpDltC* und *SpDltD_{tr}* erfolgte mit genomischer DNA von *Streptococcus pneumoniae* der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“ (DSMZ 20566). Hierzu wurden in der Polymerasekettenreaktion die Lösungen (Tab. 2.7) und die von „Metabion“ hergestellten Primer (Tab. 2.8) gemischt und der Genabschnitt in der Reaktion vervielfältigt (Tab. 2.9). Nach einer ersten Gradienten-PCR zur Bestimmung der Anlagerungstemperatur (*annealing*), wurde die Reaktion noch einmal im doppelten Ansatz bei dieser Temperatur durchgeführt. Mit Hilfe der Primer konnten zusätzlich Restriktionsschnittstellen (NdeI und XhoI) in die Produkte integriert werden, die ebenfalls auf dem Vektor (pET15bTEV) vorhanden sind.

Tab. 2.7: PCR-Ansätze. Für jedes Konstrukt wurden fünf Ansätze mit jeweils 20 μL erstellt.

Lösung	Volumen [μL]	Konzentration
HF-Puffer (NEB)	4,0	5 x
dNTPs	0,4	10 mM
Primer 1	0,1	100 μM
Primer 2	0,1	100 μM
Plasmid DNA	0,5	unbekannt
Polymerase (Phusion)	0,2	2.000 U/ mL
steriles Wasser	13,7	-

Tab. 2.8: Primer für die Erstellung von Vektoren für *SpDltA*, *SpDltC* und *SpDltD_{tr}*. Die Primer wurden von der Firma „Metabion“ synthetisiert und für die Herstellung der *Insert*-DNA genutzt.

Primernamen	Primersequenz
<i>SpDltA</i> vorwärts	5' TGA TCA TAT GTC AAA TAA ACC AAT AGC AG 3'
<i>SpDltA</i> rückwärts	5' TCA TCT CGA GTC ATC TCT TAT TCA CCT CG 3'
<i>SpDltC</i> vorwärts	5' TGA TCA TAT GGA TAT CAA ATC AGA AGT TAT TG 3'
<i>SpDltC</i> rückwärts	5' TCA TCT CGA GTT AAG CAT TTT GTA GCT CCA C 3'
<i>SpDltD_{tr}</i> vorwärts	5' TGA TCA TAT GAC TGA GAT GCA TCA TAA TCT AG 3'
<i>SpDltD_{tr}</i> rückwärts	5' TCA TCT CGA GTT ATT GAA ATT CTT TGA CAT CTC 3'

Tab. 2.9: PCR-Protokoll. Temperatur- und Zeitverlauf für die PCR.

Phase	Temperatur	Zeit	
Initialisierung	98 °C	180 s	} 30 Zyklen
Denaturierung	98 °C	15 s	
Annealing	56-75 °C	60 s	
Elongation	72 °C	60 s	
finale Elongation	72 °C	420 s	
finale Temperatur	4 °C	∞	

Zur Herstellung der Mutanten von *SpDltD_{tr}* wurde das Plasmid mit Hilfe von zielgerichteter Mutagenese-PCR verändert (Tab. 2.10 bis Tab. 2.12). Für die Doppelmutante Serin78-Alanin und Histidin-379-Alanin wurde zunächst das Plasmid mit der Serin-78-Alanin-Mutation hergestellt und gereinigt. Anschließend erfolgte die zweite Mutagenese-PCR mit Hilfe des His379Ala Primers. Der Verdau mit DpnI zum Abbau der parentalen DNA erfolgte unter Einsatz von 1 μ L DpnI (20.000 U/mL) in 10 μ L PCR-Produkt. Die Mischung wurde für eine Stunde bei 37 °C verdaut. Danach erfolgte eine Transformation in *E. coli* XL1 blue Zellen.

Tab. 2.10: Mutageneseprimer. Primer zur Erzeugung der Mutanten von *SpDltD_{tr}*.

Primernamen	Primersequenz
Ser78Ala	5 ' AAC GAA GCC ATT CAG CAG AGC CAA AGA AGG GAA CAA AAC GCA 3 '
Glu79Gln	5 ' GTC AAA ACG AAG CCA CTG ACT AGA GCC AAA GAA GGG AAC AAA A 3 '
His379Ala	5 ' AAC CCA ACC AAC CAA GGG CAA TGG TGT CCT TCA TAA AGA AAG 3 '

Tab. 2.11: PCR-Ansätze für die Mutagenese. Für jedes Konstrukt wurden fünf Ansätze mit jeweils 50 μ L angesetzt.

Lösung	Volumen [μ L]	Konzentration
HF-Puffer (NEB)	10,0	5 x
dNTPs	1,0	10 mM
Primer	0,2	100 μ M
Plasmid DNA	0,2	50 ng
Polymerase (Phusion)	0,5	2.000 U/mL
steriles Wasser	38,1	-

Tab. 2.12: PCR-Protokoll für die Mutagenese. Temperatur- und Zeitverlauf.

Phase	Temperatur	Zeit	
Initialisierung	98 °C	300 s	} 30 Zyklen
Denaturierung	98 °C	30 s	
Annealing	56-75 °C	30 s	
Elongation	72 °C	210 s	
Finale Elongation	72 °C	600 s	
Finale Temperatur	4 °C	∞	

2.2.2 Reinigung von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des „QIAquick PCR Reinigungskits“ gereinigt. Die Anwendung erfolgte wie vom Hersteller vorgesehen, bis auf die Nutzung von sterilem Reinstwasser anstatt des Elutionspuffers im letzten Schritt.

2.2.3 Restriktionsverdau von PCR-Produkten und Vektoren

Sowohl die Vektoren als auch die PCR-Produkte wurden mit Hilfe eines Doppelverdau mit NdeI und XhoI geschnitten (Tab. 2.13). Der Verdau erfolgte für drei Stunden bei 37 °C im Thermoschüttler mit anschließender Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 65 °C für 20 Minuten. Nach dem Verdau wurde das PCR-Produkt über ein Agarosegel aufgereinigt. Der Vektor wurde für eine Stunde bei 37 °C unter Zugabe von 1 µL CIP (*calf intestine phosphatase*) inkubiert und auch dieses Enzym hitzeinaktiviert. Danach erfolgte die Reinigung über ein Agarosegel.

Tab. 2.13: Restriktionsansätze für alle DNA-Konstrukte. Die Restriktion wurde in einem Eppendorfreaktionsgefäß bei 37 °C für drei Stunden durchgeführt. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte durch Inkubation bei 65 °C für 20 Minuten.

Lösung	Volumen [µL]	Konzentration
gereinigte DNA	40,0	50-100 ng/µL
NEB Puffer 3	5,0	-
NdeI	2,0	2.000 U/mL
XhoI	2,0	2.000 U/mL
BSA	0,5	10 mg/mL

2.2.4 Reinigung von geschnittener DNA

Die Aufreinigung der geschnittenen DNA erfolgte über ein 1%iges Agarosegel. Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente im Gel wurden die gewünschten Banden ausgeschnitten und mit Hilfe des „Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kits“ (Zymo Research) wie vom Hersteller angegeben gereinigt. Die Elution der DNA erfolgte mit sterilem Reinstwasser.

2.2.5 Ligation

Mit Hilfe eines weiteren Agarosegels konnte die DNA-Konzentration des Plasmids und des PCR-Produktes geschätzt werden. Zur Ligation wurden 50 ng Plasmid-DNA, die fünffache bzw. zehnfache Stoffmenge an PCR-Produkt, 1 µL T4 Ligasepuffer und 1 µL T4 Ligase in einem Gesamtvolumen von 10 µL verwendet. Der Verdau erfolgte über eine Stunde bei Raumtemperatur mit anschließender zehnmütiger Inhibierung bei 65 °C.

2.2.6 Präparation von Plasmid-DNA

Nach der Transformation in *E. coli* XL1 blue Zellen (siehe Abschnitt 2.3.3) wurde eine Kolonie in 4 mL LB-Medium und 4 μ L Ampicillin (100 mg/mL) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Plasmid konnte nach Herstellerangaben mit dem „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ (Thermo Fisher Scientific) gereinigt werden. Hierbei erfolgte die Elution nicht mit dem Puffer, sondern mit sterilem Reinstwasser.

2.2.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt ($E_{260 \text{ nm}}$). Hierzu wurden 5 μ L DNA mit 95 μ L Wasser verdünnt und die DNA-Konzentration bestimmt (Formel (2.1)). Hierbei entspricht 20 dem Verdünnungsfaktor und 50 dem Umrechnungsfaktor für doppelsträngige DNA.

$$\frac{\text{Konzentration}}{\text{ng}/\mu\text{L}} = E_{260 \text{ nm}} \cdot 50 \cdot 20 \quad (2.1)$$

2.2.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenz der hergestellten Vektoren wurden vom „GATC Biotech Sequenzierservice“ (Konstanz) geprüft.

2.2.9 Agarosegele

In 50 mL TAE-Puffer wurden 0,5 g Agarose durch Erhitzen gelöst, nach dem Abkühlen mit Ethidiumbromid (1 %) versetzt und in eine Gelkammer gegossen. Die Proben wurden mit Agarose-Ladepuffer gemischt und in die Taschen gefüllt. Die Laufzeit des Gels betrug 45 bis 90 Minuten bei 100 V und 30 mA.

TAE-Puffer: 40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; pH 8,3; 2 mM EDTA

Agarose-Ladepuffer: 50 % (w/v) Glycerol; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau in TAE Puffer

2.3 Proteinexpression

2.3.1 Herstellung von Stammlösungen zur Expression

LB (*Luria Bertani*)-Medium und LB(*Luria Bertani*)-Agar

Für LB-Medium wurden 5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 % (w/v) Trypton und 10 % (w/v) Natriumchlorid in Reinstwasser gelöst und anschließend bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert [Bertani, 1951].

Für LB-Agar wurde zu LB-Medium Agar-Agar in einer Konzentration von 15 g/L zugegeben und für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Nach dem Abkühlen erfolgte die Zugabe des Antibiotikums und die Abfüllung in Petrischalen (ca. 20 mL pro Petrischale).

Antibiotika

Ampicillin wurde mit einer Konzentration von 100 mg/mL in Reinstwasser gelöst und steril filtriert. Kanamycin wurde mit einer Konzentration von 50 mg/mL in Reinstwasser gelöst und steril filtriert.

SOC-Medium (*super optimal broth with catabolite repression*)

Das SOC-Medium für die Transformation setzte sich aus 20 µL 50-fach konzentriertem SOC-Mix und 480 µL SOB-Medium zusammen.

50 x SOC-Mix: 500 mM NaCl; 125 mM KCl; 500 mM MgCl₂;
500 mM MgSO₄; 1 M Glucose; sterilfiltriert

SOB-Medium: 2 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt;
bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert

2.3.2 Herstellung von chemisch kompetenten Zellen

Ein Teil einer Glycerin-Zellkultur wurde in 4 mL LB-Medium und dem passenden Antibiotikum über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 mL frisches LB-Medium mit 50 µL des Antibiotikums und 0,5 mL der Vorkultur versetzt und bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach Erreichen einer Absorption von 0,4 bis 0,6 bei einer Wellenlänge von 600 nm erfolgten eine Inkubation auf Eis für zehn Minuten sowie ein Zentrifugationsschritt von 15 Minuten bei 2.760 g und 4 °C. Das Pellet wurde in 20 mL einer 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in

1 mL 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und für zwei Stunden auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 mL 50 % (v/v) Glycerol. Die Zellen wurden in 100 µL Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.3 Transformation

Zur Transformation wurde ein Aliquot von 100 µL chemisch kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, 10 bis 100 ng DNA zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte bei 42 °C ein Hitzeschock für 80 Sekunden und anschließend fünf Minuten Inkubation auf Eis. Zuletzt wurden 500 µL des temperierten SOC-Mediums zugegeben und bei 37 °C und 300 rpm im Eppendorf Thermomixer für 45 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden dann bei 7.000 *g* für drei Minuten abzentrifugiert und 400 µL des Überstandes abgenommen. Im restlichen Medium wurde das Pellet resuspendiert und auf Agarplatten mit Ampicillin (*SpDltA*, *SpDltD_{tr}*) bzw. Ampicillin und Kanamycin (*SpDltC*) ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

2.3.4 Vorkulturen

Vorkulturen wurden durch Inkubation von einer Kolonie einer Transformation oder einem Teil der Glycerinkultur in 4 mL LB-Medium und 4 µL Ampicillin (100 mg/mL) über Nacht bei 37 °C und 150 rpm hergestellt. Für die Anzucht von Zellen mit pET15bTEV *SpDltC* und pREP4 Sfp wurden zusätzlich 3 µL Kanamycin (50 mg/mL) zugegeben.

2.3.5 Hauptkultur

Die Hauptkultur, die zur Herstellung von Biomasse mit dem gewünschten Protein diente, wurde in 5 L Kolben angesetzt. Hierzu wurden 1,5 L LB-Medium mit 1,5 mL Ampicillin (100 mg/mL) und 15 mL Vorkultur bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Zur Herstellung von *SpDltC* wurde zusätzlich 1 mL Kanamycin (50 mg/mL) zugegeben. Bei Erreichen einer Absorption von 0,4 bis 0,6 bei einer Wellenlänge von 600 nm wurde die Proteinproduktion durch Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) induziert. Die Zellernte erfolgte nach vier Stunden durch Zentrifugation bei 4 °C und 4.500 *g* für 20 Minuten. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.6 Glycerinkulturen

Glycerinkulturen wurden zur Konservierung der hochwertigen Expressionskulturen aus diesen hergestellt. Hierzu wurde vor der Induktion bei einer optischen Zelldichte

von 0,4 bis 0,6 bei einer Wellenlänge von 600 nm 0,5 mL Zellsuspension entnommen und mit Glycerol auf eine Endkonzentration von 15 % (v/v) gebracht. Die Mischung wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.4 Proteinreinigung

2.4.1 Zellaufschluss

Die Zellen wurden in 40 bis 60 mL Lysepuffer (50 mM Tris; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; pH 8,0 bei 8 °C) suspensiert und ein EDTA-freier Proteaseinhibitormix (Roche) zugegeben. Die Zellen wurden in einem Hochdruckhomogenisator bei ca. 400 bar in fünf Durchgängen aufgeschlossen. Anschließend erfolgte eine Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 4 °C und 74.000 *g* für 45 Minuten.

2.4.2 Erste IMAC

Da alle Proteine mit N-terminalem [His]₆-Tag hergestellt wurden, erfolgte die Reinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie auf einer Äkta FPLC. Der Überstand der Zentrifugation wurde durch einen Spritzenvorsatzfilter mit 0,45 µm Porengröße filtriert und auf eine 5 mL Ni-NTA Säule (GE Healthcare) aufgetragen (50 mM Tris; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; pH 8,0 bei 8 °C). Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit diesem Puffer eluiert. Anschließend erfolgte die Elution des gewünschten Proteins in einem linearen Gradienten (100 Minuten; 1 mL/min). Die fraktionierten Proben wurden mittels Glycin-SDS-PAGE analysiert und die gewünschten Fraktionen vereinigt.

IMAC-Puffer-A₁: 50 mM Tris; 300 mM NaCl; pH 8,0 bei 8 °C

IMAC-Puffer-B₁: 50 mM Tris; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazol;
pH 8,0 bei 8 °C

2.4.3 TEV-Proteaseverdau

Der N-terminale [His]₆-Tag der Konstrukte ließ sich durch Verdau mit TEV-Protease abspalten. Dafür wurden die zutreffenden Proben der ersten IMAC mit ca. 1 mg gereinigter TEV-Protease versetzt und in einen Dialyseschlauch gefüllt. Hierbei wurde für *SpDltA* und *SpDltD_{tr}* ein 12-14 kDa *m.w.c.o.* und für *SpDltC* 3,5 kDa *m.w.c.o.* Dialyseschlauch gewählt. Die Dialyse fand über Nacht bei 4 °C mit einmaligem Pufferaustausch in jeweils 2 L Puffer (25 mM Tris; 150 mM NaCl; 5 mM DTT, pH 8,0 bei 8 °C) statt.

2.4.4 Zweite IMAC

Nach dem TEV-Proteaseverdau wurde der [His]₆-Tag sowie die TEV-Protease von dem verdauten Protein durch eine zweite Nickel-Affinitätschromatographie getrennt. Die 5 mL Ni-NTA Säule wurde mit der Proteinmischung beladen und der Durchfluss beziehungsweise die Elution mit 20 mM Imidazol für weitere Reinigungsschritte verwendet.

IMAC-Puffer-A₂: 25 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 8,0 bei 8 °C

IMAC-Puffer-B₂: 25 mM Tris; 150 mM NaCl; 500 mM Imidazol;
pH 8,0 bei 8 °C

2.4.5 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Das Volumen der Fraktionen der zweiten IMAC wurde auf 3 bis 4 mL eingengt und bei 20.000 *g* und 4 °C für 30 Minuten abzentrifugiert. Diese Probe wurde auf eine Superdex200-sepharose 16/600-Säule (*SpDltA*, *SpDltD_{tr}*) bzw. eine Superdex75-sepharose 16/600-Säule (*SpDltC*) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 1 mL/min und die gesammelten Fraktionen wurden mittels Glycin-SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen mit dem jeweiligen Protein wurden aufkonzentriert und dann in flüssigem Stickstoff eingefroren oder direkt für Versuche genutzt.

SEC-Puffer : 25 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 8,0 bei 8 °C

2.5 Proteinanalytik

2.5.1 Glycin-SDS-PAGE

Die Glycin-SDS-PAGE wurde durchgeführt, wie von Laemmli [Laemmli, 1970] beschrieben. Die Analyse erfolgte auf Gelen mit 12 %igen Trenngel und 4 %igen Sammelgel (Tab. 2.14). Proben der einzelnen Reinigungsschritte wurden mit 3x SDS-Ladepuffer versetzt und bei 95 °C für zehn Minuten denaturiert. Nach dem Auftragen der Proben sowie des Markers in die Taschen des Gels, wurden sie in Laemmli-Puffer für 70 Minuten bei 280 V und 25 mA aufgetrennt. Die Färbung der Proteinbanden erfolgte mit Coomassie Brilliant-Blau R250 oder G250.

Laemmli-Puffer: 25 mM Tris/HCl; 200 mM Glycin; 3 mM SDS; pH 8,9

3x SDS-Ladepuffer: 875 mM Tris/HCl; 13 % (w/v) Glycerin; 5 % (w/v) SDS;
5 % (w/v) β-Mercaptoethanol;
0,125 % (w/v) Bromphenolblau

Tab. 2.14: Glycin-SDS-PAGE. Pipettierschema für 2 Glycin-SDS-PAGE Gele.

Lösung	Trenngel	Sammelgel
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	3,2 mL	880 μ L
1,5 M Tris/HCl; 0,31 % SDS; pH 8,8	2,0 mL	-
0,5 M Tris/HCl; 0,62 % SDS; pH 6,8	-	800 μ L
Reinstwasser	2,8 mL	2400 μ L
10 % (w/v) APS	60,0 μ L	50 μ L
TEMED	4,0 μ L	3 μ L

2.5.2 Coomassiefärbung

Die Gele wurden in Coomassie R250 oder G250 Lösung nach Fairbanks *et al.* [Fairbanks *et al.*, 1971] gefärbt. Dazu wurden sie für ein bis zwei Stunden in Färbelösung inkubiert (25 % (w/v) Isopropanol, 10 % (w/v) Essigsäure, 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant-Blau R250 oder G250) und anschließend in Entfärbelösung (10 % (w/v) Essigsäure) entfärbt.

2.5.3 UV-Vis-Spektroskopie

Vor den Experimenten wurde die Konzentration der Proteinlösung durch Aufnahme eines UV-Vis-Spektrums im Wellenlängenbereich von 230 bis 340 nm bestimmt. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes (Formel (2.2)) und der Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{280\text{ nm}}$; Tab. 2.15) wurden die Konzentrationen berechnet. Das Bestimmen der Extinktionskoeffizienten und Molmassen erfolgte mit Hilfe der ProtParam Software [Gasteiger *et al.*, 2005; Pace *et al.*, 1995] auf dem ExPASy Proteomics Server sowie nach Gill und von Hippel [Gill und von Hippel, 1989] (Tab. 2.15 und Tab. 2.16).

$$E_{280\text{ nm}} = \epsilon_{280\text{ nm}} \cdot c \cdot d \quad (2.2)$$

Tab. 2.15: Extinktionskoeffizienten und Molmassen. Die angegebenen Werte beziehen sich auf das Protein nach der vollständigen Reinigung und ohne [His]₆-Tag. Die Extinktionskoeffizienten beziehen sich auf die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm. Zur Herstellung der denaturierten Proben wurde die Proteinlösung mit Guanidiniumhydrochlorid versetzt und gemessen (Endkonzentration 6 M Guanidiniumhydrochlorid).

Protein	Molare Absorption nativ [$\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]	Molare Absorption denat. [$\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]	Absorption [(mg/ml) ⁻¹ · cm ⁻¹]
<i>SpDltA</i>	49.280	44.570	0,853
<i>SpDltC</i>	5.500	5.690	0,589
<i>SpDltD_{tr}</i>	64.290	60.390	1,395

Tab. 2.16: Molmassen von *SpDltA*, *SpDltC*, *SpDltD_{tr}* und deren Mutanten. Die angegebenen Molmassen wurden mit ProtParam (Expasy Server) bestimmt [Gasteiger *et al.*, 2005; Pace *et al.*, 1995].

Protein	Molmasse
<i>SpDltA</i>	57.755,75 Da
<i>SpDltC</i>	9.332,48 Da
<i>SpDltD_{tr}</i>	46.094,97 Da
<i>SpDltD_{tr}</i> (Ser78Ala)	46.078,97 Da
<i>SpDltD_{tr}</i> (Glu79Gln)	46.094,97 Da
<i>SpDltD_{tr}</i> (His379Ala)	46.028,90 Da
<i>SpDltD_{tr}</i> (Ser78Ala, His379Ala)	46.012,90 Da

2.5.4 CD-Spektroskopie (Zirkulardichroismus)

Für die Messung von CD-Spektren der nativen Proteine wurden diese direkt nach der Gelfiltration verwendet (25 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 8,0 bei 8 °C). Die Messung der denaturierten Proteine erfolgte nach Zugabe von denaturierendem Puffer (Endkonzentration des Guanidiniumhydrochlorids 6 M) und Inkubation für zwölf Stunden. Vor der Messung erfolgte eine Zentrifugation bei 20.000 *g* und 4 °C für 40 Minuten und die Dreifachbestimmung der Konzentration. Die Konzentration der Proteine betrug zwischen 0,58 mg/mL und 1,22 mg/mL. Die Messung erfolgte bei 20 °C im Bereich von 250 bis 195 nm (nativ) bzw. 250 bis 210 nm (denaturiert) in einer Küvette mit 0,1 mm Schichtdicke. Es wurden jeweils 60 Spektren mit einer Geschwindigkeit von 50 nm/min, 1 nm Datenaufteilung (*data pitch*), 1 Sekunde Antwortzeit und einer Bandweite von 1 nm aufgenommen. Als Referenzen wurden Pufferspektren gemessen und von den Proteinspektren subtrahiert. Für die Umrechnung der Elliptizität in die Elliptizität pro Aminosäure ($\theta_{mrw,\lambda}$) in deg · cm² · dmol⁻¹ wurde Formel (2.3) genutzt.

$$\theta_{mrw,\lambda} = \frac{M \cdot \theta_{\lambda}}{10 \cdot d \cdot c \cdot (N - 1)} \quad (2.3)$$

Mit θ_{λ} : Elliptizität bei der Wellenlänge λ ; d : Schichtdicke in cm; M : Molekulargewicht; c : Konzentration in g/mL und N : Anzahl an Resten [Kelly *et al.*, 2005].

2.5.5 Massenspektrometrie

Gereinigtes Protein wurde zur Bestätigung des Molekulargewichts mit einer ZipTip-C4 Pipettenspitze nach Herstellerangaben entsalzt. Die Analyse wurde von Frau Dr. Schierhorn (Serviceeinheit für Massenspektrometrie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) mittels MALDI-TOF durchgeführt. Somit konnte der Beladungszustand von *SpDltC* mit 4'-Phosphopantethein und die Massen von *SpDltA*

sowie $SpDltD_{tr}$ bestimmt werden. Mit der gleichen Methode wurden die Proben von $SpDltD_{tr}$ nach der Inkubation mit den Inhibitoren analysiert. Ebenso erfolgten Analysen mittels Massenspektrometrie nach Verdau mit Trypsin.

2.5.6 Analytische Ultrazentrifugation

Mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation (AUZ) können Proteine in Lösung untersucht werden. Je nach Methode können hierbei u.a. die Molekülmasse, die Stöchiometrie aber auch die Assoziation mehrerer Proteine bestimmt werden. Bei der AUZ unterscheidet man zwischen zwei Messmethoden [Cole *et al.*, 2008]:

Bei der Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit wird bei hohen Zentrifugationsgeschwindigkeiten die Wanderung der Probe in der Lösung zum Boden der Messzelle zeit- und ortsabhängig aufgelöst. Der Sedimentationskoeffizient (s), der durch diese Messung bestimmt werden kann, ist definiert als:

$$s = \frac{u}{\omega^2 r} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{N_A f} \quad (2.4)$$

Mit u : radiale Sedimentationsgeschwindigkeit; ω : Winkelgeschwindigkeit; r radiale Position; M : Molekülmasse; \bar{v} : partielles spezifisches Volumen des Makromoleküls; ρ : Dichte der Lösung; N_A : Avogadrokonstante sowie f : Reibungskoeffizient.

Die übliche Einheit des Sedimentationskoeffizienten s ist Svedberg (S), wobei 1 Svedberg 10^{-13} Sekunden entspricht [Lebowitz *et al.*, 2002].

In einer zweiten Methode wird das Experiment bei geringeren Rotationsgeschwindigkeiten und längeren Messzeiten durchgeführt, sodass sich ein Gleichgewicht zwischen der Sedimentation und Diffusion einstellt und eine zeitlich stabile Konzentrationsverteilung entsteht. Für nicht-interagierende Moleküle gilt im Gleichgewichtszustand für das Signal a in Abhängigkeit von der radialen Partikelposition r :

$$a(r) = d \sum_n \varepsilon_n c_{n,0} \exp\left(\frac{M_n(1 - \bar{v}\rho)\omega^2}{2RT}(r^2 - r_0^2)\right) + \delta \quad (2.5)$$

Mit M_n : molare Masse; \bar{v} : spezifische Volumen; $c_{n,0}$: molare Konzentration an der Referenzposition r_0 ; ε_n : Extinktionskoeffizienten, d : optische Länge und δ : Korrekturparameter, der unter anderem eine Absorption von nicht sedimentierenden Teilen berücksichtigt [Lebowitz *et al.*, 2002].

Die Analyse des Oligomerisierungszustandes von $SpDltD_{tr}$, sowie Interaktionsversuche zwischen $SpDltA$, $SpDltC$ und $SpDltD_{tr}$ wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. Lilie durchgeführt und ausgewertet. Zur Analyse von $SpDltD_{tr}$ wurde jeweils eine Probe der zwei Peaks der Größenausschlusschromatographie gemessen. Dazu wurden 300 μ L der Proteinprobe mit einer Konzentration von 0,12 mg/mL

(2,6 μM) bei 40.000 rpm für vier Stunden zentrifugiert und dann das Gleichgewicht durch Zentrifugation bei 12.000 rpm eingestellt (AN50Ti-Rotor; Beckmann, 48 bis 72 Stunden).

Für Interaktionsversuche wurden die vier Interaktionsansätze sowie die einzelnen Proteine mit 10,1 μM *SpDltA*, 19,7 μM *SpDltC* und 10,1 μM *SpDltD_{tr}* angesetzt und für eine Stunde bei 25 °C in 25 mM HEPES; 150 mM NaCl; 0,1 mM TCEP; pH 7,5 inkubiert. Dann erfolgte die Sedimentation bei 40.000 rpm für vier Stunden zur Bestimmung des Sedimentationskoeffizienten. Die Interaktion wurde unter Zugabe von 0,5 mM ATP, 0,5 mM D-Alanin und 0,5 mM MgCl_2 erneut getestet.

2.6 Kristallisation und Strukturbestimmung

2.6.1 Initiale Kristallisationsscreenings

SpDltA und *SpDltD_{tr}* wurden nach der finalen Größenausschlusschromatographie auf 20 mg/mL (*SpDltD_{tr}*) und 18 mg/mL (*SpDltA*) aufkonzentriert. Das jeweilige Protein wurde mit Hilfe des Microsys SQ Pipettierroboters diversen Kristallisationsscreens in 96 *well* Platten angesetzt (Tab. 2.4; Seite 23). Dabei enthielt jeder Tropfen 0,2 μL Proteinlösung und 0,2 μL Kristallisationslösung. Das Reservoir fasste 70 μL . Die Platten wurden mit Folie verklebt und danach im Desktop Minstrel UV-Imager (Rigaku) bei 15 °C inkubiert. Die Bedingungen wurden in definierten Zeitabständen fotografiert.

2.6.2 Optimierung der Kristallisation

Zur Reproduktion und Optimierung der Kristalle wurden diese in 15 *well* Platten mit 500 μL Reservoirelösung und Tropfengrößen von 3 bis 4 μL angesetzt. Hierbei wurden folgende Parameter variiert:

1. Änderung der Präzipitantenkonzentration
2. Änderung des pH-Wertes des Puffers
3. Änderung des Volumenverhältnisses von Reservoirelösung zu Proteinlösung (1:1, 2:1, 1:2)
4. Zugabe von D-Alanin und/oder Ribitol (*SpDltD_{tr}*) bzw. Zugabe von D-Alanin, AMP und MgCl_2 oder D-Alanin, ATP und MgCl_2 (*SpDltA*)

2.6.3 Röntgendiffraktion und Prozessierung

Eine erste Auswahl der Proteinkristalle erfolgte *in house* mit Hilfe des Micromax 007 Röntgengenerators (Rigaku), dem CCD-Detektor Saturn 944+ (Rigaku) sowie dem Kryosystem X-stream 2000 (Rigaku). Die finale Messung der besten Proteinkristalle erfolgte anschließend am Synchrotron. Die Proteinkristalle von *SpDltD_{tr}*, *SpDltA* und *SpDltA* mit AMP wurden an der Beamline 14.2 am BESSY II, Helmholtz-Zentrum Berlin gemessen [Müller *et al.*, 2012]. Die Messung des Proteinkristalls von *SpDltA* mit ATP erfolgte durch Frau Dr. Miriam Linnert am Diamond Light Source (Oxfordshire, England). Die Datensätze wurden mit *XDS* [Kabsch, 2010] prozessiert und die Anzahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit mit *CCP4-Matthews coefficient* bestimmt [Matthews, 1968; Kantardjieff und Rupp, 2003].

2.6.4 Phasenbestimmung - *molecular replacement*

Initiale Phasen konnten durch *molecular replacement* unter Verwendung von Phenix-Phaser [McCoy *et al.*, 2007; Adams *et al.*, 2010] bestimmt werden. Für die Phasenbestimmung von *SpDltD_{tr}* wurde die Kette A von der bekannten DltD-Struktur (pdb-Code 3bma) genutzt. Die Phasenbestimmung bei *SpDltA* erfolgte für die ligandenfreie Struktur sowie die Struktur mit AMP durch Einzelsuche nach der großen und der kleinen Domäne von DltA aus *B. subtilis* (pdb-Code 3e7w; AS 1-395 und AS 396-511). Für die Phasierung von *SpDltA* mit ATP wurde die zuvor gelöste Struktur von *SpDltA* mit AMP als Suchmodell genutzt.

2.6.5 Strukturverfeinerung und Auswertung

Das iterative Verfahren zur Strukturverfeinerung wurde mit Hilfe von Phenix-Refine [Afonine *et al.*, 2012; Adams *et al.*, 2010], sowie einer manuellen Anpassung aufgrund der F_o-F_c und der $2F_o-F_c$ Elektronendichte in *Coot* [Emsley *et al.*, 2010] durchgeführt. Die Evaluation der Struktur erfolgte mit MolProbity [Chen *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2007] als Teil des Phenix-Refine Ablaufs. Zur Darstellung der Struktur, Bestimmung der Abstände sowie strukturellen Überlagerung der kleinen und großen Domänen wurde Pymol genutzt. Die Berechnung der Oberflächenladung erfolgte mittels APBS Tool 2.1 in Pymol [Baker *et al.*, 2001].

Zur Quantifizierung der Interaktionsfläche innerhalb der Proteinmoleküle wurden diese in die große Domäne (Aminosäuren 1 bis 403) und die kleine Domäne (Aminosäuren 404 bis 516) eingeteilt. Die Bestimmung der Interaktionsfläche sowie der Oberfläche der jeweiligen Domäne erfolgte mit Hilfe des PDBePISA-Programmes [Krissinel und Henrick, 2007].

Der Vergleich der Struktur von $SpDltD_{tr}$ mit anderen bereits in der Proteindatenbank hinterlegten Strukturen erfolgte mittels DALI-Server [Holm und Laakso, 2016]. Die Untersuchung der Sequenzen von DltD aus diversen Organismen erfolgte mittels Multisequenzalignment sowie der Darstellung mit ConSurf (Tab. 2.17). Hierbei wurde der Konservierungsgrad mit Hilfe eines Farbcodes auf die Struktur projiziert [Ashkenazy *et al.*, 2016; Celniker *et al.*, 2013; Ashkenazy *et al.*, 2010; Landau *et al.*, 2005; Glaser *et al.*, 2003]. Durch das Festlegen auf eine minimale Sequenzidentität von 20 % konnten DltDs aus verschiedenen Subfamilien wie beispielsweise Bacillus-Arten, Staphylokokken und Streptokokken miteinander verglichen werden.

Tab. 2.17: Einstellung des Consurf-Laufs.

Parameter	Wert
Homologer Suchalgorithmus	HMMER
Anzahl an Iterationen	1
<i>E-value cutoff</i>	0,0001
Proteindatenbank	UNIREF-90
Homologieauswahl für ConSurf Analyse	automatisch
Anzahl an Sequenzen	250
Maximal % ID zwischen Sequenzen	95
Minimal % ID für Homologe	20
Alignementmethode	MAFFT-L-INS-i
Kalkulationsmethode	Bayesian
<i>Evolutionary substitution model</i>	Bestes Modell (<i>default</i>)

2.7 Ermittlung der Funktion von $SpDltD_{tr}$

2.7.1 Inhibierungsversuche

Die computergestützte Auswertung der Struktur von $SpDltD_{tr}$ ließ die Vermutung einer möglichen Serin-Histidin-Aspartat Triade zu. Somit sollte ebendieses Serin durch einen kovalent bindenden Inhibitor blockiert werden. Die Analyse der Inhibierung erfolgte mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie nach einer Glycin-SDS-PAGE und Trypsinverdau der Proteinbande. Hierzu wurde zunächst jeweils eine Stammlösung mit 1 M PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) in Acetonitril, Methanol und DMSO hergestellt. Danach wurden 50 μ mol PMSF (in Acetonitril), 10 μ mol PMSF (in Acetonitril), 3,5 mmol PMSF (in DMSO oder Methanol) oder 10 mmol PMSF (in DMSO oder Methanol) zu 3,9 nmol $SpDltD_{tr}$ gegeben. Dabei entsprach die Menge an zugegebenem organischen Lösungsmittel maximal 1 % des Gesamtvolumens. Die Proben wurden für eine Stunde bzw. 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Als Positivkontrolle wurde nicht mit Inhibitor versetztes $SpDltD_{tr}$ gemessen.

Weiterhin wurden Inhibierungsversuche mit AEBSF (4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid) und DNP (Diethyl-*p*-nitrophenylphosphat) durchgeführt. Bei AEBSF handelt es sich um eine Weiterentwicklung von PMSF, die in wässrigen Lösungen stabiler ist als PMSF. 3,5 nmol *SpDltD_{tr}* wurden mit 1 μ mol AEBSF gemischt und nach 24 sowie 48 Stunden Inkubation bei 4 °C gemessen. DNP ist ein Inhibitor, der bereits in vergleichbaren Strukturen eingesetzt wurde [Brzuszkiewicz *et al.*, 2009]. Im Ansatz wurden 3,5 nmol *SpDltD_{tr}* mit 4,6 μ mol DNP emulgiert und nach 24 sowie 48 Stunden Inkubation bei 4 °C gemessen. Auch in diesen Fällen wurde als Positivkontrolle das *SpDltD_{tr}* ohne Zusatz von Inhibitor gemessen.

2.7.2 Thioestersynthese

Die Synthese des Thioesters von D-Alanin und Acetylcysteamin (Abb.2.1) erfolgte in Anlehnung an ein beschriebenes Verfahren [Wang *et al.*, 2009]. Dazu wurde 1 mmol (189 mg) BOC-D-Alanin (N-(tert-Butoxycarbonyl)-D-alanin) in 3 mL DCM (Dichlormethan) unter Rühren in einem 25 mL Rundkolben gelöst. Zu dieser Mischung wurden 1,3 mmol (202 μ L) DIC (Diisopropylcarbodiimid), 82 μ mol (10 mg) DMAP (4-(Dimethylamino)-pyridin) und 1,17 mmol (124,4 μ L) N-Acetylcysteamin hinzugefügt. Die Reaktion wurde unter Sauerstoffausschluss über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reinigung erfolgte über eine Kieselgelsäule (40 % Aceton in Petrolether), wobei die Fraktionen mit Produkt mittels Dünnschichtchromatographie und Anfärbung mit KMnO_4 ermittelt wurden. Anschließend folgte eine Analyse per Massenspektrometrie.

Das Entfernen der BOC-Schutzgruppe erfolgte durch Lösen von 40 mg (140 nmol) Produkt in 300 μ L Dichlormethan sowie der Zugabe von 300 μ L TFA (Trifluoressigsäure). Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Produkt in Diethylether gefällt und getrocknet. Danach erfolgte die Umkristallisation mit Salzsäure.

Die Verifikation erfolgte per LC-MS und als ^1H und ^{13}C -NMR-Messungen. Die Ergebnisse sind im Anhang im Abschnitt A.3 ab Seite VIII gezeigt.

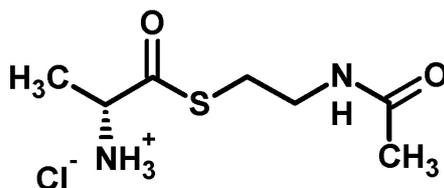
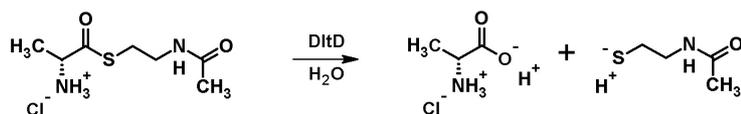


Abb. 2.1: Thioester von D-Alanin und N-Acetylcysteamin. Der Thioester sollte als mögliches Substratanalogon des D-Alaninphosphopantetheins in der Reaktion mit *SpDltD_{tr}* getestet werden.

2.7.3 Thioesterabbau

Sollte der synthetisierte Thioester ein Substrat von $SpDltD_{tr}$ sein, so entstünde bei dem Umsatz ein Thiol (Abb. 2.2), der mittels Ellman's Reagenz (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure; DTNB) nachgewiesen werden kann. Dabei reagiert das Thiol mit dem DTNB und es entsteht 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB^{-}) (Abb. 2.2). Dieses Produkt kann bei einer Wellenlänge von 412 nm nachgewiesen werden (Extinktionskoeffizient ($\epsilon_{412\text{ nm}} = 14.150\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) [Ellman, 1958; Collier, 1973; Riddles *et al.*, 1983] Zum Nachweis des Abbaus des Thioesters wurde in einem Volumen von 1 mL bis zu 20 μM $SpDltD_{tr}$, 250 μM Thioester und 150 μM DTNB in Puffer (100 mM Phosphat, 0 bis 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,0 bei 20 °C) angesetzt und die Absorption der Probe nach Zugabe des Proteins bei einer Wellenlänge von 412 nm für 15 Minuten mit einem Messpunkt alle zehn Sekunden gemessen. Als Kontrollreaktion wurde der Zerfall des Thioesters ohne Protein unter den gleichen Bedingungen gemessen.

Hypothetische enzymatische Spaltung:



Nachweis des Thiols mittels Ellman's Reagenz:

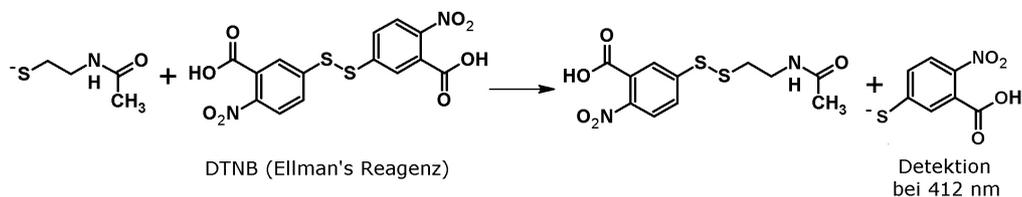


Abb. 2.2: Thioesterhydrolyse. Das Produkt der Hydrolyse des Thioesters ist ein Thiol (N-Acetylcysteamin), welches mit DNTB (Ellman's-Reagenz) nachgewiesen werden kann. Die freie Thiolgruppe reagiert mit DTNB unter Freisetzung von 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB^{-}), das photometrisch bei 412 nm nachgewiesen werden kann (Extinktionskoeffizient $\epsilon_{412\text{ nm}} = 14.150\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

3 *SpDltA*

3.1 Ergebnisse zu *SpDltA*

3.1.1 Klonierung, Proteinpräparation und Proteinanalytik

Die Herstellung der Expressionsvektoren erfolgte durch die Vervielfältigung der jeweiligen Gensequenzen für *SpDltA* und *SpDltC* mittels PCR und der Ligation in pET21a sowie pET15bTEV Vektoren. Hierbei betrug die optimalen Annealingtemperaturen der PCR 64,3 °C (*SpdltA*) und 61,2 °C (*SpdltC*). Anschließend erfolgte die Sequenzierung der DNA durch die Firma „GATC Biotech“ (Konstanz) zur Bestätigung der Sequenz.

Vergleiche der translatierten Proteinsequenz von *SpDltA* und *SpDltC* mit den häufig verwendeten Stämmen *S. pneumoinae* R6, D39 und TIGR4 [Lanie *et al.*, 2006] zeigten teilweise Unterschiede in der Proteinsequenz auf. Während die Proteinsequenz von *SpDltC* mit denen der Vergleichsequenzen von *S. pneumoniae* R6, D39 und TIGR4 übereinstimmt, sind in *SpDltA* einzelne Aminosäuren mutiert (Tab. 3.1, Abb. A.1 und Abb. A.3 ab S. II). Für *SpDltA* konnten Mutationen in den Aminosäuren 322 (Phenylalanin statt Leucin) und 381 (Glycin statt Aspartat) gezeigt werden, die nach bisherigen Kenntnissen nicht an der Reaktion von DltA beteiligt sind.

Die Expression von *SpDltA* und *SpDltC* erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen. Die Beladung von *SpDltC* mit 4'-Phosphopantethein wurde, wie bereits zuvor beschrieben, durch die Co-Expression von Sfp (4'-Phosphopantetheinyl Transferase) realisiert [Pfennig, 2015]. Jeweils eine Probe vor der Induktion mit IPTG und eine Probe vor der Zellernte wurden zur Kontrolle auf ein Gel aufgetragen. Die Expression der Proteine ausgehend vom pET15bTEV-Vektor zeigten dabei größere Proteinmengen der gewünschten Größe. Daher erfolgten die weiteren Versuche mit diesen Proteinen. Die Reinigung der zwei Proteine erfolgte analog zueinander über eine erste IMAC, den Verdau mit TEV-Protease, eine zweite IMAC sowie eine Größenausschlusschromatographie (Superdex200-sepharose 16/600 oder Superdex75-sepharose 16/600) (Abschnitt A.2 ab S. IV).

Die Probe vor der Zellernte zeigte für *SpDltA* (60,0 kDa) eine deutliche Überexpression eines Proteins zwischen 45 kDa und 66 kDa. Die Reinigung ergab ein reines und homogenes Protein zwischen der 45 kDa und 66 kDa Markerbande (Abb. 3.1(a)) mit durchschnittlich 10 mg *SpDltA* pro Liter Expression.

Tab. 3.1: Übersicht der Sequenzunterschiede in *SpDltA*.

Aminosäurenummer	DSMZ 20566	D39	TIGR4
322	F	L	L
381	G	E	E

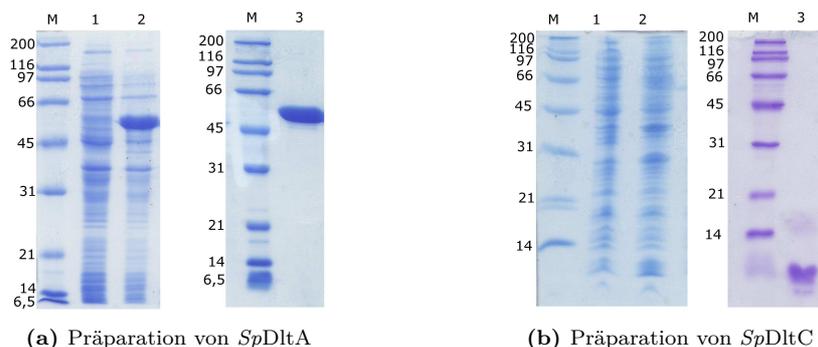


Abb. 3.1: SDS-PAGE der Präparation von *SpDltA* und *SpDltC*. Die 12% Gele zeigen den Marker in kDa (M), die Probe vor der Induktion (1), die Probe vor der Zellernte (vier Stunden nach Induktion mit 1 mM IPTG bei 37 °C) (2) sowie das gereinigte Protein (3). (a) Proben der Expression sowie Reinigung von *SpDltA*. (b) Proben der Expression sowie Reinigung von *SpDltC*.

Für die Expression von *SpDltC* (11,9 kDa) ist keine hohe Überexpression ersichtlich, jedoch zeigte der Bereich unterhalb von 14 kDa breitere Proteinbanden. Die Reinigung ergab ein fast reines Protein unterhalb der 14 kDa Markerbande (Abb. 3.1(b)) mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 4 mg *SpDltC* pro Liter Expression. Die Verwendung eines Tris-Tricin-Gels nach Schägger [Schägger, 2006] zeigte keine Verbesserung in der Bandenqualität.

Eine erste Untersuchung der Struktur von *SpDltA* erfolgte mittels CD-Spektroskopie. Die Abbildung der Elliptizität pro Aminosäure zeigte ein für α -helikale Strukturen typisches Minimum bei 208 nm (Abb. 3.2) [Holzwarth und Doty, 1965], während der Bereich zwischen 210 nm und 250 nm anstieg. Ein zweites Maximum, wie für rein α -helikale Strukturen üblich, war nicht zu erkennen. Neben α -Helices zeigten bisherige Strukturen von DltA auch β -Faltblätter, durch die das CD-Spektrum von reinen α -helikalen CD-Spektren abweichen kann. Das Spektrum nach der Behandlung mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid (in schwarz) zeigte die genannten Merkmale nicht mehr.

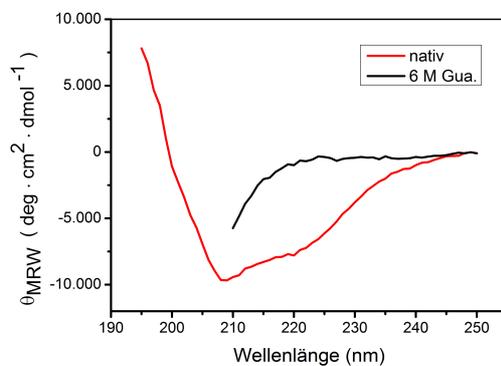


Abb. 3.2: CD-Spektrum von *SpDltA*. *SpDltA* wurde mit einer Konzentration von 1,03 mg/mL im Puffer der Größenausschlusschromatographie gemessen. Für die denaturierte Probe wurde das Protein mit Guanidiniumhydrochlorid (Gua) versetzt (Endkonzentration 6 M Guanidiniumhydrochlorid).

3.1.2 Interaktionsstudien (analytische Ultrazentrifugation)

DltA überträgt D-Alanin auf DltC. Für DltA und DltC aus *B. subtilis* konnte diese Interaktion näher charakterisiert werden [Zimmermann *et al.*, 2015; Pfennig, 2015]. Für *SpDltA* und *SpDltC* sollte die Interaktion mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation qualitativ nachgewiesen werden (Tab. 3.2). Aufgrund der Molekülmassendifferenz zwischen *SpDltC* (9,7 kDa) und einer Messung aller drei Proteine (theoretische Gesamtmasse 113,6 kDa) war die Messung des kleinen Proteins weniger präzise. Die Interaktion zwischen *SpDltA* und *SpDltC* resultierte in einem Sedimentationskoeffizienten von 4,09 S. Dies entspricht einer Erhöhung des Sedimentationskoeffizienten im Vergleich zu *SpDltA* (3,69 S). Der weitere, flachere Peak bei 1,22 S (Abb. 3.3(c)) kann auf das überschüssige *SpDltC* zurückgeführt werden.

Tab. 3.2: Sedimentationskoeffizienten der Interaktionsstudien. (*) Aufgrund der Unterschiede in der Molekülmasse ist die Aussagekraft bezüglich des Sedimentationskoeffizienten von *SpDltC* mit Vorsicht zu betrachten.

Protein	Sedimentationskoeffizienten [S]
<i>SpDltA</i> (57,8 kDa)	3,69
<i>SpDltC</i> (9,7 kDa)	1,22*
<i>SpDltA/SpDltC</i>	4,14 + 1,22

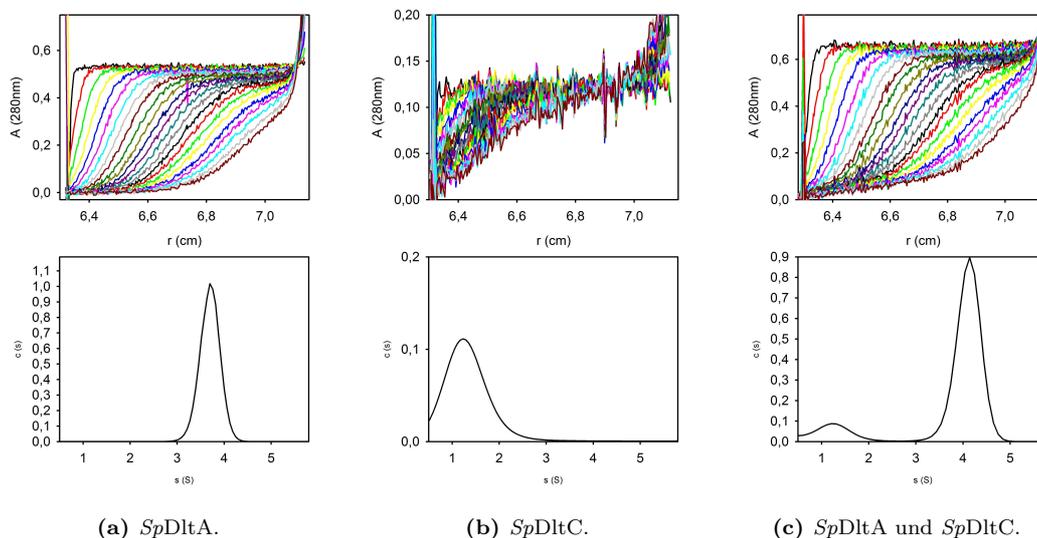


Abb. 3.3: Analytische Ultrazentrifugation der Interaktionsversuche von (a) *SpDltA* (10,1 μ M) (b) *SpDltC* (19,7 μ M), (c) *SpDltA* (10,1 μ M) und *SpDltC* (19,7 μ M).

3.1.3 Strukturuntersuchungen an *SpDltA*

Kristallisation

SpDltA kristallisierte in mehreren Bedingungen, die zumeist PEG-Komponenten enthielten. Zur Verfeinerung der Kristallisationsbedingung wurde die Bedingung mit 0,2 M Magnesiumacetat; 20 %_(w/v), PEG 8.000 und 0,1 M Natriumcacodylat (pH 6,5) gewählt (Hampton Research HR2-110) (Abb. 3.4(a)). Für *SpDltA* wurde diese Bedingung sowohl ligandenfrei als auch mit Ligand separat verfeinert.

Neben der Anpassung der Konzentration von PEG 8.000 wurde Natriumcacodylat durch Bis-Tris ersetzt und im pH-Bereich von 6,3 bis 6,9 getestet. Die Kristallisation erfolgte bei 12 °C im *hanging drop* Verfahren mit einem Verhältnis von 2 µL : 2 µL. Die Kristallisation von *SpDltA* ohne Ligand erfolgte in Form von Plättchen (Abb. 3.4(a), 3.4(b)). Jedoch war es möglich, die über Nacht gewachsenen Platten vor der Messung voneinander zu trennen und somit Einzelkristalle zu messen. Wurde dem Kristallisationspuffer AMP, ATP bzw. AMPCPP zugesetzt, kristallisierte *SpDltA* in Form von Prismen innerhalb von drei Tagen (Abb. 3.4(c), 3.4(d)). Der Kryoschutz erfolgte durch kurze Inkubation der Kristalle in Puffer, bestehend aus dem Kristallisationspuffer mit zusätzlich 20 %_(w/v) Ethylenglykol (*SpDltA* ohne Ligand bzw. mit AMP) oder 10 %_(w/v) PEG 400 (Kristallisation mit ATP bzw. mit AMPCPP). Die Kristalle von *SpDltA* mit AMPCPP, einem nicht hydrolysierbaren ATP-Analogon, zeigten ähnliche Kristallformen wie *SpDltA* mit ATP.

Proteinpuffer:	25 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 8,0 bei 8 °C sowie t.w. 4,4 mM AMP oder ATP oder AMPCPP; 4,4 mM MgCl ₂ ; 4,4 mM D-Alanin
Proteinkonzentration:	19,8 mg/mL (ohne Ligand) 20 mg/mL (AMP/ATP/AMPCPP)
Kristallisationslösung:	0,2 M Mg-Acetat sowie 0,1 M Bis-Tris pH 6,5; 15 % PEG 8.000 (ohne Ligand) 0,1 M Bis-Tris pH 6,3; 15 % PEG 8.000 (AMP) 0,1 M Bis-Tris pH 6,9; 17 % PEG 8.000 (ATP) 0,1 M Bis-Tris pH 6,5; 16 % PEG 8.000 (AMPCPP)

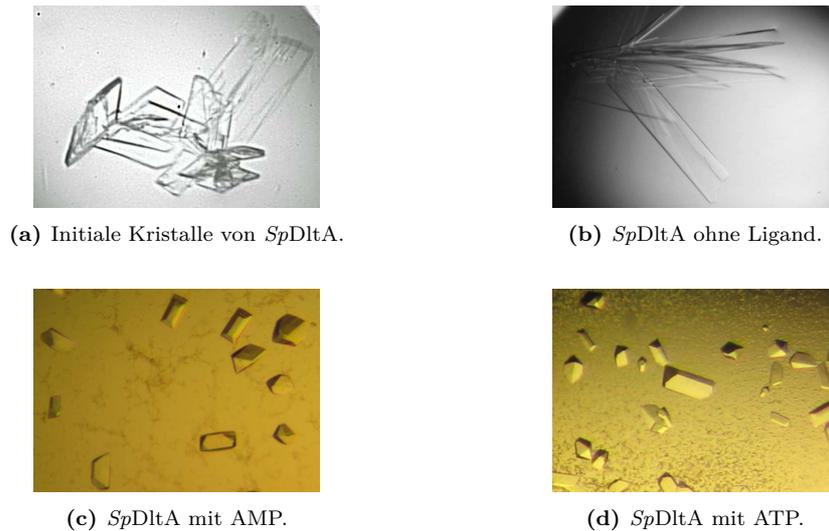


Abb. 3.4: *SpDltA*-Kristalle. (a) Initiale Kristalle von *SpDltA* ohne Ligand. (b) *SpDltA* ohne Ligand (Kristalllänge ca. 400 μm). (c) *SpDltA* mit AMP, MgCl_2 und D-Alanin (Kristalllänge ca. 200 μm). (d) *SpDltA* mit ATP, MgCl_2 und D-Alanin (Kristalllänge ca. 200 μm).

Röntgendiffraktion und Auswertung

Zur Feststellung adäquat streuender Kristalle erfolgten Testmessungen mit Hilfe des Micromax 007 Röntgengenerators (Rigaku), dem CCD-Detektor Saturn 944+ (Rigaku) sowie dem Kryosystem X-stream 2000 (Rigaku) innerhalb der Arbeitsgruppe. Anschließend wurden finale Messungen an der Beamline 14.1 am BESSY II, Helmholtz-Zentrum Berlin [Müller *et al.*, 2012] (*SpDltA* sowie *SpDltA* mit AMP) bzw. am Diamond Light Source (Oxfordshire, England) (*SpDltA* mit ATP) durchgeführt. Alle Datensätze wurden mit *XDS* prozessiert [Kabsch, 2010].

SpDltA kristallisierte in der monoklinen Raumgruppe $P2_1$ und streute bis 1,8 Å, während die Kristalle mit AMP und ATP in der orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$ kristallisierten und bis 2,0 Å bzw. 2,1 Å streuten (Tab. 3.3). Das Phasenproblem wurde durch *molecular replacement* mit Phenix Phaser [McCoy *et al.*, 2007] gelöst. Für die ligandenfreie und die AMP-enthaltende Struktur erfolgte eine Einzelsuche nach der großen Domäne (AS 1 bis 395) und der kleinen Domäne (AS 396 bis 511) von DltA aus *B. subtilis* (pdb-Code 3e7w). Die Lösung der Kristallisation mit AMP wurde zur Phasierung der mit ATP kristallisierten Struktur genutzt.

Der Datensatz von *SpDltA* mit AMPCPP wurde unter anderem in der Raumgruppe $P3$ prozessiert. Das Phasenproblem sollte durch *molecular replacement* mit Phenix Phaser [McCoy *et al.*, 2007] gelöst werden. Dabei wurde sowohl nach dem Gesamtmolekül von *SpDltA* ohne Ligand als auch nach dem Gesamtmolekül von *SpDltA* mit AMP gesucht. Des Weiteren erfolgte die Einzelsuche nach der großen Domäne (AS 1 bis 395) und der kleinen Domäne (AS 396 bis 511). Das *molecular replacement* war dabei nicht erfolgreich. Die Einzelsuche konnte lediglich vier große Domänen und zwei kleine Domänen der Elektronendichte zuordnen. Ein manueller

Tab. 3.3: Zellparameter und Statistik zur Datensammlung von *SpDltA*. Die Werte in den Klammern entsprechen den Werten für die Schale mit der höchsten Auflösung.

Parameter	<i>SpDltA</i>	AMP	ATP	AMPCPP
Messstation	Bessy 14.2	Bessy 14.2	Diamond Light Source	<i>in house</i>
Wellenlänge	0,9184 Å	0,9184 Å	0,9184 Å	1,54187 Å
Raumgruppe	P2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P3
Zelldimensionen				
a	59,25 Å	109,76 Å	102,28 Å	115,510 Å
b	89,26 Å	115,30 Å	115,95 Å	115,508 Å
c	104,35 Å	191,28 Å	188,95 Å	136,364 Å
α	90°	90°	90°	90°
β	96,81°	90°	90°	90°
γ	90°	90°	90°	120°
Auflösung	1,8 Å	2,0 Å	2,1 Å	2,6 Å
Beobachtete	505.196	1.292.222	1.775.916	434.784
Reflexe	(80.969)	(197.016)	(285.162)	(72.439)
Unabhängige	192.218	316.404	253.590	124.167
Reflexe	(30.802)	(50.869)	(40.935)	(20.209)
Vollständigkeit [%]	97,7 (96,7)	99,8 (99,3)	99,9 (99,7)	99,1 (99,8)
Redundanz	2,6	4,1	7,0	3,5
$I/\sigma I$	7,77 (1,12)	12,01 (1,05)	5,38 (0,84)	5,99 (1,06)
CC 1/2	99,6 (43,7)	99,8 (39,5)	99,1 (31,9)	98,8 (45,1)

Einbau der fehlenden kleinen Domänen war aufgrund fehlender eindeutiger Elektronendichte nicht möglich.

Mit Hilfe eines iterativen Verfahrens bestehend aus Phenix-Refine [Afonine *et al.*, 2012; Adams *et al.*, 2010], sowie einer manuellen Anpassung aufgrund der F_o-F_c und der $2F_o-F_c$ Elektronendichte in *Coot* [Emsley *et al.*, 2010] konnten die anderen drei Strukturen verfeinert und vervollständigt werden. Die Evaluation der Struktur erfolgte mit MolProbity [Chen *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2007] als Teil des Phenix-Refine Ablaufs (Tab. 3.4).

Die Struktur von *SpDltA* ohne Ligand konnte bei einer Auflösung von 1,8 Å bis zu einem R_{work} von 0,1771 und einem R_{free} von 0,2177 verfeinert werden (Tab. 3.4). In der asymmetrischen Einheit sind zwei Proteinmoleküle, drei Ethylenglykollmoleküle und 726 Wassermoleküle vorhanden.

Tab. 3.4: Ergebnisse der Verfeinerung der Strukturen von *SpDltA*. Die dargestellten Werte sind Teil der Ergebnisse von MolProbity. * EG = Ethylenglykol; ** Die Peptidbindungswinkel von Glutamin-193 entsprechen nicht den erlaubten/bevorzugten Werten (Ramachandran *outlier*). Der Rest ist in der Elektronendichte gut definiert und liegt N-terminal zu einem Prolin.

Verfeinerung/Validierung	ohne Ligand	mit AMP	mit ATP
R_{work}	0,1771	0,1844	0,1955
R_{free}	0,2177	0,2241	0,2497
Proteinatome	7916	16241	15977
Liganden	-	4 AMP	4 ATP
Puffermoleküle	3 EG*	3 EG*	-
Wassermoleküle	726	1194	1429
<i>Ramachandran outliers</i>	0 %	0,05 %**	0 %
<i>Ramachandran allowed</i>	1,20 %	1,75 %	2,84 %
<i>Ramachandran favoured</i>	98,80 %	98,20 %	97,16 %
<i>r.m.s.d. Winkel</i>	0,793 °	0,869 °	0,826 °
<i>r.m.s.d. Bindung</i>	0,007 Å	0,008 Å	0,007 Å
<i>average B-factor</i>			
Protein	28,47	38,77	35,59
Wasser	34,51	41,48	37,91
Ligand	-	32,77	-
Sonstiges	32,63	47,20	-

Die Struktur von *SpDltA* mit AMP konnte bei einer Auflösung von 2,0 Å bis zu einem R_{work} von 0,1844 und einem R_{free} von 0,2241 verfeinert werden (Tab. 3.4). Die Lösung der Struktur liefert in der asymmetrischen Einheit vier Proteinmoleküle, drei Ethylenglykolmoleküle, vier AMP-Moleküle und 1194 Wassermoleküle. Neben der Kristallisation von *SpDltA* mit AMP wurde das Protein auch mit ATP, D-Alanin und Magnesiumchlorid kristallisiert. Die so gewonnenen Kristalle zeigten sehr ähnliche Parameter auf. In der Elektronendichte lässt sich neben dem Protein und Wasser nur AMP auffinden (Abb. 3.5). Die positive F_oF_c -Elektronendichte in der Nähe des Phosphatrestes von AMP ist nicht ausreichend, um von ATP oder einem D-Alaninadenylat auszugehen. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass nur AMP in der Bindetasche gebunden ist. Des Weiteren sind im Proteinmolekül C weite Bereiche in der kleinen Domäne nicht zu erkennen, unter anderem Bereiche des C-Terminus (Tab. 3.5). Aufgrund der schlechteren Auflösung, der gleichen Konformation (Transferkonformation) und der weiten Bereiche, die nicht aufgelöst sind, wird nur auf die Struktur des Kristalls mit AMP detaillierter eingegangen.

Tab. 3.5: Ergebnisse der Verfeinerung der Struktur von *SpDltA* mit ATP.

Molekül	fehlende Aminosäuren
A	1, 502, 516
B	1, 500-502, 516
C	456-466, 492-495, 499-506, 514-516
D	501-503, 516

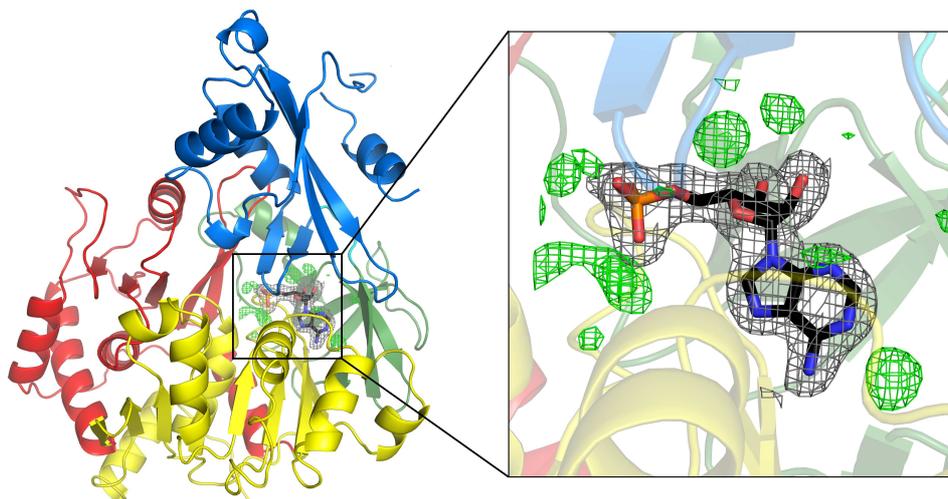


Abb. 3.5: *cartoon*-Darstellung von *SpDltA* kristallisiert mit ATP. Gezeigt sind die $2F_o-F_c$ -Elektronendichte (grau; σ -Level 1,0) sowie die positive F_o-F_c -Elektronendichte (grün, σ -Level 3,0) im Abstand von 6 Å bei einer Auflösung von 2,1 Å (Monomer A).

SpDltA ohne Ligand

Für beide Proteinmoleküle ist die Elektronendichte über nahezu alle Reste definiert. In Monomer A fehlen die zwei *loop*-Bereiche von Serin-157 bis Glycin-161 und von Prolin-500 bis Glycin-502. In Monomer B sind Methionin-1, der *loop* Glycin-158 bis Threonin-160, der *loop* Leucin-498 bis Isoleucin-504 und die C-terminalen Reste Lysin-515 und Arginin-516 nicht sichtbar. Für solventexponierte, lange Seitenketten, die nicht in der Elektronendichte definiert waren, wurden jeweils die häufigsten Rotamere eingebaut und mit dem Besetzungsgrad null belegt.

SpDltA lässt sich in eine große Domäne (Aminosäuren 1 bis 403), eine *linker*-Region (Aminosäuren 404 bis 407) und eine kleine Domäne (408 bis 516, blau) einteilen (Abb. 3.6). Analog zu DltA aus *B. subtilis* (*BsDltA*) und *B. cereus* (*BcDltA*) lässt sich die große Domäne wiederum in drei Subdomänen (A, B, C) einteilen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, enthalten die Subdomänen A (rot) und B (gelb) ein zentrales β -Faltblatt mit umgebenden α -Helices, während die Subdomäne C einem verzerrten β -Fass (grün) entspricht. Die Farbgebung ist an die vorherige Publikation der Arbeitsgruppe angelehnt [Yonus *et al.*, 2008] und wurde auf beide Moleküle der Elementarzelle in verschiedenen Farbtintensitäten angewandt (Abb. 3.6(a), (b)).

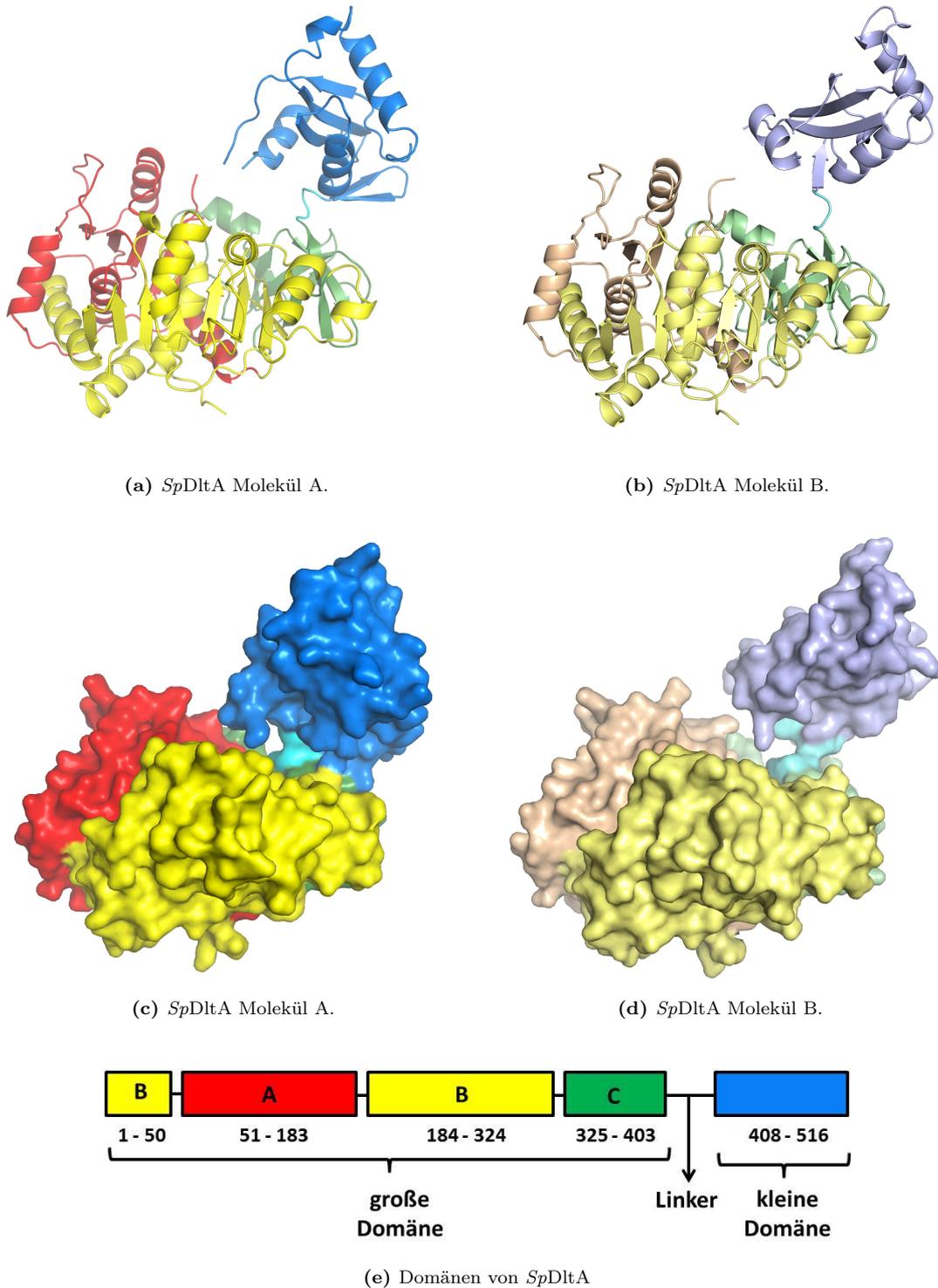


Abb. 3.6: Struktur von *SpDltA* ohne Ligand. Die kleine Domäne ist in blau, der *linker* in cyan, die große Domäne in rot (Subdomäne A), gelb (Subdomäne B) und grün (Subdomäne C) dargestellt. (a) *cartoon*-Darstellung von Proteinmolekül A der Elementarzelle. (b) *cartoon*-Darstellung von Proteinmolekül B der Elementarzelle. (c) Oberflächendarstellung der Proteinmolekül A. (d) Oberflächendarstellung der Proteinmolekül B. (e) Schematische Darstellung der Domänenorganisation in *DltA* mit Angabe der Aminosäurezuordnung für *SpDltA*.

Die Struktur weist Unterschiede zwischen den einzelnen Monomeren sowie zu zuvor beschriebenen DltA-Strukturen auf. So weicht die Position und Orientierung der kleinen Domäne zur großen Domäne von bisherigen Strukturen ab. Dabei existieren in beiden Monomeren keine große Interaktionsfläche zwischen der kleinen und großen Domäne, wie sie in bereits beschriebenen Strukturen gezeigt werden konnten. Stattdessen interagiert nur ein kleiner Bereich der kleinen Domäne mit der großen Domäne (Abb. 3.6(c) und Abb. 3.6(d)). Diese Interaktionsfläche entspricht in Molekül A $325,5 \text{ \AA}^2$ während sie in Molekül B nur $227,0 \text{ \AA}^2$ beträgt (Berechnung mit PDBePISA [Krissinel und Henrick, 2007]). Somit spiegelt sich auch in der Interaktionsfläche die Tatsache wider, dass die kleinen Domänen in den beiden Molekülen unterschiedlich orientiert sind.

Die Überlagerung beider Moleküle der Elementarzelle zeigt deutlich die unterschiedliche Position der kleinen Domäne in Relation zu der großen Domäne sowie die Drehung der kleinen Domäne (Abb. 3.7(a)). Die nähere Analyse der beiden Domänen für sich offenbart, dass die großen Domänen (AS 1-403) mit einem *r.m.s.d.*-Wert von $0,47 \text{ \AA}$ über 397 Aminosäuren gut überlagern (Abb. 3.7(b)). Geringfügige Unterschiede sind vor allem in *loop*-Bereichen vorhanden. Die Überlagerung der kleinen Domänen weist mit einem *r.m.s.d.*-Wert von $0,95 \text{ \AA}$ über 98 Aminosäuren höhere Abweichungen auf. Diese lassen sich vor allem in den ersten zwei β -Strängen und dem verbindenden *loop* erkennen (Abb. 3.7(c), Pfeil).

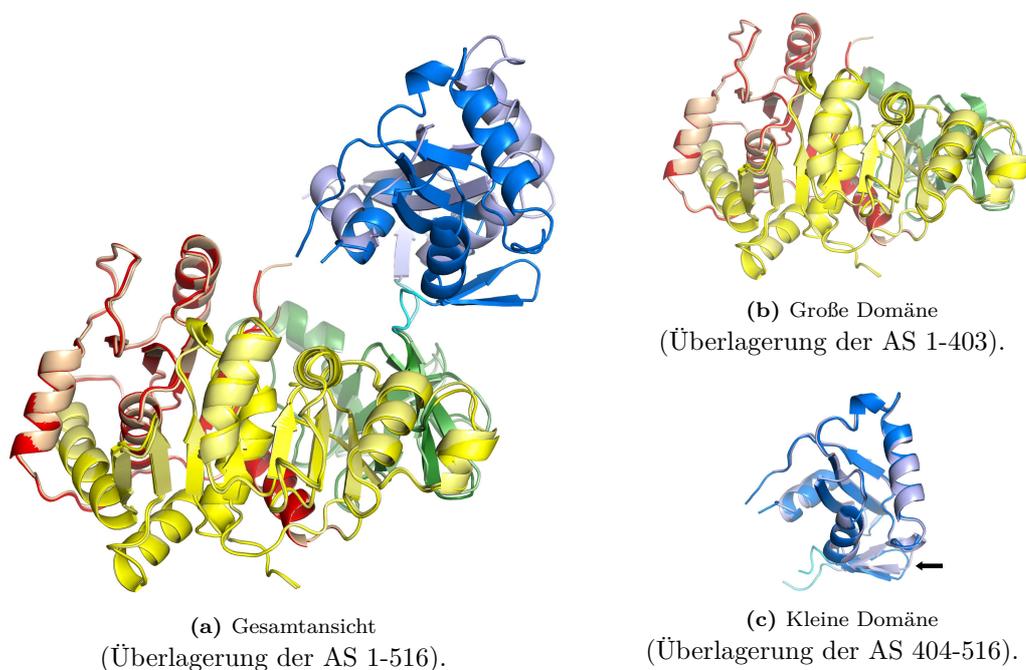


Abb. 3.7: Überlagerung der Proteinmoleküle. Die Überlagerung der Proteine erfolgte mittels *super*-Befehl in Pymol. (a) Überlagerung der beiden Proteinmoleküle der Einheitszelle. (b) Überlagerung der großen Domänen (AS 1-403). (c) Überlagerung der kleinen Domänen (AS 404-516).

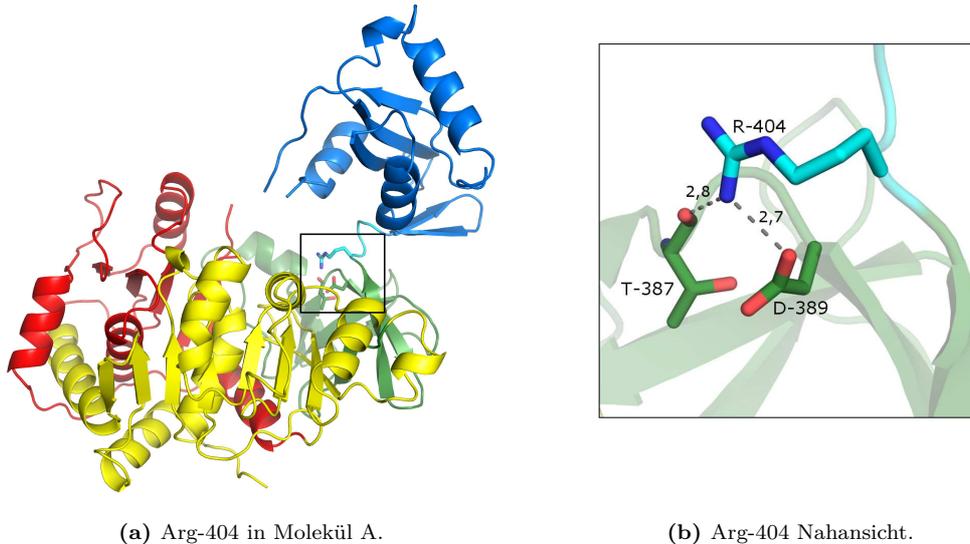
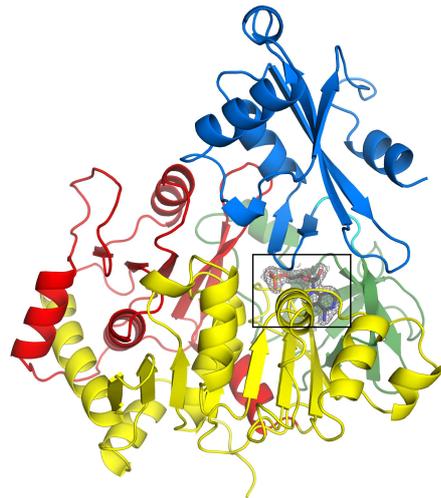


Abb. 3.8: Orientierung von Arginin-404 in Molekül A. Die Fixierung von Arginin-404 ist in Molekül A und Molekül B von *SpDltA* gleich. **(a)** Position von Arginin-404 in Proteinmolekül A. **(b)** Nahansicht der Interaktionen von Arginin-404 mit Threonin-387 und Aspartat-389 aus der großen Domäne.

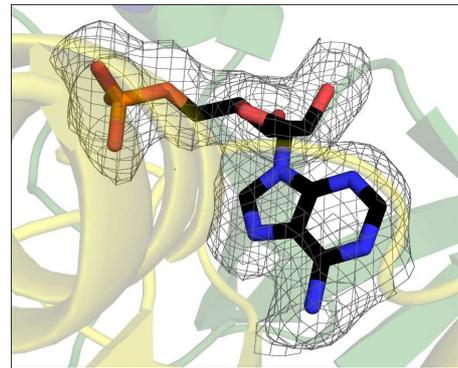
Neben der Orientierung der kleinen Domäne ist für die Bindung der Substrate auch die Konformation des *p-loops*, ein bei Adenylierungsproteinen stark konservierter Bereich, wichtig. Der *p-loop* von *SpDltA* befindet sich im Bereich der Aminosäuren Threonin-156 bis Lysin-164, der in der ligandenfreien Struktur nur zum Teil sichtbar ist. Die *p-loop*-Konformation ist häufig erst bei Bindung der Substrate in der Kristallstruktur sichtbar [Conti *et al.*, 1996, 1997].

Des Weiteren wird der Position von Arginin-404 in der *linker*-Region eine Bedeutung in der Konformationsänderung zugeschrieben. Diese Vermutung beruht auf der Position des homologen Restes von Luciferase, das als Modell der offenen Konformation genutzt wird [Conti *et al.*, 1996; Yonus *et al.*, 2008]. In der ligandenfreien Struktur von *SpDltA* ist dieser Rest gut definiert und durch Wechselwirkungen mit zwei Resten in seiner Position fixiert (Abb. 3.8). In beiden Molekülen wird eine Wasserstoffbrückenbindung zu der Carboxylgruppe von Aspartat-389 sowie zu dem Carbonylsauerstoff von Threonin-387 ausgebildet, die beide Teil der großen Domäne sind.

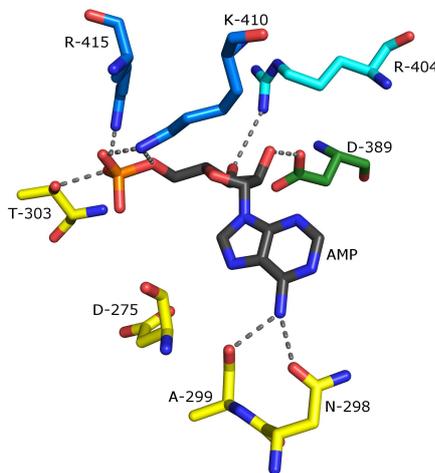
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in der hier gezeigten Kristallform zwei Moleküle von *SpDltA* in der asymmetrischen Einheit vorliegen. Diese zwei Moleküle zeigen beide keine Elektronendichte im Bereich des *p-loops*, der an der ATP-Bindung beteiligt ist. Des Weiteren unterscheiden sich die beiden Monomere sowohl untereinander als auch von anderen bekannten DltA-Strukturen bezüglich der Orientierung der kleinen zur großen Domäne sowie der Drehung der kleinen Domäne. Beide Monomere zeigen eine offene Konformation, die sich auch in den relativ geringen Interaktionsflächen widerspiegelt.



(a) Position von AMP in *SpDltA* (Transferkonformation).



(b) $2F_o-F_c$ -Elektronendichte von AMP in *SpDltA* (σ -Level 1,0).



(c) Position von AMP in *SpDltA*.

Phosphat	zu	T-303	2,6 Å
Phosphat	zu	T-303	3,0 Å
Phosphat	zu	R-415	2,9 Å
Phosphat	zu	K-410	2,9 Å
Ribose	zu	D-389	2,1 Å
Ribose	zu	R-404	3,5 Å
Base	zu	N-298	3,1 Å
Base	zu	A-299	2,0 Å

(d) Distanzen zu AMP.

Abb. 3.10: Die Bindetasche von AMP. Aspartat-275 ist in *SpDltA* nicht an der Bindung der AMP-Einheit beteiligt, könnte aber für die Substratspezifität mitverantwortlich sein. (a) Position von AMP in Proteinmolekül A. (b) $2F_o-F_c$ -Elektronendichte des AMP bei einer Auflösung von 2,0 Å mit einer Konturierung von 1,0 σ im Bereich von 1,8 Å. (c) Mögliche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäuren der Bindetasche von AMP (grau). (d) Abstände zwischen AMP und den Aminosäuren der AMP-Bindetasche.

Die Wasserstoffbrückenbindungen erfolgen hierbei sowohl mit Seitenkettenatomen als auch mit Atomen der Hauptkette. Zusätzlich wird die Base über hydrophobe Seitenketten von Tyrosin-300 und Isoleucin-327 positioniert. Dieses Bindungsmuster entspricht großteils den bereits beschriebenen Interaktionen für *BsDltA* und *BcDltA* [Yonus *et al.*, 2008; Yonus, 2015; Du *et al.*, 2008]. In *BsDltA* wird die Spezifität für D-Alanin durch Cystein-268 bestimmt. In Streptokokken ist diese Position durch einen Aspartatrest besetzt (Aspartat-275, Abb. 3.10(c)).

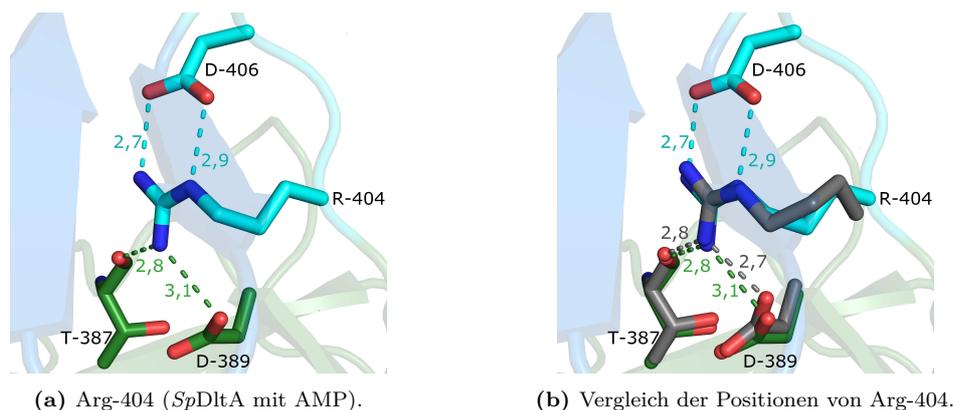


Abb. 3.11: Orientierung von Arginin-404. (a) Position von Arginin-404 in Proteinmolekül A der AMP-gebundenen Form von *SpDltA*. (b) Vergleich der Position von Arginin-404 in der ligandenfreien (grau) und der AMP-gebundenen Form (farbig).

Die Position von Arginin-404 zeigt zusätzlich zu den in der ligandenfreien Struktur beschriebenen Wechselwirkungen zwei weitere Wasserstoffbrückenbindungen. Diese werden zwischen den Seitenketten von Aspartat-406 und Arginin-404 ausgebildet und werden erst durch die Domänenwanderung ermöglicht (Abb. 3.11(b)).

Der in der ligandenfreien Struktur nicht definierte *p-loop* ist in der AMP-gebundenen Struktur sichtbar. Er wird durch Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des *p-loops* sowie durch Interaktionen mit der großen und kleinen Domäne stabilisiert (Abb. 3.12 und Tab. 3.6). Ein Großteil der Wechselwirkungen findet innerhalb des *p-loops* statt. Neben den für ein β -Faltblatt typischen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Threonin-156 und Lysin-164, die den Anfang sowie das Ende des *p-loops* darstellen, werden zwei weitere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Haupt- und Seitenkettenatomen ausgebildet (Threonin-156/Serin-157 bzw. Serin-157/Lysin-164). Nur zwei der neun Reste des *p-loops* bilden Wasserstoffbrückenbindungen zu Resten außerhalb dieses Strukturelements aus. Hierzu zählt Serin-157, das je eine Wasserstoffbrückenbindung zu Glutamat-417 und Aspartat-420 ausbilden kann. Diese beiden Interaktionspartner befinden sich in der kleinen Domäne. Des Weiteren bildet die Carbonylgruppe von Threonin-159 eine Wasserstoffbrückenbindung zum Amid der Seitenkette von Glutamin-423 aus. Die Seitenkette von Threonin-159 bildet die einzige Wasserstoffbrückenbindung des *p-loops* zur großen Domäne, zur Amino-Gruppe von Lysin-371.

Bezüglich der Struktur von *SpDltA* mit AMP lässt sich zusammenfassend sagen, dass jeweils ein AMP-Molekül pro Proteinmolekül zwischen der großen und kleinen Domäne gebunden ist und Wasserstoffbrückenbindungen mit beiden Domänen ausgebildet werden. Im Gegensatz zu der ligandenfreien Struktur ist nach der Bindung von AMP der sogenannte *p-loop* strukturiert und tritt in Wechselwirkung mit beiden Domänen, jedoch vorrangig mit der kleinen Domäne. Die Position von Arginin-404 ist mit der Position im ligandenfreien Kristall vergleichbar.

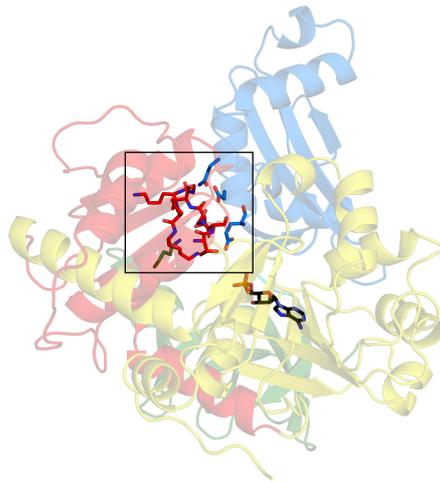
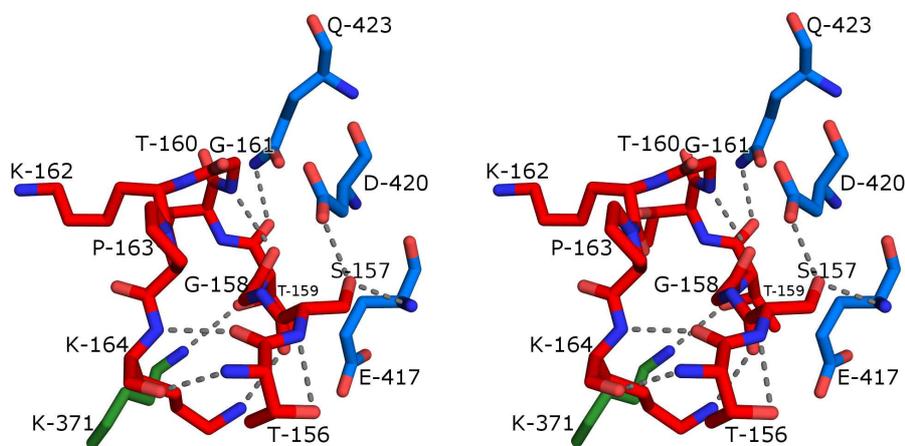
(a) *p-loop* von *SpDltA*.(b) Nahansicht des *p-loops*.

Abb. 3.12: Stereodarstellung des *p-loops* (AMP-gebundene Struktur). Zur besseren Erkennung der *p-loop* Struktur wurde das Molekül gedreht (x-Achse -30° ; y-Achse 55° aus der Ausgangsposition (Abb. 3.9)). (a) Gesamtansicht von *SpDltA* nach der angegebenen Drehung. (b) Nahansicht des *p-loops* mit den Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des *p-loops* als auch mit Resten außerhalb des *p-loops*.

Tab. 3.6: Wasserstoffbrückenbindungen des *p-loops*. Die genannten Reste sind auch in Abb. 3.12 zu erkennen.

<i>p-loop</i>	Abstand [\AA]	Interaktion	
Thr-156 ($\text{O}\gamma_1$)	2,9	Ser-157 (N)	} <i>p-loop</i>
Thr-156 (N)	2,9	Lys-164 (O)	
Thr-156 (O)	3,0	Lys-164 (N)	
Ser-157 (O)	3,1	Lys-164 ($\text{N}\zeta$)	
Ser-157 ($\text{O}\gamma$)	3,1	Glu-417 (N)	} kleine Domäne
Ser-157 ($\text{O}\gamma$)	2,7	Asp-420 ($\text{O}\delta_2$)	
Thr-159 (O)	2,8	Gln-423 ($\text{N}\epsilon_3$)	} große Domäne
Thr-159 ($\text{O}\gamma_1$)	3,1	Lys-371 ($\text{N}\zeta$)	

Vergleich der Strukturen

Der Vergleich der ligandenfreien Struktur mit der von *SpDltA* mit AMP zeigt deutlich die unterschiedliche Position der kleinen Domäne (Abb. 3.13). Wie bereits erwähnt, nimmt die kleine Domäne in der ligandenfreien Struktur zwei Konformationen ein, die sich beide als offene Konformation beschreiben lassen. Im Gegensatz dazu ist die kleine Domäne in der AMP-gebundenen Form zur großen Domäne hingewandt und entspricht der zuvor beschriebenen Transferkonformation [Yonus *et al.*, 2008].

Die Überlagerung der großen Domänen von *SpDltA* ohne Ligand sowie mit AMP (Abb. 3.14(a)) zeigt neben Unterschieden in den *loop*-Bereichen eine Positionsveränderung in Helix 9 (AS 230 bis 239). Im Allgemeinen ergibt sich für die großen Domänen ein *r.m.s.d.*-Wert von 0,78 Å über 394 Aminosäuren. Die Überlagerung der großen Domäne von Molekül B der ligandenfreien Struktur und von Molekül A der AMP-gebundenen Struktur weist ähnliche Abweichungen auf. Ein Grund für die unterschiedliche Anordnung mit und ohne AMP lässt sich mit den vorhandenen Daten nicht ausmachen. Die Helix ist aber nicht an der Interaktion mit DltC, weder im produktiven noch im nichtproduktiven Zustand, beteiligt.

Die Überlagerung der kleinen Domänen (Abb. 3.14(b)) zeigt in den beiden N-terminalen Strängen sowie der C-terminalen Helix Unterschiede. Dieser Bereich ist auch im Vergleich der Monomere der ligandenfreien Struktur unterschiedlich ausgebildet und scheint allgemein flexibler zu sein. Die Überlagerung der Monomere A zeigt mit einem *r.m.s.d.*-Wert von 1,03 Å über 107 Aminosäuren eine größere Abweichung als die Überlagerung der Proteinmolekül B der ligandenfreien Struktur mit Molekül A der AMP-gebundenen Struktur mit einem *r.m.s.d.*-Wert von 0.65 Å über 98 Aminosäuren.

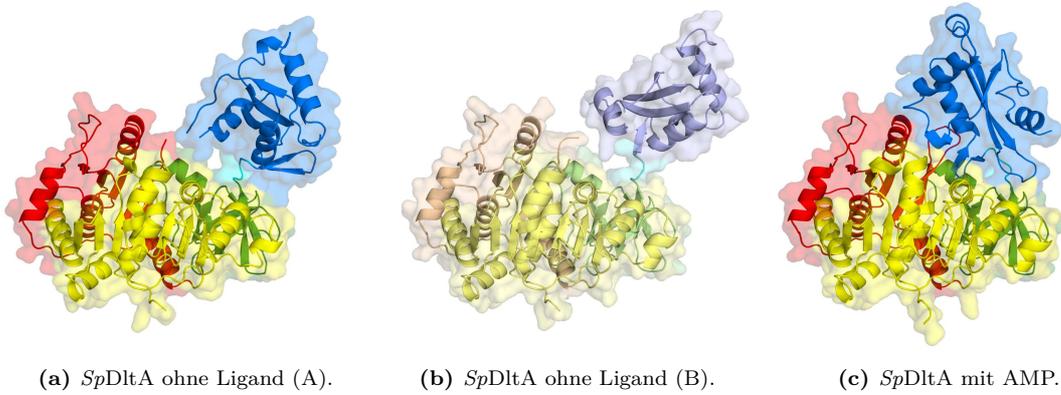


Abb. 3.13: cartoon-Darstellung von *SpDltA*. (a) Strukturübersicht über *SpDltA* ohne Ligand (Molekül A). (b) Strukturübersicht über *SpDltA* ohne Ligand (Molekül B). (c) Strukturübersicht über *SpDltA* mit AMP (Molekül A).

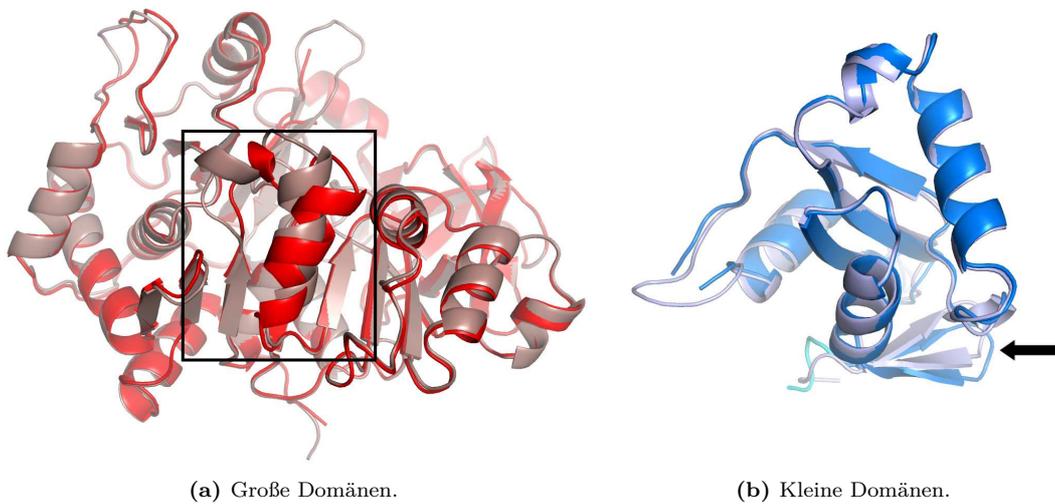


Abb. 3.14: Überlagerung der Domänen in der ligandenfreien und AMP-gebundenen Form. Die Überlagerung der Domänen erfolgte einzeln und jeweils mit Molekül A der Kristallstruktur. (a) Überlagerung der großen Domänen (AS 1-403); *SpDltA* mit AMP (rotbraun) und *SpDltA* ohne AMP (rot). Insbesondere der mit dem Kasten markierte Bereich weicht in der AMP-gebundenen Struktur von der ligandenfreien Struktur ab. (b) Überlagerung der kleinen Domänen (AS 404-516); *SpDltA* mit AMP (hellblau) und *SpDltA* ohne AMP (dunkelblau). Der Ort der signifikantesten Abweichungen ist durch einen Pfeil hervorgehoben.

3.2 Diskussion zu *SpDltA*

In der hier dargestellten Arbeit konnte die Struktur von *SpDltA* in der ligandenfreien Struktur als auch die Struktur mit AMP bestimmt werden. Es zeigten sich zwei unterschiedliche Konformationen, die in den postulierten Reaktionsmechanismus als offene Konformation (ligandenfrei) beziehungsweise Transferkonformation (AMP) eingeordnet werden können. Im Folgenden sollen die neu erworbenen Erkenntnisse mit bisher publizierten Daten verglichen und eingeordnet werden.

3.2.1 Die offenen Konformationen

Die Annahme, dass DltA verschiedene Konformationen einnehmen kann, beruht auf bisherigen DltA-Strukturen sowie weiteren Strukturen adenylyt bildender Enzyme. Bisher konnten lediglich die Adenylylierungskonformation (z. B. pdb-Code 3dhv [Du *et al.*, 2008]) und die Transferkonformation (z. B. pdb-Code 3e7w [Yonus *et al.*, 2008]) für DltA beschrieben werden. Der dritte Zustand, die offene Konformation, beruht auf der bekannten Struktur von Leuchtkefer-Luciferase (pdb-Code 1ba3 [Conti *et al.*, 1996]). Diese katalysiert die Adenylylierung von D-Luciferin zu D-Luciferyladenylat, eine Reaktion die der Reaktion von DltA ähnelt [Du *et al.*, 2008; Yonus *et al.*, 2008]. Obwohl die Sequenzidentität lediglich 23% beträgt, sind die Faltungstypen gleich und die Strukturen der beiden Proteine sehr ähnlich. Des Weiteren existieren zwei Strukturen von DltA, die ohne Liganden kristallisiert wurden (pdb-Code 4pzp (*Bacillus cereus*; *BcDltA*) und pdb-Code 3l8c (*Streptococcus pyogenes*; *SpDltA*)). Hierbei zeigt *BcDltA* die Adenylylierungskonformation, wie sie von Du und Luo auch für die ATP sowie die D-Alaninadenylat-gebundene Struktur nachgewiesen werden konnte [Du und Luo, 2014]. Die Struktur von *S. pyogenes* DltA wurde im Rahmen eines *structural genomics*-Projektes gelöst. Sie ist jedoch nicht weiter beschrieben worden und soll daher analysiert werden. Zusammen mit der Analyse weiterer adenylyt bildender Enzyme in der offenen Konformation (Tab. 3.7) können somit bestehende Hypothesen zur offenen Konformation überprüft werden.

Der Vergleich der offenen Konformationen der Luciferase mit der in dieser Arbeit beschriebenen offenen Konformation von *SpDltA* zeigt, dass sich die großen Domänen gut aufeinander abbilden lassen. Hingegen weichen die Position sowie die Drehung der kleinen Domäne voneinander ab. Aus Übersichtsgründen sind daher nur die große Domäne von *SpDltA*, sowie die ersten Strukturelemente der kleinen Domäne als *cartoon* dargestellt, während der restliche Anteil der kleinen Domäne als *ribbon* dargestellt ist (Abb. 3.15). Wird davon ausgegangen, dass die kleine Domäne in der offenen Konformation fast frei drehbar ist und nur wenige Interaktionen mit der großen Domäne eingeht, so ist die unterschiedliche Ausrichtung der kleinen Domäne nicht unerwartet.

Tab. 3.7: Offene Konformationen adenylatbildender Enzyme.

Protein	pdb-Code
DltA (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	diese Arbeit (Monomer A)
DltA (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	diese Arbeit (Monomer B)
DltA (<i>Streptococcus pyogenes</i>)	3l8c (Monomer B)
Luciferase (<i>Photinus pyralis</i>)	1ba3
A-Domäne (NRPS) (<i>Epichloe festucae var. lolii</i>)	3ite (Monomer B)
Acyl-CoA-Synthase (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	3r44
Long chain fatty acyl-CoA-Synthase (<i>Thermus thermophilus</i>)	1ult (Monomer A) 1ult (Monomer B)

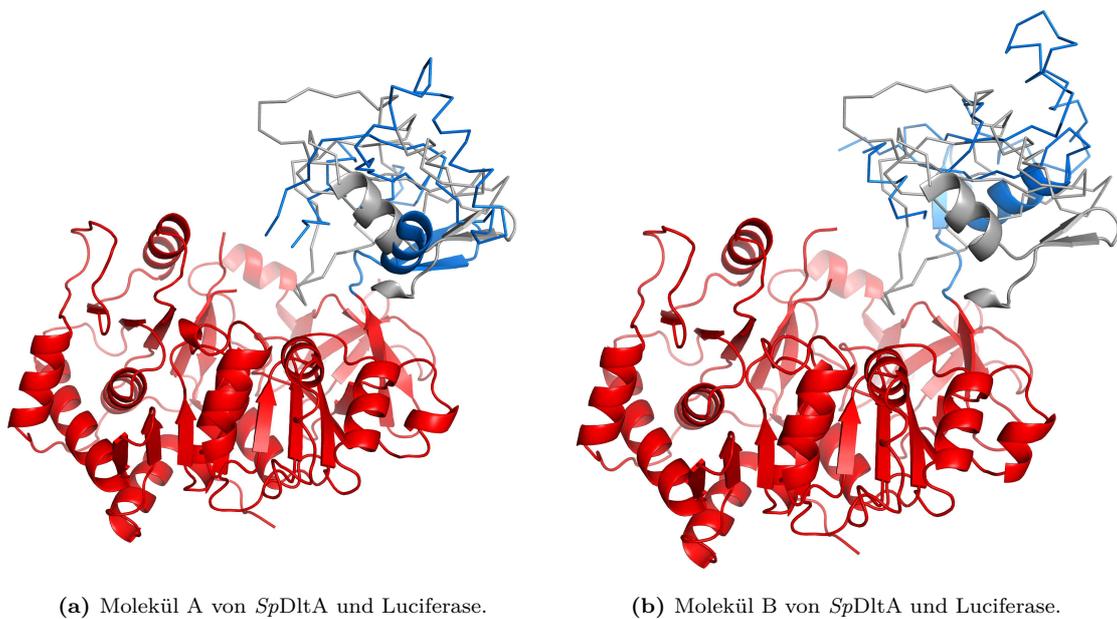


Abb. 3.15: Vergleich von *SpDltA* ohne Ligand mit Luciferase. Die Bilder wurden durch die Überlagerung der großen Domäne der Luciferase auf die große Domäne von *SpDltA* erzeugt. *SpDltA* ist in blau (kleine Domäne) sowie in rot (große Domäne) dargestellt während die kleine Domäne der Luciferase in grau dargestellt ist. Da die Position der kleinen Domäne verglichen werden soll, ist die große Domäne der Luciferase aus Übersichtsgründen nicht dargestellt. (a) Strukturvergleich von Monomer A (*S. pneumoniae*) mit Luciferase. (b) Strukturvergleich von Monomer B (*S. pneumoniae*) mit Luciferase.

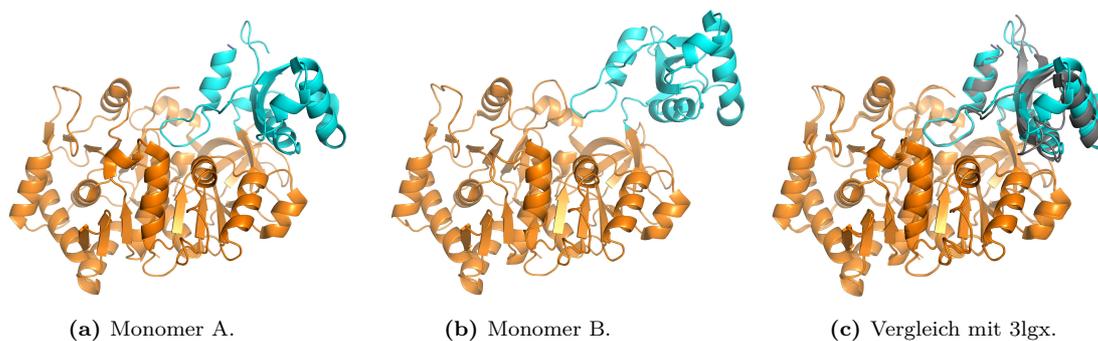


Abb. 3.16: Struktur von DltA aus *S. pyogenes*. Gezeigt sind die *cartoon*-Darstellungen der ligandenfreien Struktur von DltA aus *S. pyogenes* (pdb-Code 3l8c) sowie der ATP-gebundenen Struktur (pdb-Code 3lgx). Die große Domäne ist in orange und die kleine Domäne in cyan dargestellt. (a) Monomer A von *SpDltA* ohne Ligand. (b) Monomer B von *SpDltA* ohne Ligand. (c) Strukturvergleich von Monomer A von *SpDltA* ohne Liganden mit der Struktur von *SpDltA* mit ATP (grau; pdb-Code 3lgx; Adenylierungskonformation).

Neben der bisher vorgestellten offenen Konformation von *SpDltA* existiert eine Kristallstruktur ohne Ligand von DltA aus *S. pyogenes*, im Folgenden *SpDltA* genannt. In dieser Struktur sind zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit enthalten, die sich in der Position der kleinen Untereinheiten unterscheiden (Abb. 3.16(a), (b)). Auffällig ist, dass in Monomer A die kleine Domäne näher an der großen Domäne positioniert ist als in Monomer B. Auch die Interaktionsflächen unterscheiden sich mit $787,4 \text{ \AA}^2$ für Molekül A und $496,7 \text{ \AA}^2$ für Monomer B signifikant (Berechnung mit PDBePISA [Krissinel und Henrick, 2007]). Der Vergleich beider Monomere mit den Monomeren der Struktur von *SpDltA* mit ATP (pdb-Code 3lgx, Abb. 3.16(c)) beziehungsweise *BcDltA* (pdb-Code 4pzp, 3dhv, 3ffe, 3fcc) lässt darauf schließen, dass Monomer A die Adenylierungskonformation aufweist. Bis auf geringfügige Unterschiede in der kleinen Domäne sind die Orientierungen der Domänen gleich. Monomer B hingegen zeigt eine hiervon abweichende Konformation. Es stellt sich somit die Frage, ob die Konformation von Monomer B mit den offenen Konformationen von *SpDltA* vergleichbar ist. Die Überlagerung mit den Molekülen aus *SpDltA* zeigt, dass sich diese drei Moleküle in der Position und Drehung der kleinen Domäne unterscheiden (Abb. 3.17). Im Vergleich mit der Adenylierungskonformation wird ersichtlich, dass Molekül B der ligandenfreien Struktur einer dritten offenen Konformation entspricht. Die Interaktionsfläche von Molekül B ist mit $496,7 \text{ \AA}^2$ größer als die Interaktionsflächen von *SpDltA* ($325,5 \text{ \AA}^2$ in Molekül A und 227 \AA^2 in Molekül B), jedoch deutlich kleiner als in der Adenylierungskonformation ($787,4 \text{ \AA}^2$).

Während bisher beschriebene Strukturen von DltA ohne Liganden nicht in der offenen Konformation kristallisierten, konnten nun drei verschiedene offene Konformationen dargestellt werden. Diese zeigen unterschiedliche Positionen und Drehungen der kleinen Domäne auf und bestätigen die zuvor biochemisch festgestellte

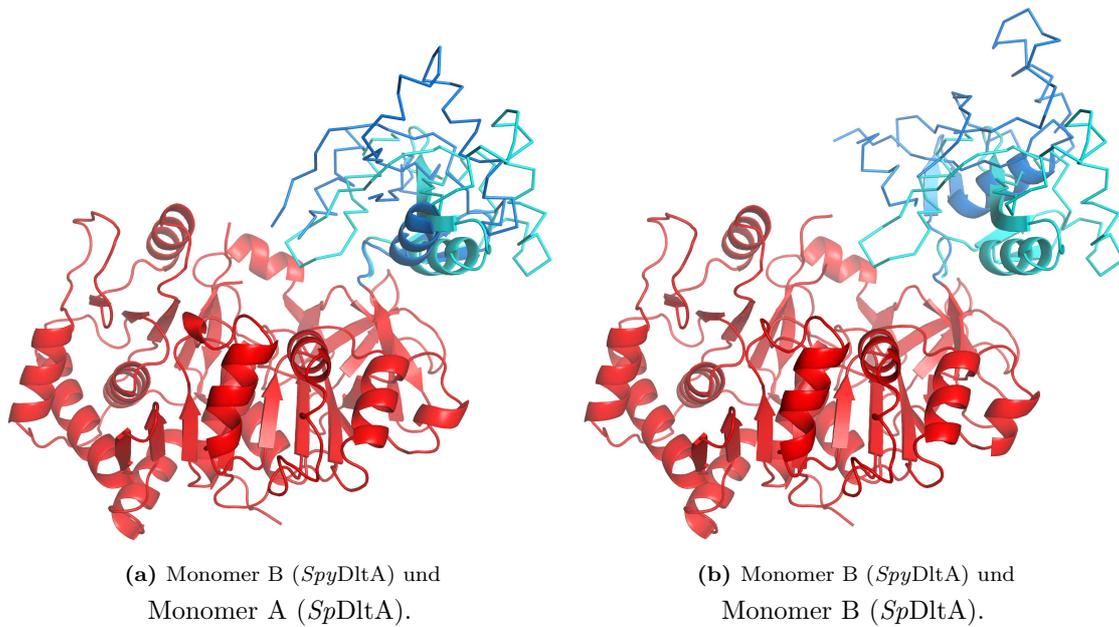


Abb. 3.17: Vergleich von *SpDltA* ohne Ligand mit DltA aus *S. pyogenes*. Die kleine Domäne von *SpDltA* ist in blau, die große Domäne in rot dargestellt. Aus Übersichtsgründen ist von der Struktur von *SpDltA* nur die kleine Domäne gezeigt. (a) Strukturvergleich von Monomer B (*S. pyogenes*) und Monomer A (*S. pneumoniae*). (b) Strukturvergleich von Monomer B (*S. pyogenes*) und Monomer B (*S. pneumoniae*).

Flexibilität in der Orientierung der kleinen Domäne [Pfennig, 2015]. Der Vergleich mit DltA-verwandten Proteinen zeigt zudem weitere offene Konformationen, die sich voneinander in der Position der kleinen Domäne unterscheiden (Abb. 3.18).

Nach der Aufklärung der Struktur von *BsDltA* und *BcDltA* wurden im Vergleich mit der bis dahin bekannten offenen Konformation der Luciferase drei Hypothesen zur offenen Konformation von DltA aufgestellt [Yonus *et al.*, 2008; Pfennig, 2015]. Eine erste Hypothese betrifft die unterschiedlichen Konformationen des *p-loops*. Dieser soll in der offenen Konformation der kleinen Domäne zugewandt sein, wie es für die Luciferase gezeigt wurde. Für *SpDltA* ohne Ligand ist der Bereich nicht vollständig in der Elektronendichte sichtbar. Auch in weiteren Strukturen, die eine offene Konformation ausbilden, ist dieser Bereich nur teilweise erkennbar. Lediglich für *SpDltA*, Luciferase sowie die Fettsäure-CoA-Synthase ist er über die gesamte Länge definiert. Hierbei treten unterschiedliche Konformationen auf. Unter anderem unterscheiden sich auch die Konformationen des *p-loops* in den beiden Monomeren der Fettsäure-CoA-Synthase. Es konnte bereits gezeigt werden, dass dieses Strukturmerkmal unterschiedliche Konformationen einnehmen kann und wahrscheinlich aus diesem Grund in mehreren Strukturen nicht sichtbar ist [Gulick, 2009]. Die Vermutung, dass der *p-loop* in der offenen Konformation der kleinen Domäne zugewandt ist, kann aufgrund der fehlenden Strukturierung des *p-loops* mit den dargestellten Daten nicht bestätigt werden.

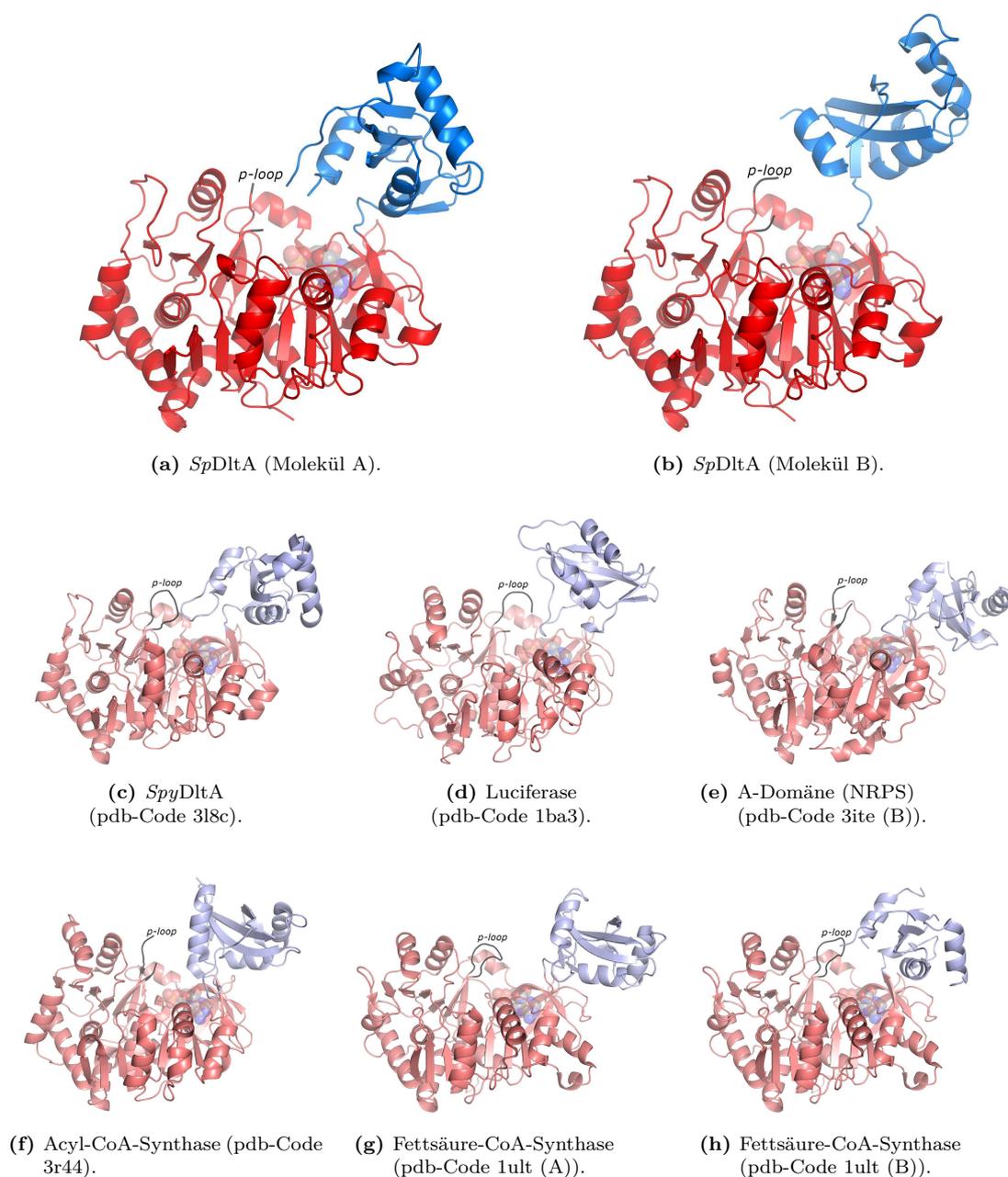


Abb. 3.18: Vergleich der offenen Konformationen. Die großen Domänen sind in Rottönen und die kleinen Domänen in Blautönen dargestellt. Des Weiteren ist der *p-loop*, sofern vorhanden, in grau dargestellt. Zur Visualisierung des aktiven Zentrums wurde AMP aus der Struktur von *SpDltA* mit AMP mit dargestellt. (a) Molekül A von *SpDltA* aus dieser Arbeit. (b) Molekül B von *SpDltA* aus dieser Arbeit. (c) Molekül B von *SpyDltA* (pdb-Code 3l8c). (d) Luciferase (pdb-Code 1ba3). (e) Molekül B der A-Domäne einer NRPS (pdb-Code 3ite). (f) Acyl-CoA-Synthase (pdb-Code 3r44). (g) Molekül A der *long chain fatty acyl-CoA-Synthase* (pdb-Code 1ult). (h) Molekül B der *long chain fatty acyl-CoA-Synthase* (pdb-Code 1ult).

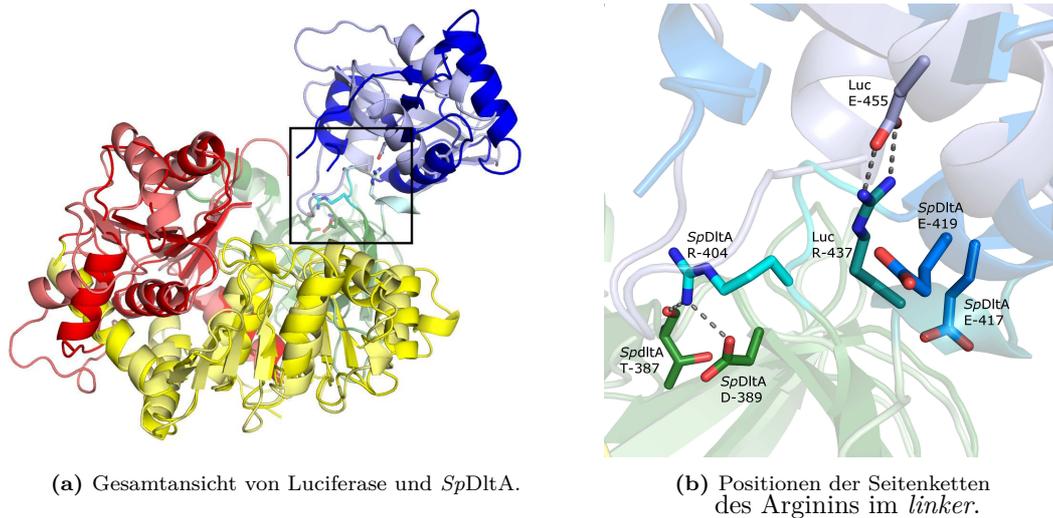


Abb. 3.19: Orientierung von Arginin-404 und Arg-437. (a) Gesamtansicht von *SpDltA* und Luciferase (pdb-Code 1ba3). *SpDltA* und Luciferase sind im vorher genutzten Farbschema dargestellt, wobei die Luciferase in geringerer Farbintensität dargestellt ist (Ausnahme R-437). (b) Nahansicht der Interaktionen. Arginin-437 (Luciferase) interagiert mit Glutamat-455 aus der kleinen Domäne. Im Gegensatz dazu interagiert Arginin-404 (*SpDltA*) mit Threonin-387 und Aspartat-389 aus der großen Domäne. Die zu Glutamat-455 ähnlichen Reste Glutamat-417 und Glutamat-419 sind in den offenen Konformationen von *SpDltA* nicht in der Nähe von Arginin-404, um Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen.

Die zweite Hypothese sagt aus, dass Arginin-404 je nach Konformation des Proteins unterschiedliche Bindungspartner besitzt und die Domänenwanderung steuert [Yonus *et al.*, 2008; Pfennig, 2015]. In der Luciferase interagiert Arginin-437, der äquivalente Rest zu Arginin-404 von *SpDltA*, in der offenen Konformation mit Glutamat-455 in der kleinen Untereinheit und ist somit vom aktiven Zentrum abgewandt (Abb. 3.19(b)). Eine ähnliche Bindung wurde auch für DltAs in der offenen Konformation vorhergesagt [Yonus *et al.*, 2008], konnte jedoch mit der hier dargestellten Kristallstruktur nicht gezeigt werden. Die Position von Arginin-404 in der ligandenfreien Struktur (*SpDltA*) weicht nur geringfügig von der Position in der AMP-gebundenen Struktur ab. Die postulierten Glutamate, die die Seitenkette von Arginin-404 über Wechselwirkungen von dem aktiven Zentrum entfernt positionieren sollen, sind in beiden Molekülen von Arginin-404 abgewandt (Glutamat-417 und Glutamat-419 in *S. pneumoniae*). Auch in Molekül B von *SpDltA* sind die Glutamate und das Arginin-396 einander nicht zugewandt. Die Wanderung der kleinen Domäne zwischen der Transferkonformation und der offenen Konformation scheint keinen Einfluss auf die Position von Arginin-404 zu haben. Die Hypothese, dass Arginin-404 eine unterschiedliche Orientierung in der offenen und in der Transferkonformation einnimmt, kann unter den hier genannten Bedingungen nicht gezeigt werden. Auch in anderen adenylatbildenden Enzymen in der offenen Konformation ist das äquivalente Arginin dem aktiven Zentrum zugewandt (Abb. 3.21). Lediglich im Fall der Luciferase zeigt dieser Rest nicht zur großen Domäne, sondern zur kleinen Domäne und interagiert mit den Aminosäuren dort.

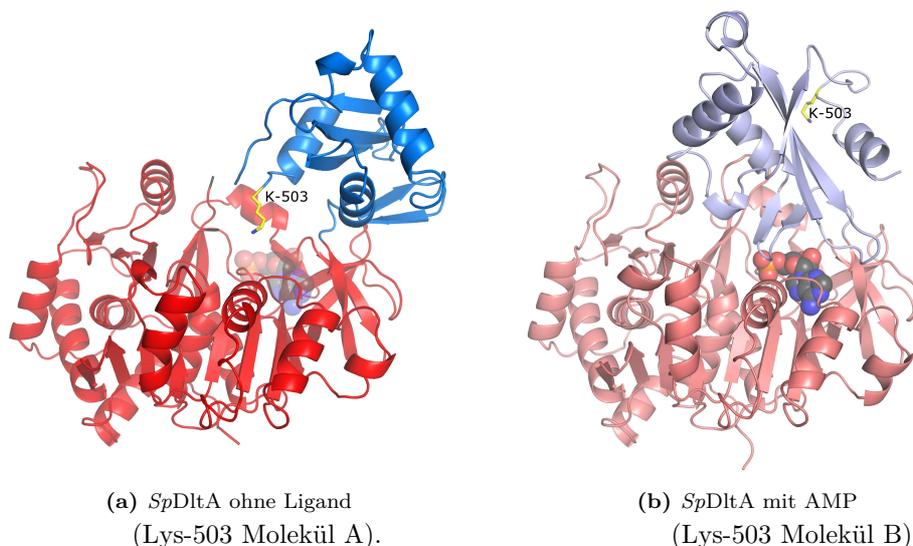


Abb. 3.20: Position von Lysin-503 in *SpDltA*. Die Position von Lysin-503 ist in der ligandenfreien Struktur und der AMP-gebundenen Struktur signifikant unterschiedlich. Das Protein ist als *cartoon* dargestellt, wobei Lysin-503 zusätzlich in *stick*-Repräsentation gezeigt ist. Zur Übersicht ist auch in der ligandenfreien Struktur die Position von AMP angegeben. (a) Lysin-503 in *SpDltA* ohne Liganden (Molekül A). Der Rest ist dem aktiven Zentrum zugewandt. (b) Lysin-503 in *SpDltA* mit AMP (Molekül B). Der Rest ist vom aktiven Zentrum abgewandt.

In einer dritte Hypothese wird vermutet, dass ein Lysin der kleinen Domäne (Lysin-503 in *SpDltA*) in der offenen Konformation der Substratbindestelle zugewandt ist und sich mit der Domänenwanderung von dieser Position entfernt. Die Änderung der Position von Lysin-503 kann beim Vergleich der ligandenfreien Struktur (Abb. 3.20(a)) mit der AMP-gebundenen Struktur (Abb. 3.20(b)) erkannt werden. Während in der erstgenannten diese Aminosäure zur Bindetasche ausgerichtet ist, befindet sie sich in letzteren aufgrund der Domänenwanderung in einer abgewandten Position. Für Molekül B der Struktur von *SpDltA* ohne Ligand kann über die Position von Lysin-503 keine Aussage getroffen werden. Der Rest befindet sich in einer *loop*-Region, die in der Elektronendichte nicht sichtbar ist.

Auch in anderen Strukturen, die die offene Konformation aufweisen, ist das äquivalente Lysin nicht sichtbar. Teilweise ist der *loop*, in dem sich dieser Rest befindet, nicht in der Elektronendichte definiert (*SpDltA* (B), Luciferase, Fettsäure-CoA-Synthese (B)). Allerdings ist dieser Rest, falls sichtbar, in der Nähe des aktiven Zentrums zu finden, wobei die Positionen stark voneinander abweichen (Tab. 3.8 und Abb. 3.21).

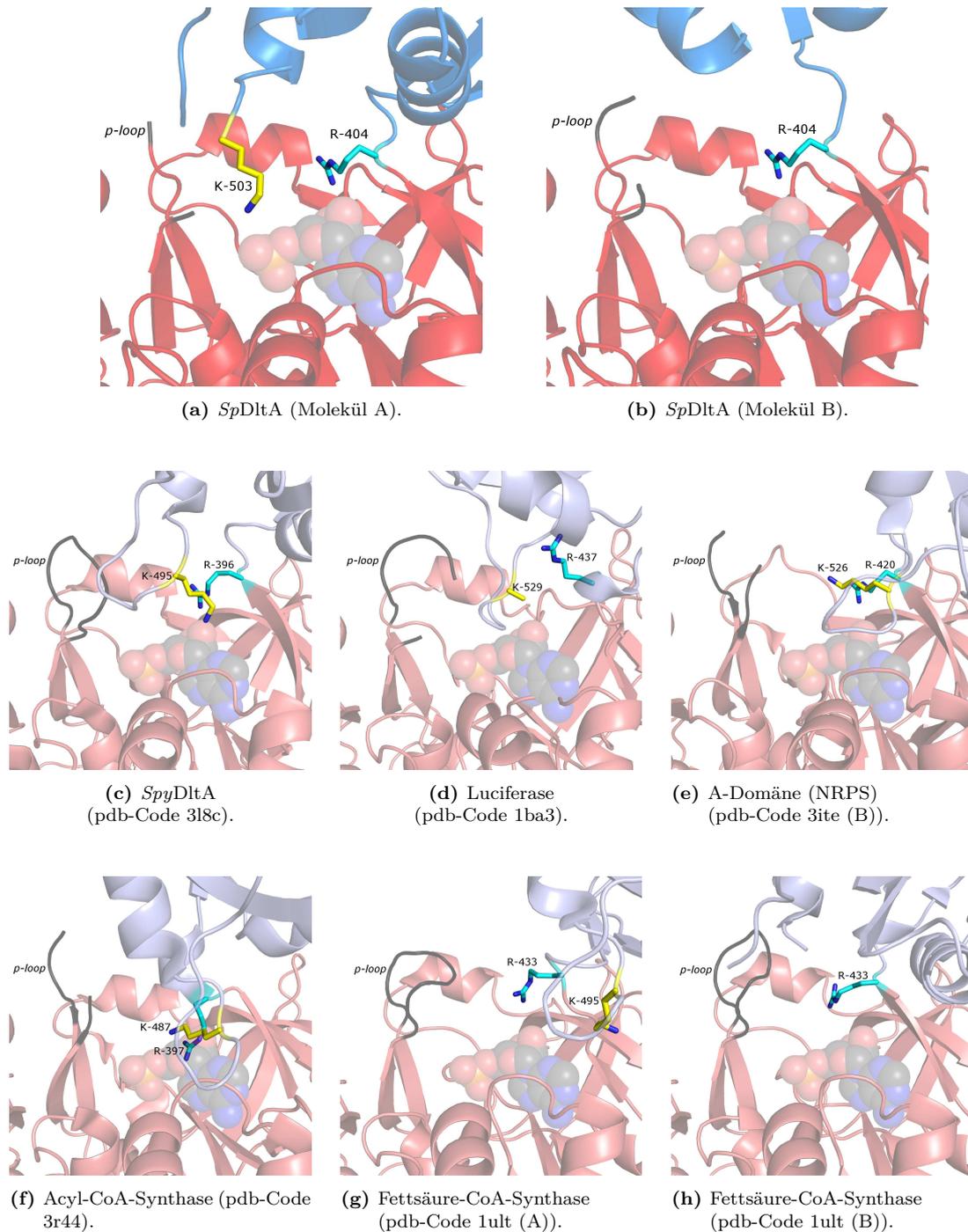


Abb. 3.21: Vergleich der Positionen von Arginin (R) und Lysin (K) in der Nähe des aktiven Zentrums. In cyan sind die Arginin-Reste des *linkers* dargestellt. Das für die Reaktion wichtige Lysin (Lysin-503 in *SpDltA*) ist als *stick*-Repräsentation in gelb dargestellt. Zur Visualisierung des aktiven Zentrums wurde die ligandenfreie Struktur von *SpDltA* mit der Struktur von *SpDltA* mit AMP überlagert und das AMP dargestellt. Dies dient der Markierung der Position des aktiven Zentrums. (a) Molekül A von *SpDltA* aus dieser Arbeit. (b) Molekül B von *SpDltA* aus dieser Arbeit. (c) Molekül B von *SpyDltA* (pdb-Code 3l8c). (d) Luciferase (pdb-Code 1ba3). (e) Molekül B der A-Domäne eines NRPS (pdb-Code 3ite). (f) Acyl-CoA-Synthase (pdb-Code 3r44). (g) Molekül A der *long chain fatty acyl-CoA-Synthase* (pdb-Code 1ult). (h) Molekül B der *long chain fatty acyl-CoA-Synthase* (pdb-Code 1ult).

Tab. 3.8: Zusammenfassung des Vergleichs der offenen Konformationen. Betrachtet werden das Vorhandensein des *p-loops* sowie die Position des Argininrestes im Linker und eines Lysinrestes der kleinen Domäne.

Protein (pdb-Code)	<i>p-loop</i> (sichtbare Reste)	Arginin (<i>linker</i>)	Lysin (kleine Domäne)
<i>SpDltA</i> (A)	T-156, K-162 bis K-164	R-404 in Richtung ATP, große Domäne	K-503 in Richtung ATP, große Domäne
<i>SpDltA</i> (B)	T-156, S-157, G-161 bis K-164	R-404 in Richtung ATP, große Domäne	K-503 <i>loop</i> und Rest nicht sichtbar
<i>SpyDltA</i> (pdb-Code 3lx8 (B))	T-148 bis K-156 <i>p-loop</i> komplett sichtbar	R-396 in Richtung ATP, große Domäne	K-495 in Richtung ATP, große Domäne
Luciferase (pdb-Code 1ba3)	S-198, S-201 bis K-206	R-433 in Richtung kleine Domäne	K-520 in Richtung ATP (keine Seitenkette)
A-Domäne (NRPS) (pdb-Code 3ite (B))	T-178 bis G-180, G-183 bis K-186	R-420 in Richtung ATP, große Domäne	K-526 Nähe ATP
Acyl-CoA-Synthase (pdb-Code 3r44)	T-164, S-165, G-169 bis K-172	R-397 in Richtung ATP, große Domäne	K-487 Nähe ATP
Fettsäure-CoA-Synthase (pdb-Code 1ult (A))	T-184 bis K-192 <i>p-loop</i> komplett sichtbar	R-396 in Richtung ATP, große Domäne	K-495 Nähe ATP
Fettsäure-CoA-Synthase (pdb-Code 1ult (B))	T-184 bis K-192 <i>p-loop</i> komplett sichtbar	R-396 in Richtung ATP, große Domäne	K-495 <i>loop</i> und Rest nicht sichtbar

3.2.2 Die Transferkonformation

Sowohl die Kristallisationen mit AMP als auch mit ATP, Magnesiumchlorid und D-Alanin führen zu einem DltA-AMP-Komplex (Abb. 3.5, S. 48). Der Vergleich der Struktur mit anderen DltA-Strukturen zeigt, dass *SpDltA* mit AMP in der Transferkonformation kristallisiert, wie es auch für DltA aus *B. subtilis* beschrieben ist. Die Strukturen lassen sich mit einem *r.m.s.d.*-Wert von 1,2 Å aufeinander abbilden, mit den größten Unterschieden in der kleinen Domäne. In diesem Bereich weichen neben zwei β -Strängen auch die Positionen zweier α -Helices voneinander ab (Abb. 3.22(a), jeweils Molekül A).

Daneben zeigt auch die nähere Betrachtung der AMP-Bindungstasche Gemeinsamkeiten auf. In *SpDltA* sind an der Bindung von AMP die Aminosäuren Phenylalanin-202, Alanin-299, Asparagin-298, Tyrosin-300, Threonin-303, Aspartat-389, Tyrosin-401, Arginin-404, Glutamin-408 und Arginin-415 beteiligt. Dies entspricht in großen Teilen dem Bindungsmuster in bereits bekannten DltA-Strukturen [Yonus *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2008; Yonus, 2015; Pfennig, 2015]. Dennoch können kleine Unterschiede in der Bindung gefunden werden. So unterscheiden sich die Positionen von Arginin-404 aus der *linker*-Region in *BsDltA* und *SpDltA* geringfügig voneinander. Deutlichere Unterschiede existieren in der Position von Threonin-292 (*BsDltA*), die in *SpDltA* von Alanin-299 besetzt wird. Da die Bindung des AMPs über die Hauptkettenatome erfolgt, hat dieser Austausch wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Bindung. Zusätzlich unterscheiden sich zwei weitere Aminosäuren. An der Position von Cystein-393 in *BsDltA* befindet sich in *SpDltA* Tyrosin-401. Sowohl Cystein-393 in *BsDltA*, als auch Tyrosin-401 in *SpDltA* sind jeweils über die Seitenketten an der Bindung beteiligt. Die Position unterscheidet sich dabei geringfügig. Auch in anderen Spezies wie z. B. *B. cereus* befindet sich an der genannten Position ein Tyrosin. Das für die Substratspezifität notwendige Cystein-268 in *BsDltA* ist in *SpDltA* ein Aspartat (Aspartat-275). Dieses Aspartat ist in Streptokokken konserviert.

Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Bindetaschen von *SpDltA* und *BcDltA* deutlicher. Dies beruht großteils auf Unterschieden in der Position der kleinen Domäne (Abb. 3.23). Phenylalanin-202 (*SpDltA*) aus der großen Domäne weist eine andere Seitenkettenkonformation auf als Phenylalanin-196 aus *BcDltA*. Dabei entspricht die Seitenkettenposition des Phenylalanins in *SpDltA* der in *BsDltA* (beide in der Transferkonformation). Für *BcDltA* in der Adenylierungskonformation ist diese Seitenkette dem D-Alaninrest zugewandt [Yonus *et al.*, 2008; Du *et al.*, 2008; Pfennig, 2015]. Arginin-404, Glutamin-408, Lysin-410 und Arginin-415 aus der kleinen Domäne sind in der Transferkonformation von *SpDltA* an der Bindung des AMPs beteiligt. In der Adenylierungskonformation ist nur Arginin-397 (*BcDltA*) an einer

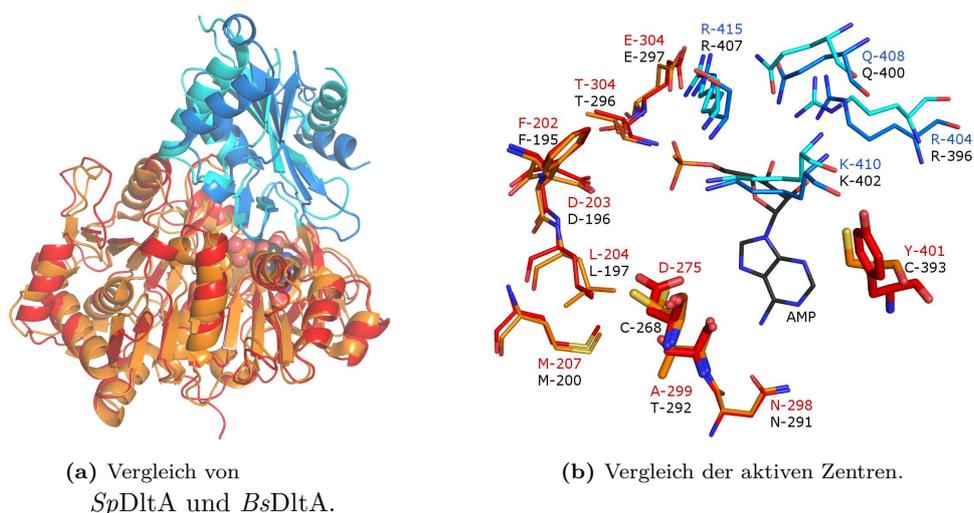


Abb. 3.22: AMP-Bindetasche im Vergleich (*SpDltA* und *BsDltA*). Die Reste von *SpDltA* sind in rot und blau (große und kleine Domäne) sowie für *BsDltA* in orange und cyan gezeigt. (a) Vergleich von *SpDltA* und *BsDltA*, beide in der Transferkonformation. (b) Vergleich der aktiven Zentren.

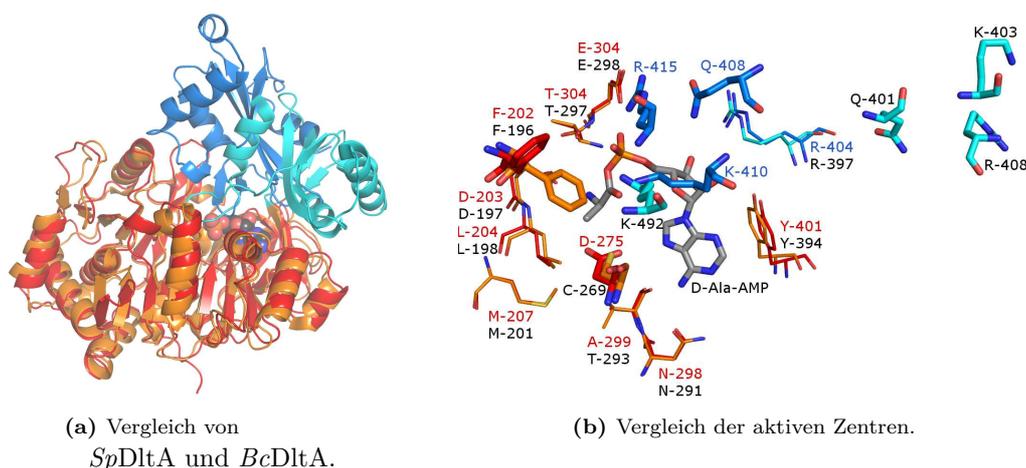


Abb. 3.23: AMP-Bindetasche im Vergleich (*SpDltA* und *BcDltA*). Die Reste von *SpDltA* sind in rot und blau (große und kleine Domäne) sowie für *BcDltA* in orange und cyan markiert. (a) Vergleich von *SpDltA* (Transferkonformation) und *BcDltA* (Adenylierungskonformation). (b) Vergleich der aktiven Zentren von *SpDltA* in der Transferkonformation und *BcDltA* in der Adenylierungskonformation. Die Seitenketten von Glutamin-408, Lysin-410 und Arginin-415 sind in der Adenylierungskonformation von *BcDltA* vom aktiven Zentrum abgewandt. In der Adenylierungskonformation ist Lysin-492 an der Bindung des AMPs beteiligt.

ähnlichen Position (Arginin-404, *SpDltA*), während die anderen drei Reste vom aktiven Zentrum abgewandt sind. Zusätzlich ist Lysin-492 (*BcDltA*) aus der kleinen Domäne in der Adenylierungskonformation an der Bindung von AMP beteiligt. Dabei nimmt die N-terminale Aminogruppe eine ähnliche Position wie die terminale Aminogruppe von Lysin-410 aus *SpDltA* in der Transferkonformation ein. Diese beschriebenen Unterschiede sind mit denen zwischen den AMP-Bindetaschen von *BsDltA* und *BcDltA* vergleichbar [Pfennig, 2015].

Hypothetische Bindung von D-Alaninadenylylat

Für DltA aus *B. cereus* konnte in verschiedenen Kristallisationsbedingungen eine Adenylierungskonformation gezeigt werden (pdb-Codes 4pzp, 3fce, 3fcc, 3dhv) [Du *et al.*, 2008; Osman *et al.*, 2009; Du und Luo, 2014]. Die Kristallisation des Proteins mit D-Alanin und ATP wies eine Elektronendichte für das Reaktionsprodukt, D-Alaninadenylylat, auf. Der Versuch, *SpDltA* analog zu der Struktur mit ATP und D-Alanin sowie Magnesiumchlorid zu kristallisieren, zeigt nur eine Elektronendichte für AMP sowie die Transferkonformation. Als weiterer Versuch, *SpDltA* in der Adenylierungskonformation zu kristallisieren, erfolgten Kristallisationen mit AMPCPP, einem nicht hydrolysierbaren ATP-Analogon. Im Rahmen der Strukturlösung konnten neben den großen Domänen nur die Hälfte der kleinen Domänen der Elektronendichte zugeordnet werden und eine Einordnung zu den drei Konformationen war nicht möglich. Daher soll eine mögliche Position des Reaktionsproduktes D-Alaninadenylylat mit Hilfe der Position des AMPs sowie der Überlagerung mit der Struktur von *BcDltA* bestimmt werden (Abb. 3.24). Demnach könnte ein Alaninadenylylat zusätzlich zu den bereits erwähnten Interaktionen mit der AMP-Einheit noch drei weitere Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Die Seitenketten von Aspartat-203 und Lysin-410 und das Carbonylsauerstoff von Valin-307 könnten an die D-Alanineinheit binden. Zu beachten ist, dass sich Lysin-410 nur in der Transferkonformation an dieser Position befindet. In einer Adenylierungskonformation wäre diese Interaktion nicht möglich. Aspartat-275 von *SpDltA* befindet sich an der Position der Stereoselektivität bestimmenden Cysteinseitenketten in *BsDltA* und *BcDltA*. Inwieweit dieser Rest an der Stereoselektivität in *SpDltA* beteiligt ist, bleibt zu erforschen.

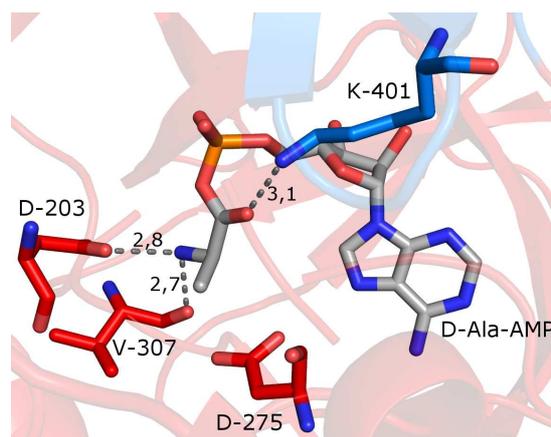


Abb. 3.24: Hypothetische Bindung von D-Alaninadenylylat. Die theoretische Position von D-Alaninadenylylat wurde durch Überlagerung von *SpDltA* mit AMP und *SpDltA* mit D-Alaninadenylylat (pdb-Code 3dhv) bestimmt. Die Interaktion mit Lysin-410 ist dabei nur in der Transferkonformation möglich. Die angegebenen Abstände beziehen sich auf die manuelle Anpassung der Struktur durch Überlagerung des D-Alaninadenylylats auf das AMP der Transferkonformation von *SpDltA* und müssen nicht zwangsläufig den wahren Zustand widerspiegeln. Die angegebenen Abstände entsprechen daher nur Abschätzungen.

3.3 Zusammenfassung der neuen Erkenntnisse zu *SpDltA*

Mit den in dieser Arbeit gelösten Strukturen von *SpDltA* kann nun der postulierte Reaktionszyklus von DltA vervollständigt werden (Abb. 3.25). Bisher wurde die offene Konformation durch den Vergleich mit Leuchtkäfer-Luciferase angenommen (pdb-Code 1ba3). Eine Existenz dieser Konformation konnte mit der hier gelösten Struktur nun auch für DltA nachgewiesen werden. Vergleiche von *SpDltA* mit der Leuchtkäfer-Luciferase sowie mit anderen adenylyt bildenden Enzymen in der offenen Konformation zeigen jedoch auch die Flexibilität der Position der kleinen Domäne. Allen Strukturen gemein ist die geringere Interaktionsfläche zwischen der kleinen und großen Domäne.

Die Hypothesen zur offenen Konformation konnten mit den vorliegenden Strukturen nur teilweise überprüft werden. Die erste Hypothese, eine Positionsänderung des *p-loops* beim Übergang zwischen den unterschiedlichen Konformationen, konnte aufgrund der fehlenden Elektronendichte für den *p-loop* in der offenen Konformation von *SpDltA* nicht überprüft werden. Auch die zweite Hypothese, die Orientierung des Argininrestes aus dem *linker* zur kleinen Domäne konnte für *SpDltA* nicht gezeigt werden. Die Position der Seitenkette unterscheidet sich in der ligandenfreien Form nur minimal von der AMP-gebundenen Form. Auch in anderen Proteinstrukturen in der offenen Konformation konnte keine Wechselwirkung mit Glutamaten aus der kleinen Domäne gezeigt werden. Vielmehr ist die Seitenkette des Arginins zum aktiven Zentrum ausgerichtet. Die Hypothese, dass dieser Rest durch Wechselwirkungen mit der kleinen Domäne in der offenen Konformation vom aktiven Zentrum abgewandt ist, konnte somit nicht nachgewiesen werden. Die dritte Hypothese betrifft ein Lysin am C-terminalen Ende der kleinen Domäne. Dieser Rest soll in der offenen Konformation dem aktiven Zentrum zugewandt sein. Diese Hypothese konnte mit der hier gezeigten Struktur von *SpDltA* (Molekül A) bestätigt werden. Gleichzeitig kann die Wanderung ebendieses Restes durch den Vergleich mit der Transferkonformation von *SpDltA* gezeigt werden.

Die offene Konformation ermöglicht die Bindung von ATP sowie D-Alanin. Nach der Bindung der zwei Komponenten erfolgt die Umsetzung der beiden Edukte zu D-Alaninadenylylat. DltA nimmt hiernach eine (post)-Adenylylierungskonformation ein, wie sie zuvor schon für *BcDltA* gezeigt wurde [Du *et al.*, 2008; Osman *et al.*, 2009]. Obgleich verschiedene Ansätze zur Kristallisation von *SpDltA* in der Adenylylierungskonformation durchgeführt wurden, konnte *SpDltA* bisher nicht in dieser kristallisiert werden.

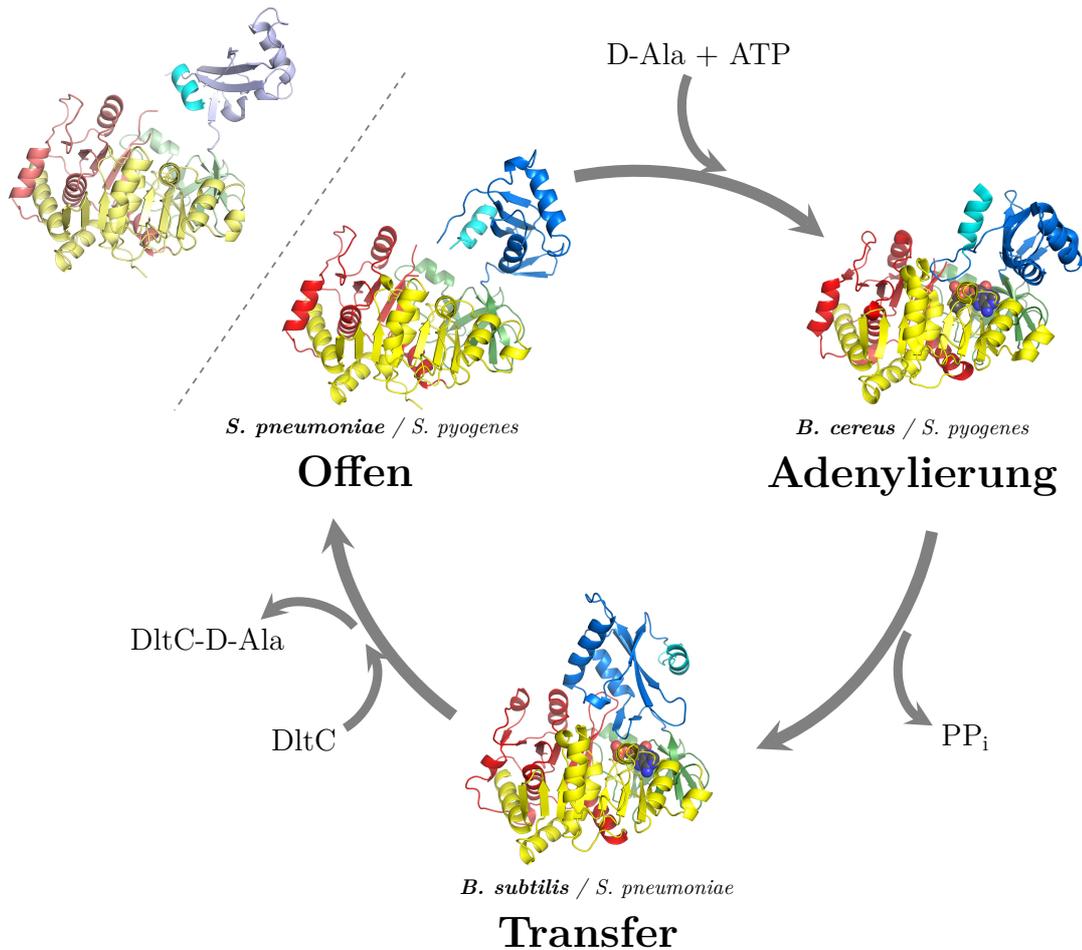


Abb. 3.25: Darstellung der drei Konformationen von DltA. Die offenen Konformationen entsprechen den in dieser Arbeit beschriebenen Strukturen aus *S. pneumoniae*. Die Adenylierungskonformation ist für DltA von *B. cereus* nachgewiesen worden (pdb-Code 3dhv) während die Transferkonformation von DltA aus *B. subtilis* (pdb-Code 3e7w) gezeigt ist.

Nach der Abgabe des Pyrophosphat nimmt DltA eine Transferkonformation ein. Diese Konformation konnte für *SpDltA* in der Struktur mit AMP gezeigt werden. Sie entspricht großteils der bekannten Struktur von *BsDltA* mit AMP. Auch die AMP-Bindetasche entspricht großteils der Bindetasche von DltA aus *B. subtilis*. Interessant ist hierbei der Austausch des Substratspezifität bestimmenden Restes Cystein-268 (*BsDltA*) mit Aspartat-275 (*SpDltA*). Inwieweit dies die Spezifität beeinflusst, bleibt abzuklären, jedoch ist diese Mutation in Streptokokken üblich.

4 *SpDltD_{tr}*

4.1 Ergebnisse zu *SpDltD_{tr}*

4.1.1 Klonierung, Proteinpräparation und Proteinanalytik

Die Funktion von DltD ist bisher nicht bekannt, es wurde jedoch gezeigt, dass das Protein über einen N-terminalen Anker an der Membran fixiert ist [Debabov *et al.*, 2000]. Da bisherige Experimente in der Arbeitsgruppe die Struktur und Funktion von DltA und DltC aus *B. subtilis* untersucht haben, sollte auch DltD aus diesem Organismus charakterisiert werden. Vorherige Versuche der Arbeitsgruppe, ein um 26 Aminosäuren gekürztes DltD aus *B. subtilis* (*BsDltD*) herzustellen führten nur zu unlöslichem Protein. Daher erfolgte zunächst eine Analyse der Primärsequenz von DltD aus diversen Organismen (siehe Anhang Abb. A.2, S. III). Zusätzlich wurde bei der Entscheidung für die Kürzung die Annahme berücksichtigt, dass die in der Proteindatenbank vorhandene Struktur von DltD (pdb-Code 3bma) auf einem löslichen Protein basiert. Der finale Expressionsvektor kodierte für ein N-terminal um 31 Aminosäuren gekürztes *BsDltD*. Dieses Protein konnte jedoch nur in geringen Anteilen löslich exprimiert werden. Darüber hinaus ergaben sich während der Reinigung Stabilitätsprobleme, die sich auch durch Zugabe von Additiven nicht beseitigen ließen. Aus diesem Grund wurde DltD aus *S. pneumoniae* gewählt und dieses um die ersten 32 Aminosäuren gekürzt. Diese Kürzung erfolgte analog zu dem in der Proteindatenbank beschriebenen Projekt (pdb-Code 3bma). Zusätzlich zu einem C-terminalen [His]₆-Tag wurde auch ein N-terminaler [His]₆-Tag getestet.

Die Herstellung des Expressionsvektors erfolgte durch die Vervielfältigung der Gensequenzen für *SpDltD_{tr}* mittels PCR und der Ligation in den pET15bTEV-Vektor bzw. pET21a-Vektor. Hierbei betrug die optimale Annealingtemperatur der PCR 67,4 °C. Eine anschließende Sequenzierung der DNA durch die Firma „GATC Biotech“ (Konstanz) bestätigte die Sequenz. Mit diesen Vektoren ließen sich Proteine mit N-terminalem bzw. C-terminalem [His]₆-Tag herstellen. Die Expression mit einem N-terminalen [His]₆-Tag zeigte eine höhere Ausbeute sowie eine bessere Löslichkeit des Proteins. Der N-terminale [His]₆-Tag konnte während der Reinigung durch den Verdau mit TEV-Protease entfernt werden.

Im Vergleich zu den Proteinsequenzen von DltD aus *S. pneumoniae* R6, D39 und TIGR4, drei häufig verwendeten Stämmen [Lanie *et al.*, 2006], zeigt die Proteinsequenz von *SpDltD_{tr}* Unterschiede in einzelnen Aminosäuren auf (Tab. 4.1 und Abb. A.2, S. III). Die Aminosäurenummerierung in dieser Arbeit bezieht sich auf die Vergleichsstruktur aus *S. pneumoniae* R6.

Tab. 4.1: Übersicht der Sequenzunterschiede in *SpDltD_{tr}*. Die Nummerierung der Aminosäuren orientiert sich hierbei an der Proteinsequenz aus *S. pneumoniae* R6. *SpDltD_{tr}* wurde auf Grundlage der DSMZ-DNA 20566 erstellt (s. auch Abschnitt A.1 im Anhang ab Seite I).

AS-Nummer	<i>SpDltD_{tr}</i>	R6	D39	TIGR4
130	I	V	V	V
198	G	E	E	E
217	R	C	C	R
333	D	D	D	N

Bei dem Vergleich von *SpDltD_{tr}* mit den Proteinsequenzen in *S. pneumoniae* R6, D39 und TIGR4 sind die Aminosäuren 130 (Isoleucin statt Valin) und 198 (Glycin statt Glutamat) mutiert. Während Glycin-198 in verschiedenen Stämmen von *S. pneumoniae* vorhanden ist, konnte Isoleucin-130 in keinem bisher sequenzierten Stamm gefunden werden. Zusätzlich lässt sich eine dritte Mutation in Aminosäure 217 (Arginin statt Cystein) finden, die auch im infektiösen Stamm TIGR4 vorhanden ist. Eine weitere Mutation in TIGR4 ist in Position 333 zu erkennen (Asparagin statt Aspartat). Des Weiteren ergaben die Untersuchungen Unterschiede in der Länge des N-terminalen Ankers von DltD in *S. pneumoniae* R6, D39 und TIGR4. Das N-terminale Threonin des verwendeten Konstrukts entspricht in *S. pneumoniae* R6 der Aminosäure 33 während es sich in D39 an Position 28 und in TIGR4 an Position 22 befindet. Über die Länge des N-terminalen Ankers des Stammes DSMZ 20566 kann bisher keine Aussage getroffen werden. Ebenso lassen sich die Auswirkungen der Mutationen auf die Funktion von DltD nicht bestimmen, da die Funktion des Proteins noch nicht aufgeklärt ist.

Die Expression von *SpDltD_{tr}* erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) Zellen. Eine Probe vor der Induktion mit IPTG und eine Probe vor der Zellernte wurden zur Kontrolle mittels SDS-PAGE überprüft. Die Reinigung des Proteins erfolgte analog zu der Reinigung von *SpDltA* und *SpDltC* über eine erste IMAC (Elution ab 75 mM), den Verdau mit TEV-Protease, eine zweite IMAC sowie eine Größenausschlusschromatographie (Superdex200-sepharose 16/600) (Abb. A.6, Anhang S. V). Die Proben der Expression von *SpDltD_{tr}* ($M_{\text{theor}} = 48,3$ kDa) zeigten vor der Zellernte im Bereich von 45 kDa eine deutlich stärkere Bande. Im Gegensatz zu *SpDltA* und *SpDltC* eluierte *SpDltD_{tr}* in der Größenausschlusschromatographie nicht in einem, sondern in zwei aufeinanderfolgenden Peaks (Abb. 4.1(b)), die beide in der SDS-PAGE ein reines Protein auf Höhe der 45 kDa Markerbande zeigten (nur Peak b in Abb. 4.1(a)). Wurden die Fraktionen von Peak a und Peak b separat bei 4 °C gelagert beziehungsweise bei -20 °C eingefroren, so konnte über einen Zeitraum von zwei Wochen keine signifikante Änderung des Elutionsverhaltens erkannt werden (Abb. A.7, Anhang S. VI). Weitere Versuche erfolgten mit den Fraktionen des zweiten Peaks (Peak b). Durchschnittlich konnten hiervon 13 mg *SpDltD_{tr}* pro Liter Expression gewonnen werden.

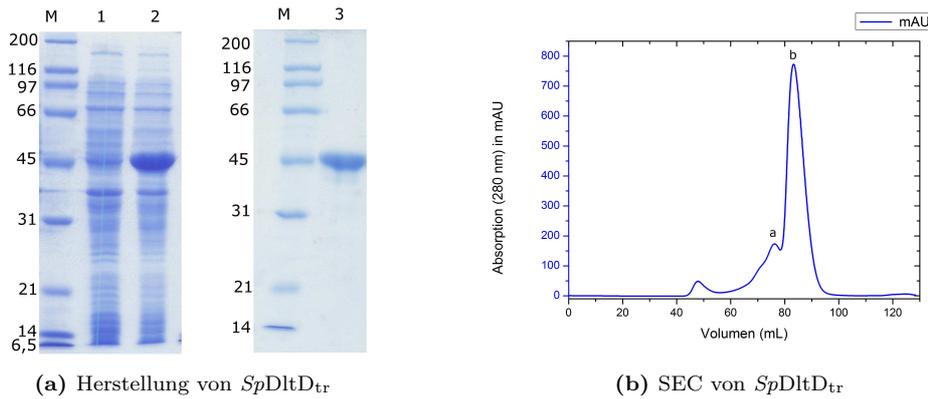


Abb. 4.1: Expression und Reinigung von *SpDltD_{tr}*. (a) Herstellung von *SpDltD_{tr}*. Das 12%-Gel zeigt den Marker in kDa (M), die Probe vor der Induktion (1), die Probe vor der Zellernte (vier Stunden nach Induktion mit 1 mM IPTG bei 37 °C) (2) sowie das gereinigte Protein (Peak b) (3). (b) SEC von *SpDltD_{tr}* (Superdex200-sepharose 16/600)

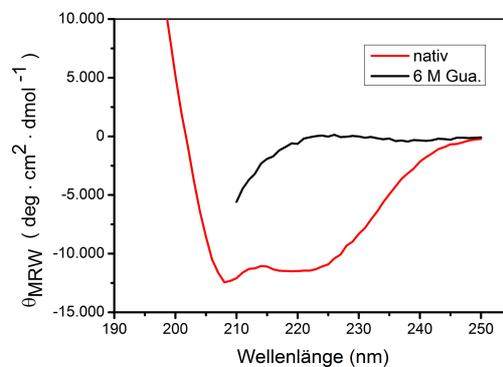


Abb. 4.2: CD-Spektrum von *SpDltD_{tr}*. *SpDltD_{tr}* wurde mit einer Konzentration von 1,22 mg/mL im Puffer der Größenausschlusschromatographie gemessen. Für die denaturierte Probe wurde das Protein mit Guanidiniumhydrochlorid (Gua) versetzt (Endkonzentration 6 M Guanidiniumhydrochlorid).

In angeleiteten Voruntersuchungen, die von Tobias Hasler im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt wurden, traten neben der Bande bei circa 45 kDa zwei weitere Banden im Bereich zwischen 21 kDa und 31 kDa auf. Eine Analyse mittels Massenspektrometrie ordnete diesen Banden Spaltprodukte von *SpDltD_{tr}* zu. Hierbei wird das Protein zwischen Phenylalanin-221 und Phenylalanin-222 gespalten. Da die Menge an Proteinfragmenten vom genutzten Klon abhängig war, wurde ein Klon gewählt, der nur geringe Mengen an gespaltenem Protein erzeugte.

Eine erste Analyse des Proteins erfolgte mittels CD-Spektroskopie (Abb. 4.2). Die Elliptizität pro Aminosäure wurde gemäß Abschnitt 2.5.4 (S. 34) berechnet. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, handelt es sich bei DltD um ein Protein mit hohem Anteil an α -Helices und einem β -Faltblatt. Neben einem α -helikal-typischen Minimum bei 208 nm ist im Bereich von circa 220 nm ein weiteres Minimum erkennbar (Abb. 4.2). Nach der Behandlung mit 6 M Guanidiniumchlorid sind die für α -Helices typischen Minima nicht mehr vorhanden.

Analyse der Peaks der Größenausschlusschromatographie

Der finale Reinigungsschritt von $SpDltD_{tr}$ erfolgte über eine Größenausschlusschromatographie auf einer Superdex200-sepharose 16/600 Säule. Neben dem Hauptpeak (Peak b) bei circa 81 mL eluierte das Protein auch in einer vorherigen Schulter bei circa 73 mL (Peak a in Abb. 4.1(b), S. 75). Da beide Fraktionen eine Bande bei circa 45 kDa in der Glycin-SDS-PAGE zeigten, wurden sie mittels analytischer Ultrazentrifugation weiter untersucht. Hierbei ergab sich für Peak a ein apparentes Molekulargewicht von 82 kDa, während für Peak b ein apparentes Molekulargewicht von 41,4 kDa bestimmt wurde. In Hinblick auf das Molekulargewicht von $SpDltD_{tr}$ von 46 kDa handelte es sich somit bei den beiden Peaks wahrscheinlich um das Dimer (Peak a) und das Monomer (Peak b in Abb. 4.3(a), (b)).

Erste Vorversuche mit Proteinproben mit 5 mM LDAO (Lauryldimethylamin-N-Oxid) zeigten eine Abnahme der apparenten Molekulmasse in Peak a (Anhang Abschnitt A.2 auf Seite VII).

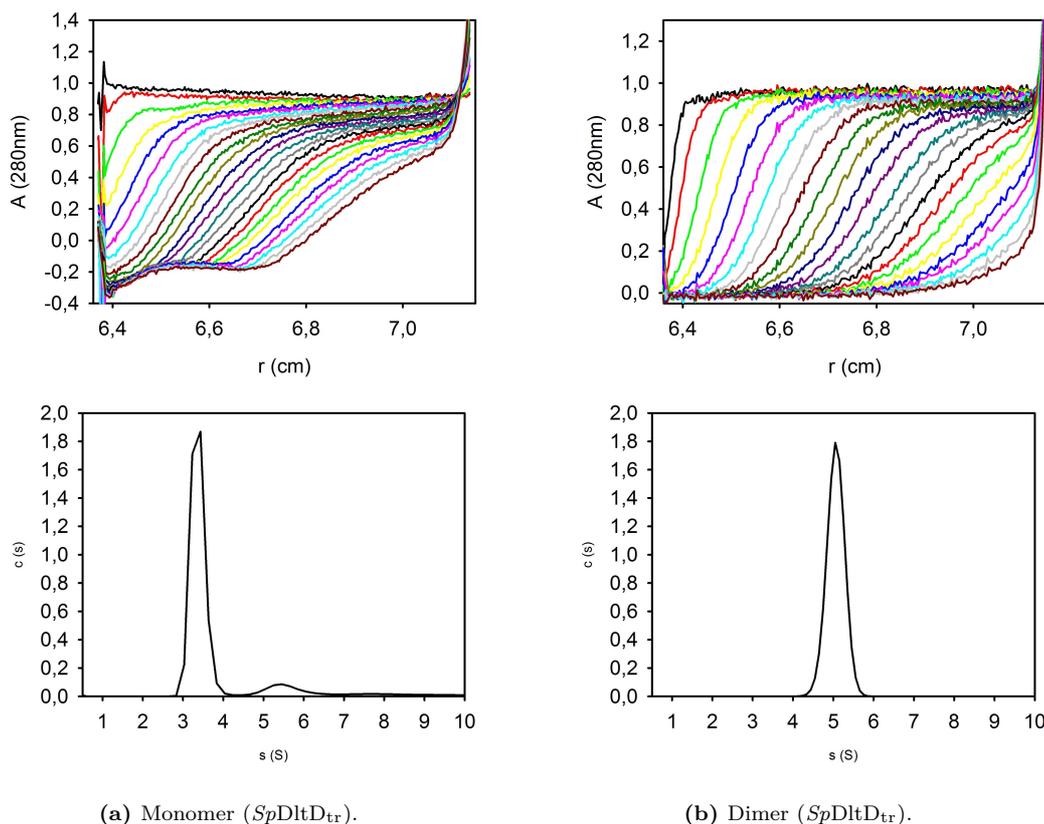


Abb. 4.3: Analytische Ultrazentrifugation von $SpDltD_{tr}$. (a) Monomerpeak der Größenausschlusschromatographie von $SpDltD_{tr}$. (b) Dimerpeak der Größenausschlusschromatographie von $SpDltD_{tr}$.

4.1.2 Mutagenese

Aufgrund der Untersuchung der Sequenzhomologie von DltD aus diversen Organismen sowie der Untersuchung der Struktur wurde eine hypothetische katalytische Triade sowie ein aktives Zentrum vorhergesagt. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollten Punktmutationen an mehreren Aminosäuren durchgeführt werden. Neben zwei Einzelmutationen in der hypothetischen katalytischen Triade (Serin-78 und Histidin-379, je zu Alanin) wurde auch eine Doppelmutante (Serin-78-Alanin & Histidin-379-Alanin) hergestellt. Die Alaninmutanten sollten inaktiv sein bzw. eine deutlich verringerte Reaktionsrate aufweisen. Eine Mutation von Glutamat-79 zu Glutamin-79 sollte eine mögliche Rolle dieses Restes bei der Fixierung des D-Alanins zeigen.

Die aufgeführten Mutanten wurden durch ortsspezifische Mutagenese hergestellt und die erfolgreiche Mutagenese durch Sequenzierung der Plasmid-DNA bestätigt. Die Expression und Reinigung erfolgte analog zu *SpDltD_{tr}* und resultierte in fast reinen Proteinen (Abb. 4.4). Anschließende Messungen der CD-Spektren zeigten, dass die mutierten Proteine mit dem Spektrum von *SpDltD_{tr}* vergleichbar waren (Abb. 4.5) und die Mutation keine signifikante Veränderung der Sekundärstruktur bewirkte.

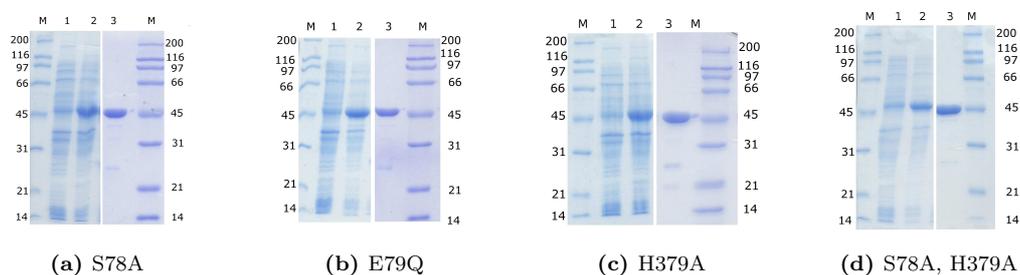


Abb. 4.4: SDS-PAGE der mutierten Proteine. Die Gele zeigen den Marker in kDa (M), Proben vor der Induktion (1), vor der Zellernte (2) und gereinigtes Protein (3). (a) Gereinigtes *SpDltD_{tr}* Ser-78-Ala. (b) Gereinigtes *SpDltD_{tr}* Glu-79-Gln. (c) Gereinigtes *SpDltD_{tr}* His-379-Ala. (d) Gereinigtes *SpDltD_{tr}* Ser-78-Ala & His-379-Ala.

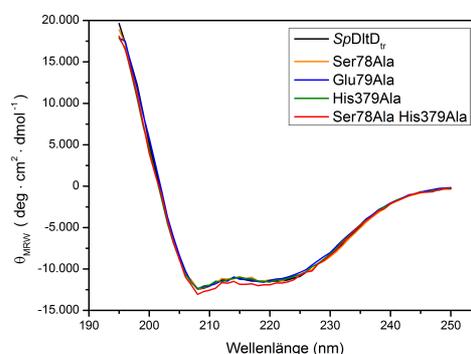


Abb. 4.5: CD-Messung der Mutanten. Die CD-Messungen der Mutanten zeigen sehr ähnliche Kurvenverläufe wie die CD-Messungen des Wildtyps. Somit lässt sich vermuten, dass die mutierten Proteine gefaltet vorliegen.

4.1.3 Interaktionsstudien (analytischer Ultrazentrifugation)

Neben der Interaktion von *SpDltA* (57,8 kDa) mit *SpDltC* (9,3 kDa) sollten auch Interaktionen der beiden Proteine mit *SpDltD_{tr}* (46,1 kDa) mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation untersucht werden. (Tab. 4.2 und Abb. 4.6). Als Positivkontrolle diente die Interaktion zwischen *SpDltA* und *SpDltC*, die eine Erhöhung des Sedimentationskoeffizienten zeigte (Abschnitt 3.1.2, S. 43). Aufgrund der Molekülmassendifferenz zwischen *SpDltC* (9,7 kDa) und einer Messung aller drei Proteine (theoretische Gesamtmasse = 113,6 kDa) war hierbei die Messung des kleinen Proteins mit größeren Ungenauigkeiten besetzt. Der Versuchsansatz mit *SpDltA* und *SpDltD_{tr}* wies einen verbreiterten Peak mit einem Maximum bei 3,55 S auf und lag zwischen den Sedimentationskoeffizienten von *SpDltD_{tr}* (3,15 S) und *SpDltA* (3,69 S). Ein Komplex beider Proteine würde mit 103,9 kDa einen wesentlich höheren Sedimentationskoeffizienten zur Folge haben. Somit konnte eine Interaktion nicht nachgewiesen werden. Die Messung von *SpDltC* und *SpDltD_{tr}* zeigte zwei lokale Maxima bei 0,76 S und 3,20 S. Letzterer ist mit dem Maximum von *SpDltD_{tr}* (3,15 S) vergleichbar. Es ließ sich somit auch kein Komplex von *SpDltC* und *SpDltD_{tr}* nachweisen. Ein Komplex der drei Proteine mit einem Molekulargewicht von 113,6 kDa konnte ebenfalls nicht gezeigt werden. Der ermittelte Wert von 3,74 S setzt sich wahrscheinlich aus dem Sedimentationskoeffizient von *SpDltD_{tr}* (3,15 S) und dem Sedimentationskoeffizienten der Interaktion von *SpDltA* und *SpDltC* (4,14 S) zusammen. In dem hier gewählten System (25 mM HEPES; 150 mM NaCl; 0,5 μ M TCEP; pH 7,5) konnte keine Interaktion von *SpDltD_{tr}* mit *SpDltA* und/oder *SpDltC* nachgewiesen werden. Die Interaktion zwischen *SpDltA* und *SpDltC* wurde jedoch gezeigt.

Tab. 4.2: Sedimentationskoeffizienten der Interaktionsstudien. (*)Aufgrund der Unterschiede in der Molekülmasse ist der Sedimentationskoeffizienten von *SpDltC* mit einer größeren Ungenauigkeit besetzt. (**)Der Peak der möglichen Interaktion zwischen *SpDltA*, *SpDltC* und *SpDltD_{tr}* ist verbreitert.

Protein	Sedimentationskoeffizienten [S]
<i>SpDltA</i> (57,8 kDa)	3,69
<i>SpDltC</i> (9,7 kDa)	1,22*
<i>SpDltD_{tr}</i> (46,1 kDa)	3,15
<i>SpDltA/SpDltC</i>	4,14 + 1,22
<i>SpDltA/SpDltD_{tr}</i>	3,55
<i>SpDltC/SpDltD_{tr}</i>	3,20 & 0,76*
<i>SpDltA/SpDltC/SpDltD_{tr}</i>	3,74**

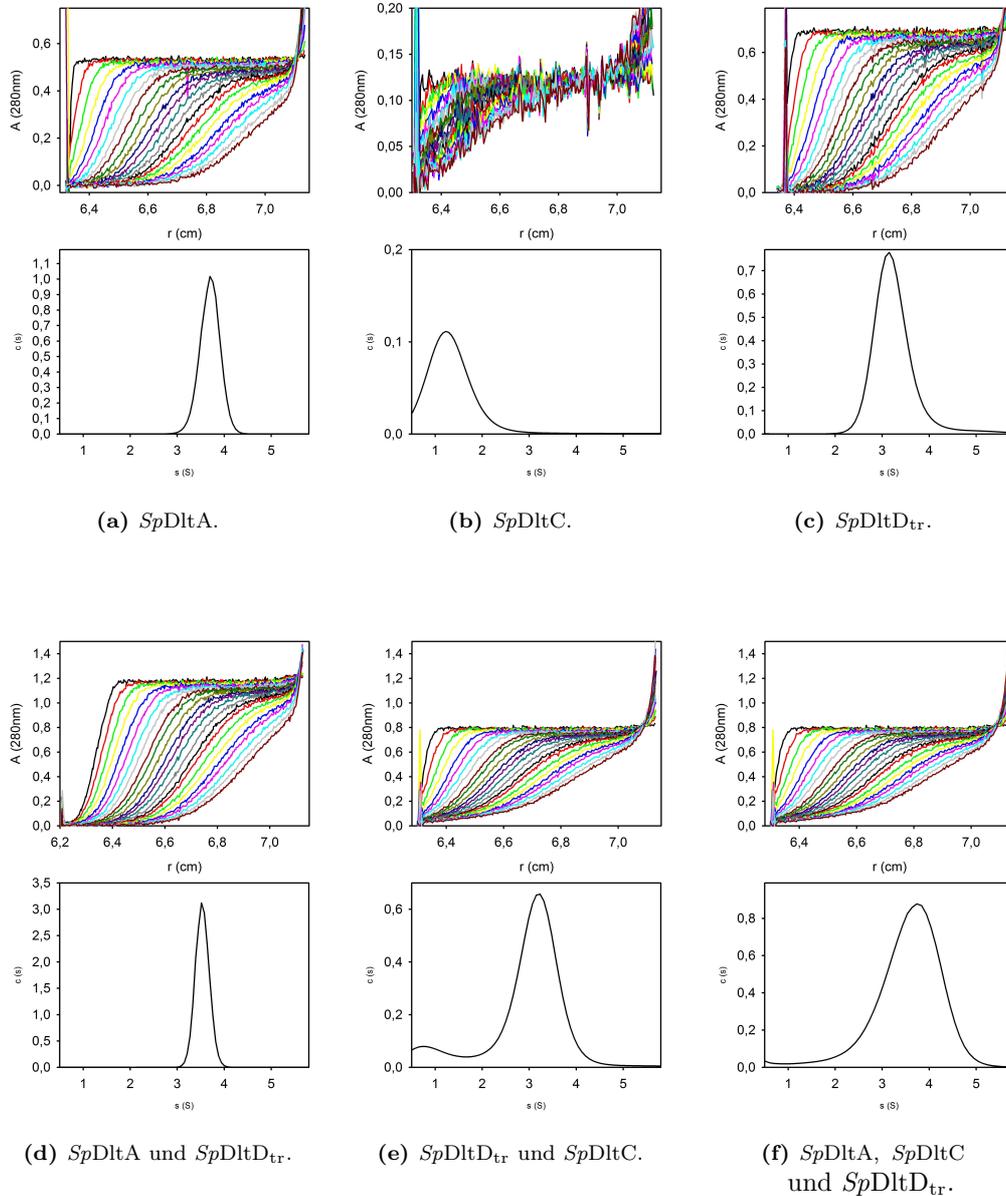


Abb. 4.6: Analytische Ultrazentrifugation der Interaktionsversuche. Aufgrund der Unterschiede in der Molekülmasse ist die Aussagekraft bezüglich des Sedimentationskoeffizienten von $SpDltC$ mit Vorsicht zu betrachten. (a) Analytische Ultrazentrifugation von $SpDltA$. (b) Analytische Ultrazentrifugation von $SpDltC$. (c) Analytische Ultrazentrifugation von $SpDltD_{tr}$. (d) Analytische Ultrazentrifugation von $SpDltA$ und $SpDltD_{tr}$. (e) Analytische Ultrazentrifugation von $SpDltD_{tr}$ und $SpDltC$. (f) Analytische Ultrazentrifugation von $SpDltA$, $SpDltC$ und $SpDltD_{tr}$.

4.1.4 Kristallisation, Röntgendiffraktion und Strukturaufklärung

Initiale Kristalle wuchsen bei 12 °C innerhalb von sechs Tagen in einer Kristallisationsbedingung mit 0,04 M KH₂PO₄, 16 % PEG 8.000 und 20 % Glycerin mit 18 mg/mL *SpDltD_{tr}* in der Proteinlösung (0,2 µL Proteinlösung und 0,2 µL Kristallisationslösung). Die initialen Kristalle, sehr feine Nadeln, waren für Röntgendiffraktionsversuche zu klein und wurden verfeinert (Abb. 4.7(a)). Durch Änderungen der PEG 8.000 Konzentration konnte keine Verbesserung der Kristallisation erreicht werden. Diese erfolgte erst, als das Protein-Präzipitant-Verhältnis verändert wurde. Plättchenförmige Kristalle konnten in Kristallisationstropfen mit 2 µL Präzipitant und 1 µL Protein gewonnen werden, auch wenn diese ineinander verwachsen waren und nicht optimal streuten (Abb. 4.7(b)). Da *SpDltD_{tr}* an der D-Alanylierung von Teichonsäuren beteiligt ist [Perego *et al.*, 1995; Debabov *et al.*, 1996, 2000; Reichmann *et al.*, 2013], wurden Ansätze mit 6,7 mM D-Alanin und/oder 6,7 mM Ribitol im Kristallisationstropfen angesetzt (Abb. 4.7(c) - 4.7(e)). Die Zugabe von Ribitol und D-Alanin erzielte dabei die größten Verbesserungen und resultierte in hexagonalen Kristallen von circa 300 µm Länge.

Die Messung des Kristalls von *SpDltD_{tr}* aus der Kristallisationsbedingung mit D-Alanin und Ribitol erfolgte an der Beamline 14.1 am BESSY II, Helmholtz-Zentrum Berlin [Müller *et al.*, 2012]. *SpDltD_{tr}* kristallisierte in der orthorhombischen Raumgruppe P2₁2₁2₁ und streute bis 1,7 Å (Tab. 4.3). Die Prozessierung des Datensatzes erfolgte mit XDS [Kabsch, 2010] und das Phasenproblem wurde mittels *molecular replacement* mit Phenix Phaser [McCoy *et al.*, 2007] und der bekannten Struktur von DltD (pdb-Code 3bma) als Suchmodell gelöst. Hierbei handelt es sich um DltD aus *S. pneumoniae* ab der Aminosäure 32 mit einem zusätzlichen N-terminalen Tripeptid (MSL) sowie einem C-terminalen [His]₆-Tag. Die Kristallisation des Suchmodells erfolgte als *sitting drop vapor diffusion* in einer Bedingung mit 100 mM Bis-Tris pH 5,5, 21 % PEG 6.000, 200 mM Lithiumsulfat und 10 % Glycerol bei 21 °C. Das Protein kristallisierte in der orthorhombischen Raumgruppe P2₁2₁2₁ mit den Seitenlängen 92,956 Å, 148,064 Å und 208,146 Å. Zur Reinigung des Proteins vor der Kristallisation sowie der Proteinkonzentration wurden keine Angaben gemacht.

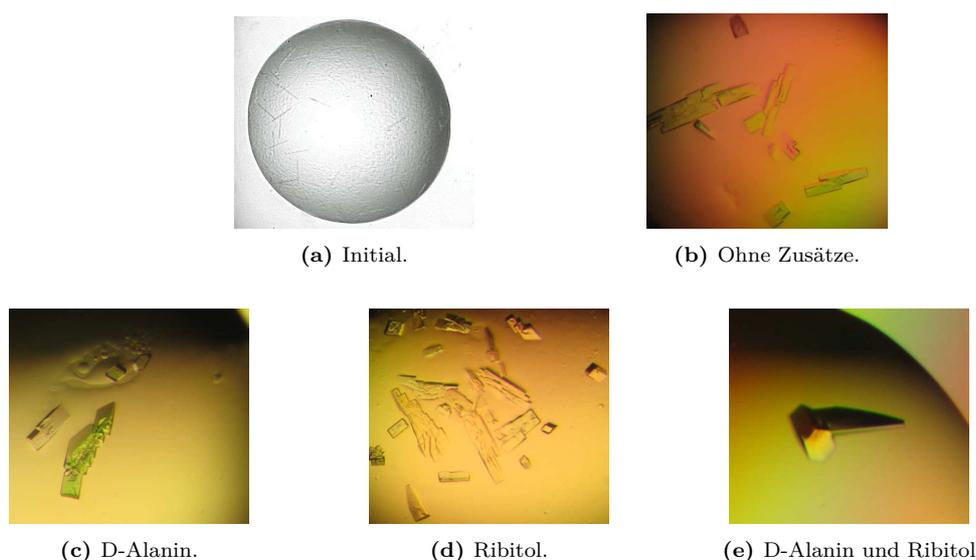


Abb. 4.7: Kristallisationsbilder der $SpDltD_{tr}$ Kristalle. Die Kristalle wuchsen in Bedingungen mit 0,04 M KH_2PO_4 , 16 % PEG 8000, 20 % Glycerin und einer Proteinkonzentration von 18 mg/mL. (a) Initiale Kristalle von $SpDltD_{tr}$ ohne Ligand, (b) $SpDltD_{tr}$ ohne Ligand, (c) $SpDltD_{tr}$ mit D-Alanin, (d) $SpDltD_{tr}$ mit Ribitol, (e) $SpDltD_{tr}$ mit D-Alanin und Ribitol, Länge circa 300 μm .

Tab. 4.3: Zellparameter und Statistik zur Datensammlung von $SpDltD_{tr}$. Die Werte in den runden Klammern entsprechen den Werten für die Schale mit der höchsten Auflösung.

Parameter	$SpDltD_{tr}$
Messtation	Bessy 14.2
Wellenlänge [\AA]	0,9184
Raumgruppe	$P2_122_1$
Zelldimensionen	
a	76,18 \AA
b	106,79 \AA
c	121,70 \AA
α	90°
β	90°
γ	90°
Auflösung	1,7 \AA
Observierte Reflexe	443249 (70524)
Unabhängige Reflexe	204838 (32976)
Vollständigkeit	96.9 % (96.5 %)
Redundanz	2,16
$1/\sigma_1$	7.08 (1.09)
CC $1/2$	99.5 (63.3)

4.1.5 Kristallstruktur

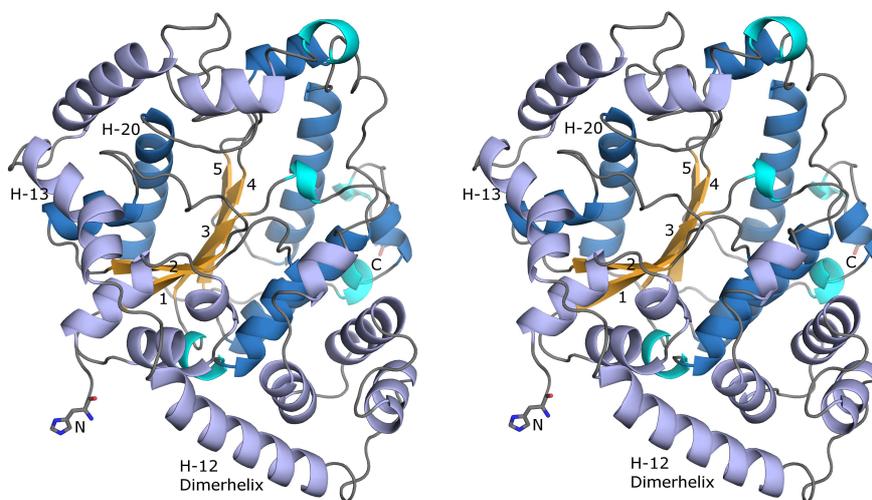
In der asymmetrischen Einheit der Kristallstruktur befinden sich zwei Proteinmoleküle. Ebenso konnten zwei Glycerinmoleküle, ein Natriumion sowie 530 Wassermoleküle platziert werden. Die Struktur ließ sich bei einer Auflösung von 1,7 Å bis zu einem R_{work} von 0,1841 und einem R_{free} von 0,2073 verfeinern (Tab. 4.4). Weder D-Alanin noch Ribitol sind in der Elektronendichte sichtbar, auch wenn diese im Überschuss zu der Kristallisationsbedingung gegeben wurden. In der Kristallstruktur sind in beiden Molekülen die Aminosäuren Histidin-36 bis Glutamin-427 sichtbar (Abb. 4.8). Das Schneiden der Proteinsequenz mittels TEV-Protease hinterlässt fünf Reste des Vektors, die in der Kristallstruktur nicht erkennbar sind. Zusätzlich sind die DltD-zugehörigen Aminosäuren Threonin-33, Glutamat-34 und Methionin-35 nicht in der Kristallstruktur sichtbar. Den N-terminalen Rest in der Kristallstruktur bildet Histidin-36. In der nativen Form ist diesem Rest ein Membrananker vorgelagert. Es wird angenommen, dass dieser Membrananker helikal vorliegt. Nähere Informationen bezüglich dieses Membranankers und der Anordnung von *SpDltD* auf der Membran sind nicht bekannt. Für flexible, lange Seitenketten, deren Elektronendichte nicht definiert waren, wurde die häufigste Konformation eingebaut und der Besetzungsgrad auf null gesetzt.

SpDltD_{tr} enthält ein zentrales β -Faltblatt, bestehend aus fünf parallelen β -Strängen. Diese fünf β -Stränge sind in der Reihenfolge 21345 angeordnet. Zusätzlich sind 23 Helices vorhanden. Diese Sekundärstrukturelemente bilden eine $\alpha/\beta/\alpha$ -Topologie. Dieses Faltungsmuster wird als Flavodoxin-ähnlich bezeichnet. Zusätzlich zu den abwechselnden α -Helices und β -Strängen des Flavodoxin-ähnlichen Faltungsmusters sind in *SpDltD_{tr}* N-terminal ein drei Helices umfassender Bereich und zwischen Strang drei und Strang vier ein zehn Helices umfassender Bereich vorhanden (Abb. 4.8, hellblau). Diese Helices grenzen dabei einen Teil des Flavodoxin-ähnlichen Faltungsmusters zur Umwelt ab.

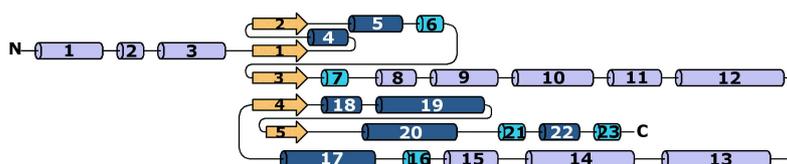
Die Analyse der Struktur mit Stride [Heinig und Frishman, 2004] ergab für fünf Helices (Molekül A) beziehungsweise vier Helices (Molekül B) eine 3_{10} -Helix anstatt der üblichen α -Helix. Dies betrifft die folgenden Aminosäuren: Methionin-121 bis Leucin-125 (Molekül A), Prolin-136 bis Tryptophan-138 (A und B), Lysin-282 bis Leucin-288 (A) bzw. Aspartat-284 bis Leucin-288 (B), Glutamat-409 bis Phenylalanin-412 (A und B) und Valin-423 bis Glutamat-425 (A und B) (Abb. 4.8, cyan). Neben den 3_{10} -Helices fallen zwei weitere Helices aufgrund ihrer Krümmung auf. Einerseits handelt es sich hierbei um Helix 13 im Bereich Glycin-229 bis Isoleucin-243 und andererseits um Helix 20 im Bereich von Leucin-383 bis Leucin-396.

Tab. 4.4: Ergebnisse der Verfeinerung der Struktur von *SpDltD_{tr}*. Die dargestellten Werte sind Teil der Ergebnisse von MolProbity [Chen *et al.*, 2009; Davis *et al.*, 2007].

Verfeinerung/Validierung	<i>SpDltD_{tr}</i>
R_{work}	0,1841
R_{free}	0,2073
Proteinatome	6452
Liganden	-
Puffermoleküle	2 Glycerol 1 Natrium
Wassermoleküle	530
<i>Rotamer outliers</i>	0,58 %
<i>Ramachandran outliers</i>	0 %
<i>Ramachandran allowed</i>	2,95 %
<i>Ramachandran favoured</i>	97,05 %
<i>r.m.s.d.</i> Winkel	0,806 °
<i>r.m.s.d.</i> Bindungen	0,007 Å
<i>average B-factor</i>	
Protein	27,64
Wasser	32,88
Sonstiges	39,74



(a) Stereodarstellung der Struktur von *SpDltD_{tr}* (Ausgangsposition).



(b) Stereodarstellung der Struktur von *SpDltD_{tr}*.

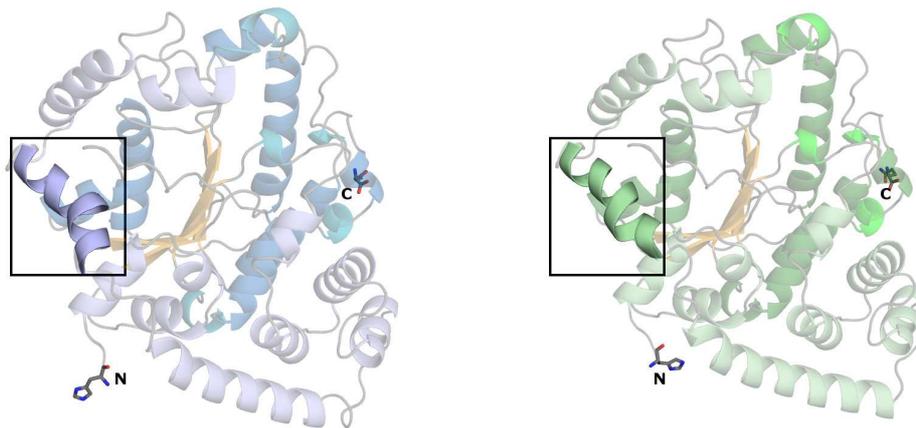
Abb. 4.8: Stereodarstellung der Struktur von *SpDltD_{tr}*. Zusätzlich zu dem Flavodoxin-ähnlichen Faltungsmuster ist eine helikale Domäne zwischen β -Strang drei und β -Strang vier vorhanden (hellblau). Die 3_{10} -Helices sind in cyan dargestellt. (a) Stereodarstellung von *SpDltD_{tr}*. (b) Schematische Darstellung des Faltungsmusters von *SpDltD_{tr}*.

Helix 13 befindet sich in der helikalen Domäne, die zwischen die β -Stränge drei und vier eingefügt ist und nicht zu dem typischen Flavodoxin-ähnlichen Faltungstyp gehört. Dabei unterscheiden sich die Helices in beiden Monomeren in der Krümmung, so dass sie einzeln betrachtet werden (Abb. 4.9 sowie Abb. 4.10). In beiden Monomeren sind die Carbonylsauerstoff- und Amidstickstoffatome so positioniert, dass neben α -Helix typischen (i+4) auch π -helikale (i+5) und 3_{10} -helikale (i+3) Wasserstoffbrückenbindungen möglich sind. Teilweise sind die Hauptkettenatome auch nicht an Wasserstoffbrückenbindungen mit nachfolgenden Aminosäuren beteiligt.

Für Molekül A (Abb. 4.9(a) und Abb. 4.10(a)) ergeben sich zusätzlich zu den typischen (i+4)-Bindungen einer α -Helix drei mögliche Wasserstoffbrückenbindungen der 3_{10} -helikalen Art. Diese werden zwischen Tyrosin-230 und Tyrosin-233, zwischen Valin-237 und Tyrosin-240 sowie zwischen Alanin-238 und Leucin-241 ausgebildet. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Tyrosin-233 und Alanin-238 sowie Aspartat-234 und Lysin-239 entsprechen π -helikalen Bindungen. Zusätzlich ist die Seitenkette von Lysin-242 in der Nähe der Carbonylgruppe von Alanin-238 positioniert. Die Seitenketten Tyrosin-240 und Histidin-236 sind dagegen über Wasserstoffbrückenbindungen mit Resten außerhalb der Helix fixiert. Durch die Wechselwirkung von Tyrosin-240 mit Phenylalanin-83 wird der Benzolring parallel zu der Seitenkette von Histidin-236 ausgerichtet. Zusätzlich ist Histidin-236 mit Valin-47 über eine Wasserstoffbrückenbindung verbunden. Diese Wechselwirkungen sind für die Ausbildung eines sogenannten π -bulge [Cartailler und Luecke, 2004] und die Krümmung der Helix verantwortlich.

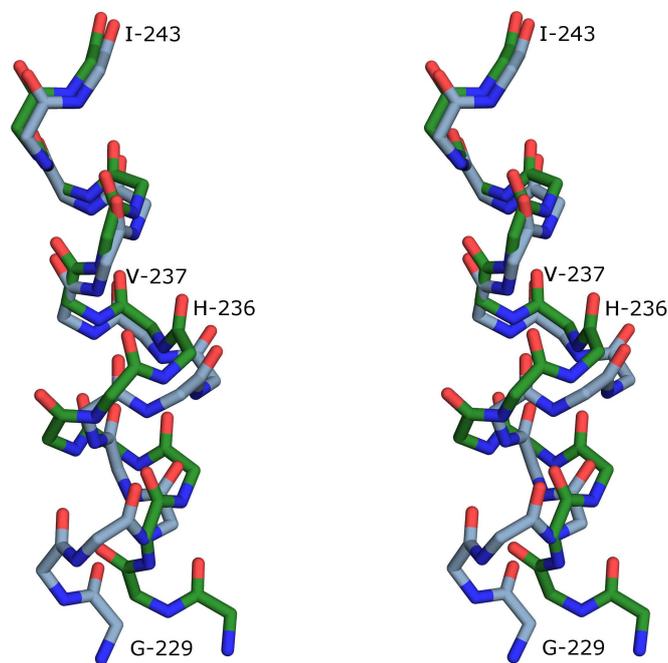
Auch in Helix 13 von Monomer B (Abb. 4.9(b) und Abb. 4.10(b)) befinden sich neben den α -helikalen Wasserstoffbrückenbindungen π -helikale Wasserstoffbrückenbindungen. Dabei führt eine solche Wechselwirkung zwischen Asparagin-232 und Tyrosin-233 zu einem π -bulge. Zusätzlich entstehen von den Carbonylsauerstoffen der Reste Aspartat-234 und Histidin-236 ausgehend keine innerhelikalen Wasserstoffbrückenbindungen. Stattdessen wird Aspartat-234 durch Wasserstoffbrücken mit der Seitenkette von Arginin-44 aus der üblichen α -helikalen Position gezogen. Die Seitenkette von Histidin-236 ist auch in diesem Monomer in der Nähe von Phenylalanin-83, das mit Tyrosin-240 über eine Wasserstoffbrücke verbunden ist.

In beiden Helices ist die α -helikale Wasserstoffbrücke des Carbonylsauerstoffs von Histidin-236 nicht vorhanden und die Seitenkette ist über Wechselwirkungen nach außen fixiert. Helix 13 besitzt nur wenig konservierte Reste und auch Histidin-236, das über Wechselwirkungen aus der Helixposition gezogen wird, ist in DltD aus verschiedenen Arten nicht konserviert.



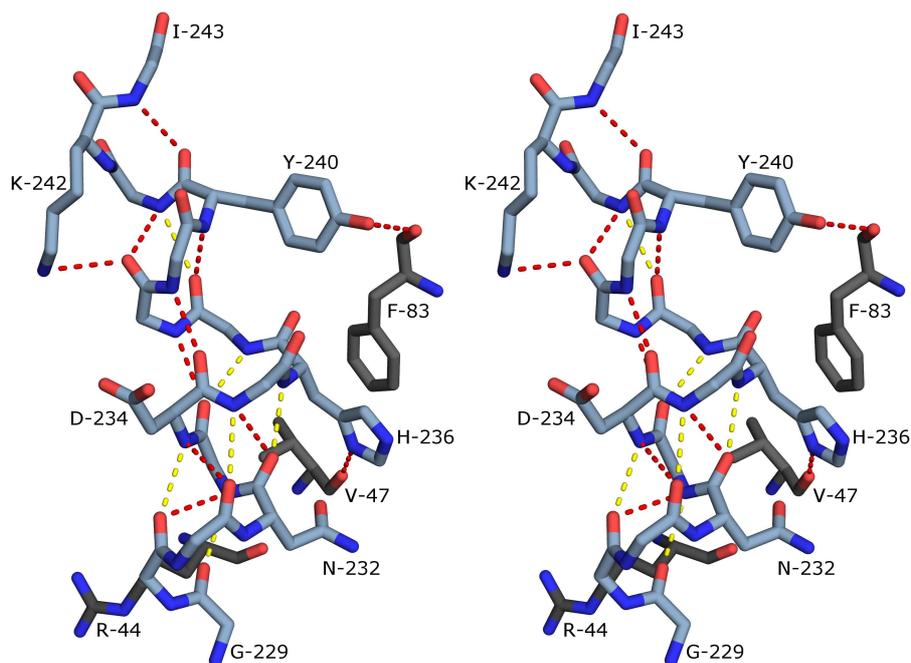
(a) Monomer A (Ausgangsposition).

(b) Monomer B (Ausgangsposition).

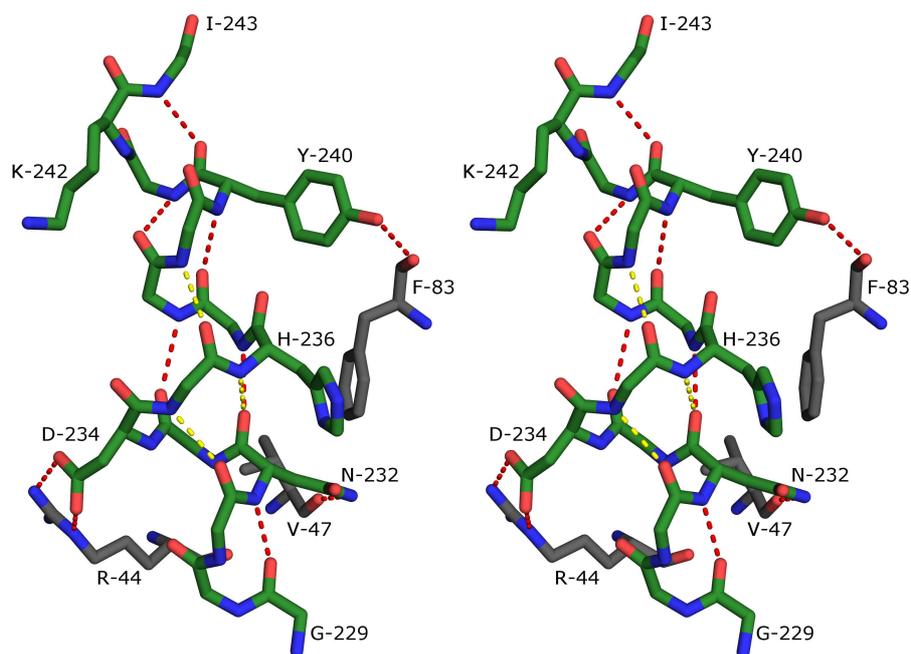


(c) Vergleich Monomer A und Monomer B.

Abb. 4.9: Stereodarstellung des Vergleichs von Helix 13 von $SpDltD_{tr}$ in beiden Monomeren. (a) Position und *cartoon*-Darstellung von Helix 13 in Monomer A. (b) Position und *cartoon*-Darstellung von Helix 13 in Monomer B. (c) Vergleich von Helix 13 in Monomer A und Monomer B. Aus Übersichtsgründen sind nur die Hauptkettenatome in *stick*-Darstellung gezeigt und wichtige Aminosäuren benannt.



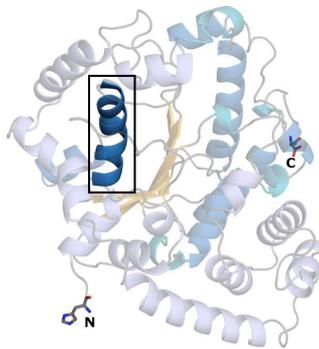
(a) Monomer A in Stereodarstellung.



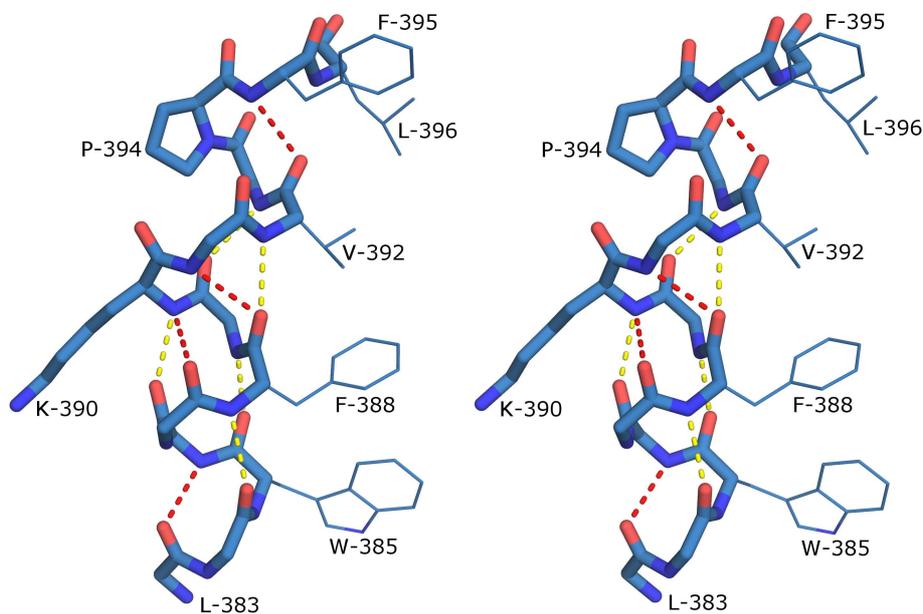
(b) Monomer B in Stereodarstellung.

Abb. 4.10: Detailansicht der Helix 13 von $SpDltD_{tr}$. Aus Übersichtsgründen sind nur die Hauptkettenatome und die wichtigsten Reste in *stick*-Darstellung gezeigt. Die typischen (i+4)-Wasserstoffbrückenbindungen sind in gelb und die zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen in rot dargestellt. Als maximaler Abstand wurden 3,2 Å gewählt. (a) Wasserstoffbrückenbindungsmuster von Helix 13 in Monomer A. (b) Wasserstoffbrückenbindungsmuster von Helix 13 in Monomer B.

Helix 20, die von den Resten Leucin-383 bis Leucin-396 gebildet wird, zeigt circa in der Mitte der Helix eine Krümmung, die in beiden Monomeren gleich ausgeprägt ist (Abb. 4.11). Dies erfolgt, da der Carbonylsauerstoff von Lysin-390 keine innerhelikale Interaktion mit Prolin-394 eingehen kann. Stattdessen ist die terminale Aminogruppe des Lysin-390 in beiden Molekülen solventexponiert und bindet in der Kristallstruktur ein in der Nähe liegendes Wassermolekül. Durch die Krümmung der Helix werden zusätzlich die hydrophoben Reste dieser amphiphatischen Helix näher zueinander gebracht. Ein Teil der Helix ist konserviert, das Prolin ist jedoch vor allem in Streptokokken konserviert. Eine weitere Aussage zur Funktionalität kann aus den vorliegenden Daten nicht entnommen werden.



(a) Monomer A (Ausgangsposition).



(b) Monomer A in Stereodarstellung.

Abb. 4.11: Stereodarstellung von Helix 20 von *SpDltD_{tr}*. Als Beispiel ist Monomer A von *SpDltD_{tr}* dargestellt. (a) Position und *cartoon*-Darstellung von Helix 20 in Monomer A. (b) Wasserstoffbrückenbindungsmuster von Helix 20 in Monomer A. Aus Übersichtsgründen sind nur die Hauptkettenatome und die wichtigsten Reste in *stick*-Darstellung gezeigt. Die typischen (i+4)-Wasserstoffbrückenbindungen sind in gelb und die zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen in rot dargestellt. Als maximaler Abstand wurden 3,2 Å gewählt.

In der asymmetrischen Einheit der Kristallstruktur sind zwei Moleküle vorhanden, die gemeinsam ein Dimer ausbilden. Die Überlagerung von Monomer B auf Monomer A ergibt einen *r.m.s.d.* Wert von 0,18 Å und nur wenige Bereiche weichen in den Monomeren voneinander ab. Dazu zählt unter anderem die vorher gezeigte Helix 13 (Abb. 4.12).

Das Dimer wird vor allem über die Helix 12 (jeweils Aminosäuren Glutamat-206 bis Glutamat-224) gebildet (Abb. 4.13). Die Interaktionsfläche beträgt 888 Å² (Berechnung mit PDBePISA [Krissinel und Henrick, 2007]) und erfolgt durch polare sowie hydrophobe Wechselwirkungen. Im C-terminalen Drittel der Helices werden vier intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen gebildet. Asparagin-215 eines jeden Moleküls bildet dabei zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit Glutamin-218 des anderen Moleküls aus (Abb. 4.14). Die weitere Betrachtung der Helix macht deutlich, dass es sich abseits der beiden genannten Reste um eine amphiphatische Helix handelt. Hierbei sind die hydrophoben Reste (Phenylalanin-214, Leucin-211, Leucin-210 und Methionin-207) in der Dimerkontaktfläche einander zugewandt, während auf der anderen Seite der Helix polare und geladene Reste auftreten. Die Dimerbildung schirmt folglich einen hydrophoben Bereich ab, der im Fall eines Monomers solvent-exponiert wäre.

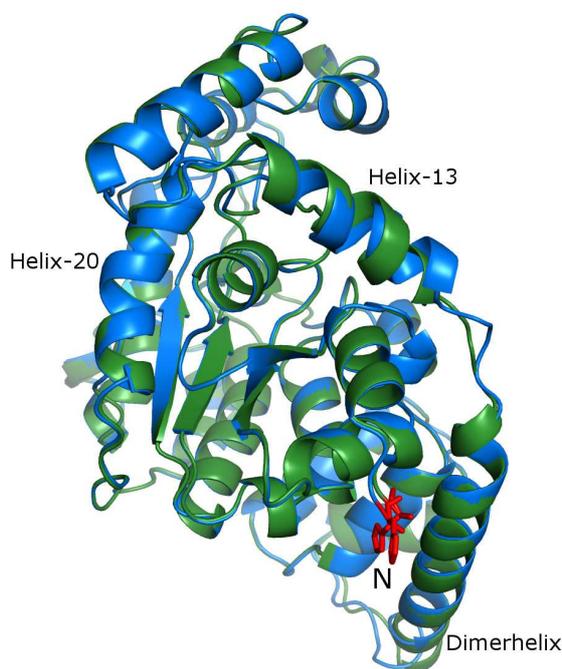


Abb. 4.12: Vergleich der Monomere von $SpDltD_{tr}$. Die Überlagerung des Monomers B (grün) auf Monomer A (blau) zeigt nur geringe Unterschiede auf. Dazu zählt unter anderem die zuvor angesprochene Helix 13. Zur Orientierung sind das N-terminale Histidin-36 (rot) und die Dimerhelix markiert.

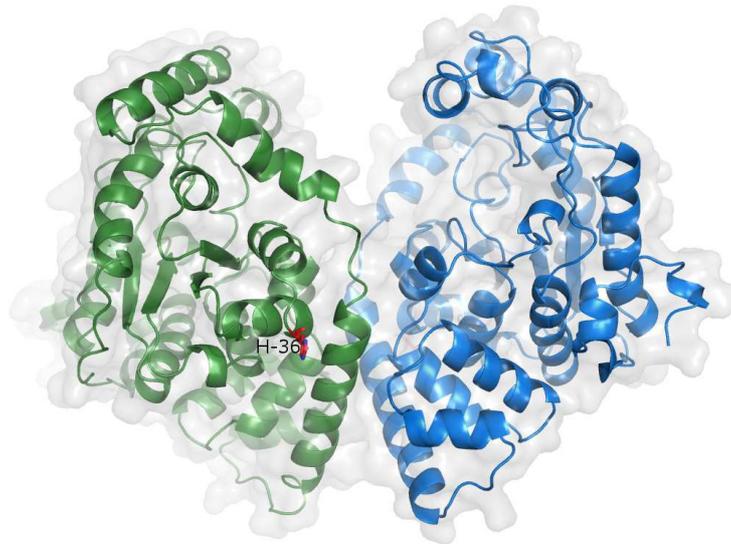


Abb. 4.13: Übersichtsdarstellung des Kristallisationsdimers von $SpDltD_{tr}$. Neben der Oberfläche in weiß-grau sind die Proteinmoleküle in blau (Molekül A) und grün (Molekül B), sowie die N-terminalen Histidin-Reste in rot dargestellt. Die Interaktion erfolgt vor allem über die Helix 12 der Aminosäuren Glutamat-206 bis Glutamin-224.

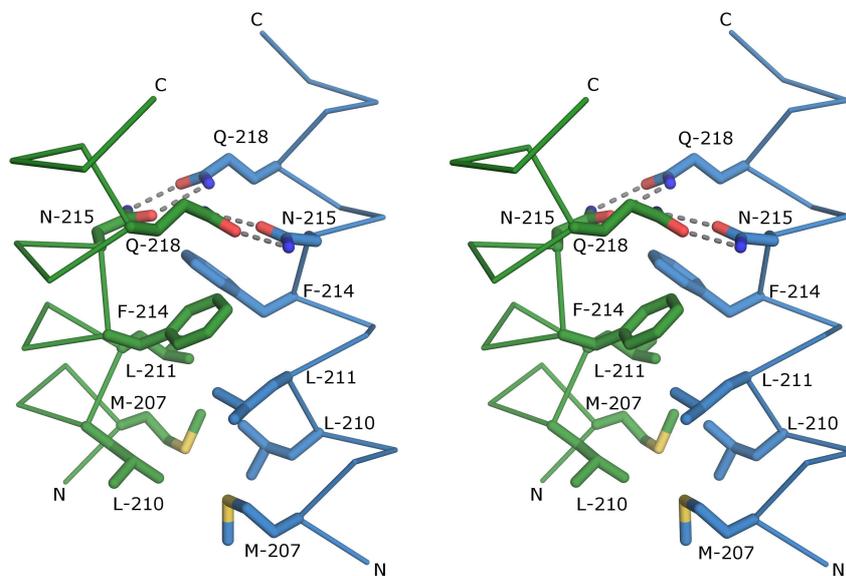


Abb. 4.14: Detailansicht der Dimerinteraktion in $SpDltD_{tr}$ -Kristallen. Die Interaktion erfolgt vor allem über die Helix 12 der Aminosäuren Glutamat-206 bis Glutamin-224 (hier dargestellt). Neben der *ribbon*-Darstellung sind die einander zugewandten, hydrophoben Reste, sowie die Wasserstoffbrückenbindungen gezeigt.

Weitere Erkenntnisse zu *SpDltD_{tr}* kann die Betrachtung der Elektrostatik sowie die Darstellung der Konservierung der Primärsequenz auf die Tertiärstruktur bringen. Zur Darstellung der Oberflächenladung wurde das APBS Tool 2.1 in Pymol genutzt [Baker *et al.*, 2001]. Hierbei werden negativ geladene Anteile in rot und positiv geladene Anteile in blau markiert. Zur Darstellung der Konservierung wurde das Ergebnis eines Multisequenzalignments von 250 Sequenzen diverser DltD-Proteine aus gram-positiven Organismen mittels ConSurf-Server als Farbcode auf die Struktur übertragen (s. Anhang Abschnitt A.4, S. X). Hohe Konservierungen werden in magenta, mittlere Konservierungen in weiß und niedrig konservierte Bereiche in cyan, sowie deren Abstufungen, dargestellt.

Werden die Darstellungen als *cartoon* sowie in der Farbcodierung der Elektrostatik und Konservierung nebeneinander betrachtet, lassen sich Auffälligkeiten erkennen (Abb. 4.15). Die Ausgangsposition (Abb. 4.15(a)) zeigt in der Elektrostatik einen zentralen Bereich mit stark negativer Ladung (intensiv rot). Darüber hinaus sind Bereiche mit schwach positiver Ladung (schwach blau) zu erkennen. Betrachtet man den erstgenannten Bereich in der Konservierungsdarstellung, so fällt eine starke Violettfärbung auf, die auf eine hohe Konservierung hinweist. Da eine hohe Konservierung mit funktionell wichtigen Bereichen übereinstimmen kann, ist dieser Bereich von besonderem Interesse und sollte einer näheren Betrachtung unterzogen werden. In den Seitenansichten (Abb. 4.15(b), Pfeil) ist auf der rechten Seite im obereren Drittel eine Kerbe zu erkennen, die circa das halbe Protein umzieht. Interessanterweise befindet sich in diesem Bereich auch der negativ geladene und hoch konservierte Bereich. Ansonsten sind vor allem positiv geladene Bereiche mit geringfügiger Konservierung sichtbar. Wird das Molekül um weitere 90° gedreht, so werden mehrere stark rot gefärbte Bereiche sichtbar (Abb. 4.15(c)). Diese Bereiche sind demnach negativ geladen. Stellt man diese Bereiche mit denen der Konservierung gegenüber, so sind diese nicht hochkonserviert. In der vierten Orientierung ist die Kerbe erneut zu erkennen. Es zeigen sich neben den positiv geladenen Bereichen in der Nähe der Kerbe auch Bereiche mit negativer Ladung (Abb. 4.15(d)). Die Konservierung ist in diesen Bereichen zumeist gering.

Mit Hilfe der Erkenntnisse aus der Konservierungsuntersuchung lässt sich ein Bereich erkennen, dessen nähere Untersuchung vielversprechend scheint. Hierbei handelt es sich um den hochkonservierten Bereich aus der ersten Darstellung, der sich in der Kerbe im oberen Drittel befindet.

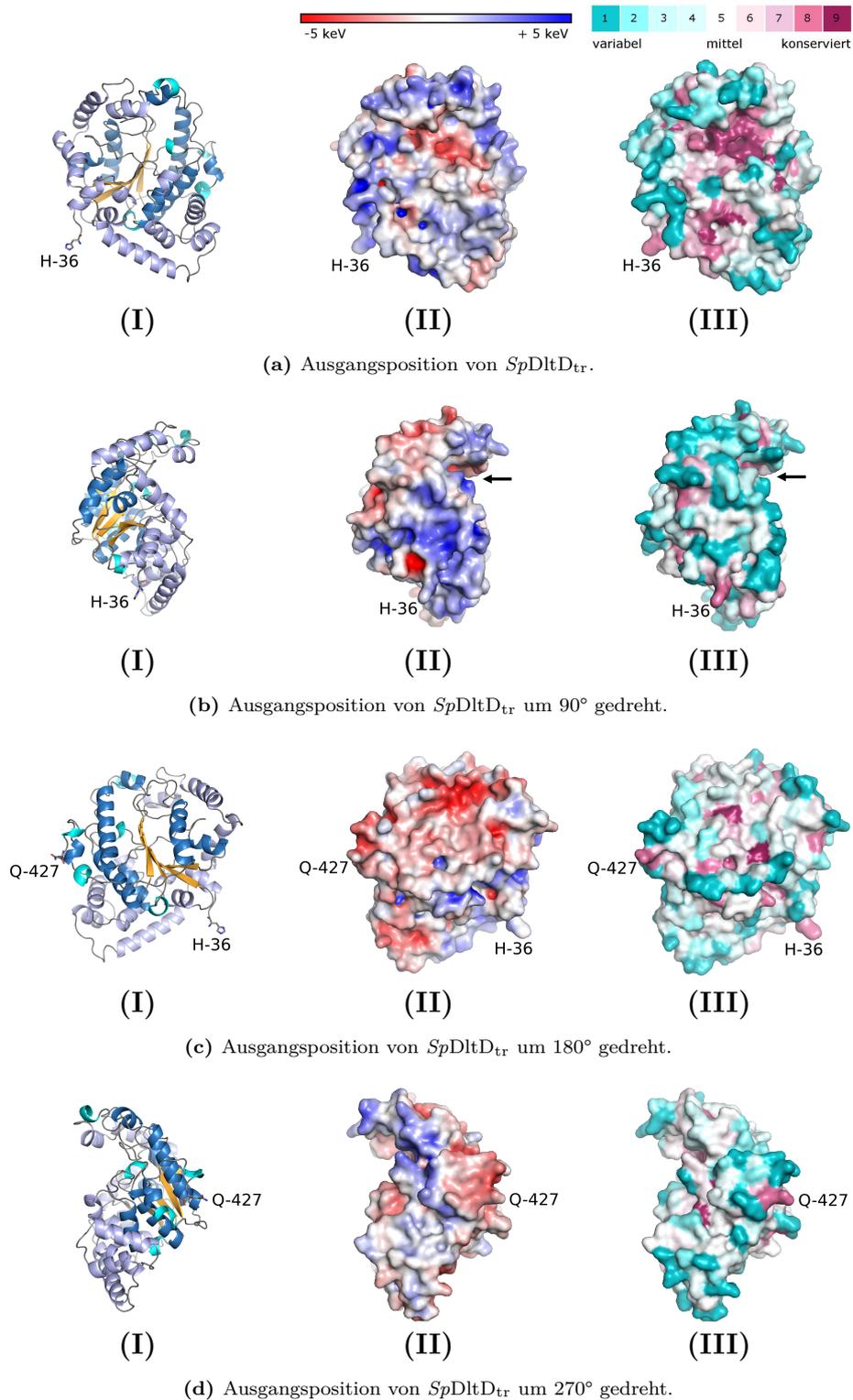


Abb. 4.15: Darstellung der Struktur, Elektrostatik und Konservierung von *SpDltD_{tr}*. Neben der *cartoon*-Darstellung (I) sind für die vier dargestellten Positionen jeweils die Elektrostatik der Oberfläche im Bereich von -5 keV bis +5 keV dargestellt (II). In blau gehalten sind positive Ladungen, während negative Ladungen in rot dargestellt sind. Zusätzlich sind Konservierungen der Primärstruktur farblich dargestellt (III). Hochkonservierte Bereiche sind in magenta, mittel konservierte in weiß und gering konservierte in cyan und deren Abstufungen dargestellt. Die Drehung erfolgte um die vertikale Achse.

4.1.6 Ähnlichkeiten zu anderen dreidimensionalen Strukturen

Mit Hilfe des DALI-Servers [Holm und Laakso, 2016] kann eine neue Proteinstruktur mit den bekannten Strukturen der Proteindatenbank verglichen werden. Somit können Proteine mit ähnlicher Struktur aufgezeigt werden. Neben dem Suchmodell der Strukturaufklärung (pdb-Code 3bma), konnten zu *SpDltD_{tr}* strukturell ähnliche Proteine gefunden werden, deren Funktion teilweise bekannt ist. Darunter befinden sich Esterasen (z. B. pdb-Codes 3mil, 2q0q, 3hp4), Hydrolasen (z. B. pdb-Codes 3dt9, 1wab) und eine Lipase (pdb-Code 4hyq) (Tab. 4.5). Das Flavodoxin-ähnliche Faltungsmuster von *SpDltD_{tr}* ist in den hier genannten Strukturen vorhanden. Als Beispiel für den Vergleich der Strukturen wird EstA hinzugezogen (pdb-Code 3hp4) [Brzuszkiewicz *et al.*, 2009].

In beiden Strukturen ist das typische fünfsträngige, parallele β -Faltblatt, das von α -Helices umgeben ist, zu erkennen. Zusätzlich sind in *SpDltD_{tr}* weitere α -Helices vorhanden, die aus Übersichtsgründen schwächer coloriert sind (Abb. 4.16(a)). Für EstA ist die katalytische Triade bekannt und das katalytische Serin-10 enthält in der Kristallstruktur ein kovalent gebundenes Monoethylphosphonat. Dieses stammt von DNP (Diethyl p-Nitrophenylphosphat) [Brzuszkiewicz *et al.*, 2009]. DNP, unter anderem ein Inhibitor von Acetylcholin, ist als Inhibitor aktiver Serine bekannt [Lo *et al.*, 2003; Levisson *et al.*, 2012; Franklin *et al.*, 2016]. Neben Serin-10 besteht die katalytische Triade in EstA aus Aspartat-158 und Histidin-161. Obwohl die Funktion von *SpDltD_{tr}* bisher nicht genau geklärt ist, wäre eine Hydrolase- oder (Trans)-Esteraseaktivität mit entsprechenden katalytischen Resten mit den Modellen vereinbar (Abschnitt 1.10, S. 15). Die Überlagerung der Struktur von EstA und *SpDltD_{tr}* zeigt neben dem ähnlichen Faltungsmuster (Abb. 4.16(a)) äquivalente Reste zu der katalytischen Triade von EstA (Abb. 4.16(b)). Hierbei handelt es sich um die Reste Serin-78, Aspartat-376 und Histidin-379. Während das Serin in beiden

Tab. 4.5: Beispiele für DALI-Ergebnisse. Der Z-Faktor ist ein Maß für die Übereinstimmung der Strukturen und sollte minimal zwei betragen. *nres = Anzahl der Reste, die der Struktur von *SpDltD_{tr}* zugeordnet werden konnten.

pdb-Code	Z-Faktor	r.m.s.d. [Å]	nres*	Sequenzidentität	vorausgesagte Funktion
3mil	10,1	3,4	238	9 %	Esterase
2q0q	8,7	3,5	215	11 %	Esterase
3hp4	8,6	3,2	183	6 %	Esterase
3dt9	9,9	3,3	212	13 %	Hydrolase
1wab	10,0	3,3	212	14 %	Hydrolase
4hyq	9,0	3,4	236	13 %	Lipase

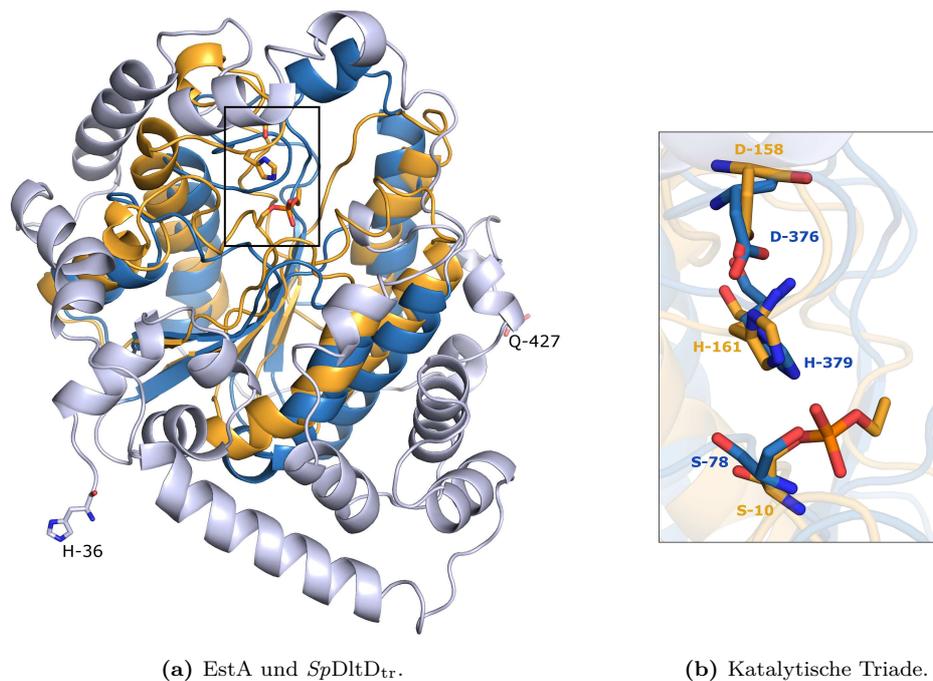


Abb. 4.16: Vergleich der Struktur von EstA mit *SpDltD_{tr}*. (a) *Cartoon*-Darstellung von EstA (gelb) und *SpDltD_{tr}* (Flavodoxin-ähnlicher Anteil in dunklem Blauton); Überlagerung nach DALI-Suche. (b) Überlagerung der katalytischen Triade von EstA (Ser-10, Asp-158, His-161) und der hypothetischen katalytischen Triade von *SpDltD_{tr}* (Ser-78, Asp-376, His-379). Die hypothetische katalytische Triade von *SpDltD_{tr}* wurde mit der katalytischen Triade von EstA überlagert.

Strukturen in einem weitläufigen *loop*, folgend auf β -Strang eins, positioniert ist, befinden sich die zwei weiteren Reste in einem *loop* nach β -Strang fünf. Bedingt durch die eingefügte α -helikale Domäne zwischen den Strängen drei und vier sind die hypothetischen katalytischen Reste Aspartat-376 und Histidin-379 in *SpDltD_{tr}* in der Primärsequenz weiter von dem hypothetisch katalytisch aktiven Serin-78 entfernt. Aufgrund des ähnlichen Faltungsmusters und der ähnlichen Anordnung der drei Reste kann vermutet werden, dass Serin-78, Aspartat-376 und Histidin-379 in *SpDltD_{tr}* eine katalytische Triade bilden. Zur Unterstützung dieser Hypothese sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

Werden die Erkenntnisse aus dem Strukturvergleich mit EstA mit den Erkenntnissen aus den Untersuchungen der Konservierung verglichen, so fällt auf, dass es sich bei der hypothetischen katalytischen Triade um den konservierten Bereich aus Abb. 4.15(a) handelt. Die Nahansicht dieses Bereiches zeigt neben der hypothetischen katalytischen Triade weitere konservierte Reste. So ist beispielsweise Glutamat-79 hoch konserviert. Als negativ geladener Rest im aktiven Zentrum könnte die Seitenkette zur Substratfixierung beitragen, indem sie die positiv geladene Aminogruppe eines D-Alanin enthaltenden Substrates über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren. Zur Untersuchung der möglichen katalytischen Triade erfolgten Inhibierungs- und Aktivitätsversuche mit *SpDltD_{tr}*.

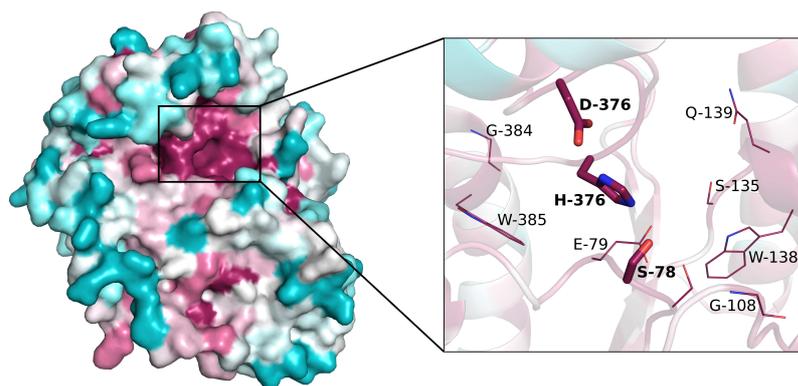


Abb. 4.17: Betrachtung der hypothetischen katalytischen Triade. Die Konservierung der Reste ist farbkodiert dargestellt (magenta = hochkonserviert, cyan = nicht konserviert). Die Reste Serin-78, Aspartat-376 und Histidin-379 bilden die hypothetische katalytische Triade. Glutamat-79 liegt in der Nähe des hypothetisch aktiven Serin-78 und könnte an der Substratfixierung beteiligt sein.

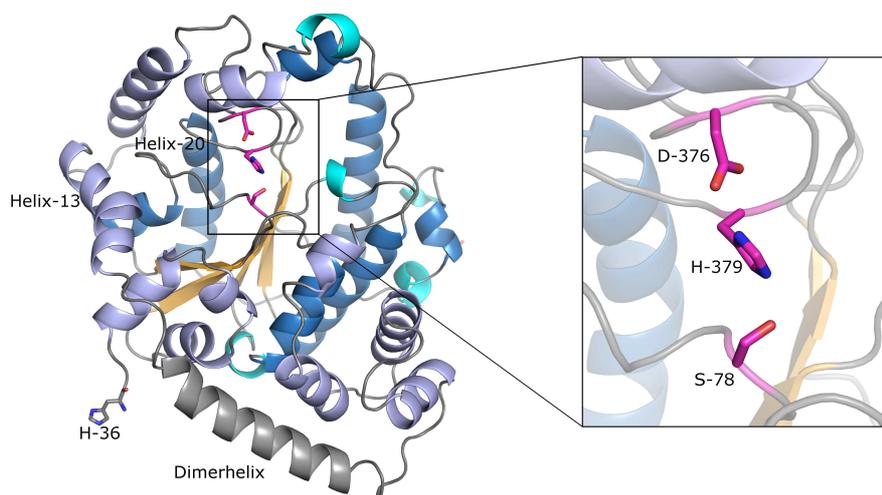


Abb. 4.18: Zusammenfassung der Struktur von *SpDltD_{tr}*. Gezeigt ist die *cartoon*-Darstellung von *SpDltD_{tr}* mit dem zentralen Flavodoxin-ähnlichen Faltungsmuster in dunkelblau und der zusätzlichen α -helikalen Domäne in hellblau. Die 3_{10} -Helices sind in cyan eingefärbt. Zusätzlich sind die Dimerinteraktionshelix in grau, und die beiden Helices mit den Krümmungen markiert. Die Nahansicht zeigt die hypothetische katalytische Triade mit Serin-78, Aspartat-376 und Histidin-379.

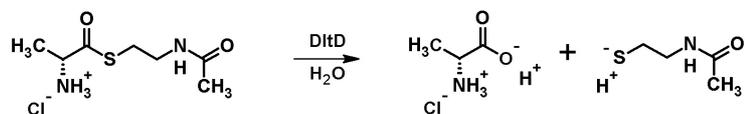
Zusammenfassend kann die Struktur von *SpDltD_{tr}* als Flavodoxin-ähnliches Faltungsmuster mit zusätzlicher überwiegend α -helikaler Domäne beschrieben werden (Abb. 4.18). Neben den typischen α -Helices besitzt die Struktur vier bzw. fünf 3_{10} -Helices (cyan), sowie zwei Helices mit Krümmung (Helix 13 und Helix 20). Die Dimerinteraktion im Kristall erfolgt über Helix-12 (grau), in der neben vier Wasserstoffbrückenbindungen hydrophobe Wechselwirkungen eine Rolle spielen. Der Vergleich der Sequenzen und Strukturen legt eine Beteiligung der Reste Serin-78, Aspartat-376 und Histidin-379 an einer katalytischen Aktivität nahe.

4.1.7 Inhibierung und Aktivitätsmessungen von *SpDltD_{tr}*

Aufgrund der bisherigen Untersuchungen der Struktur von *SpDltD_{tr}* wird für DltD eine Esterase- oder Hydrolase-ähnliche Funktion angenommen. Des Weiteren wird vermutet, dass im aktiven Zentrum ein katalytisch aktives Serin vorhanden sein könnte. Daher sollte *SpDltD_{tr}* mit verschiedenen, kovalent bindenden Serininhibitoren inkubiert und anschließend mit Hilfe der Massenspektrometrie untersucht werden. Weder die mit einem 12.800 fachen Überschuss an PMSF angesetzten Proben von *SpDltD_{tr}* noch die mit 280 fachem Überschuss an AEBSF zeigten eine kovalente Bindung des Inhibitors an das Protein. Auch der Inhibitor DNP, der in der Struktur von EstA nur teilweise sichtbar ist, wurde im 1.300 fachen Überschuss mit *SpDltD_{tr}* inkubiert. Dies führte zu keiner Erhöhung der Gesamtmasse bzw. der Massenfragmente.

Als Mimik eines DltC-Phosphopantethein-D-Alanins wurde D-Alanin-N-Acetylcysteamin (Abb. 4.19) in der Reaktion mit *SpDltD_{tr}* getestet. Der Nachweis der Reaktion beruht auf der weiteren Reaktion des freiwerdenden N-Acetylcysteamins mit DTNB (Ellmans Reagenz) und dem photometrischen Nachweis des dabei entstehenden 2-Nitro-5-thiobenzoats. In wässriger Lösung bei pH 7.0 hydrolysiert das Substrat in geringem Maße spontan und wurde als Hintergrundreaktion von den jeweiligen Werten abgezogen. Vergleicht man die Hydrolyserate in Gegenwart von *SpDltD_{tr}* mit der Hydrolyserate in dem genannten Puffer ohne Proteinzugabe, so bewirkte die Zugabe von Protein nur eine Erhöhung der Hydrolyserate um den Faktor 1,4. Eine signifikante Erhöhung des Produktes bei Zugabe von *SpDltD_{tr}* konnte nicht gezeigt werden.

Hypothetische enzymatische Spaltung:



Nachweis des Thiols mittels Ellman's Reagenz:

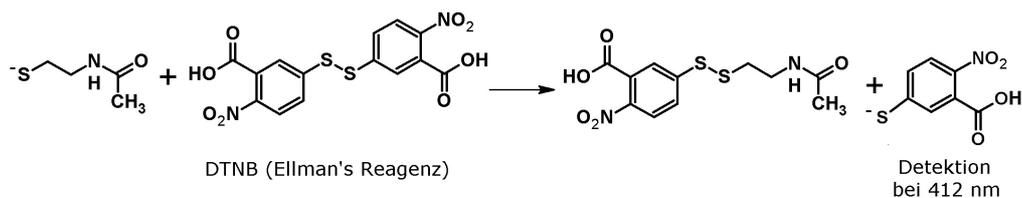


Abb. 4.19: Thioesterhydrolyse. Das Produkt der Hydrolyse des Thioesters ist ein Thiol (N-Acetylcysteamin). Dessen freie Thiolgruppe reagiert mit DTNB unter Freisetzung von 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB^{-1}). Dies kann photometrisch bei 412 nm nachgewiesen werden (Extinktionskoeffizient $\epsilon = 14.150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

4.2 Diskussion zu *SpDltD_{tr}*

In dieser Arbeit konnte die Struktur von *SpDltD_{tr}*, einem N-terminal um 32 Aminosäuren gekürzten DltD aus *S. pneumoniae* aufgeklärt werden. Parallel zur Strukturaufklärung erfolgten Experimente zur näheren Untersuchung der Funktion dieses Proteins. Dazu zählte unter anderem der Versuch Interaktionen von *SpDltD_{tr}* mit *SpDltA* und/oder *SpDltC* nachzuweisen. Zusätzlich konnten die Analysen der Struktur, Vergleiche der Struktur mit strukturell ähnlichen Proteinen sowie Sequenzvergleiche mit DltD aus verschiedenen Organismen Hinweise auf ein mögliches aktives Zentrum geben. Darüber hinaus wurde ein mögliches Substratanalogon synthetisiert und die Aktivität von *SpDltD_{tr}* gegenüber diesem Analogon getestet.

4.2.1 Interaktionen mit *SpDltA* und *SpDltC*

Bisher ist der Mechanismus der D-Alanylierung von Teichonsäuren nicht vollständig aufgeklärt worden. Daher finden sich auch unterschiedliche Hypothesen zur Aufgabe von DltD. Im Modell von Neuhaus und Baddiley (Abb. 1.10(a), S. 15) wird DltD eine moderierende Rolle in der DltA-DltC Interaktion zugeschrieben. Folglich wird in diesem Modell eine Interaktion dieser drei Proteine angenommen. Durch Immobilisierung eines gekürzten DltD aus *Lactobacillus rhamnosus* (ohne die 48 N-terminalen Aminosäuren) auf einer Nitrozellulosemembran konnte von Debabov *et al.* eine Interaktion von DltD mit DltA und DltC gezeigt werden. Neben der Erhöhung der Übertragung von D-Alanin von DltA auf DltC wurde in den Versuchen eine Hydrolyseaktivität von DltD gegenüber D-Alanin-ACP gezeigt. Da DltD in diesen Versuchen nur eine geringe Löslichkeit in Puffern zwischen pH 6 und pH 8 zeigte, wurden diese Experimente membrangebunden durchgeführt [Debabov *et al.*, 2000].

SpDltD_{tr} konnte dagegen löslich hergestellt werden. Mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation wurde weder für *SpDltC* noch für *SpDltA* oder beide zusammen eine Bindung an *SpDltD_{tr}* nachgewiesen. Die Zugabe von D-Alanin und ATP, den Edukten der DltA-Reaktion, zu dem Puffer zeigten ebenfalls keine Interaktion von *SpDltD_{tr}* mit *SpDltA* und/oder *SpDltC*. Die gewählte Methode kann eine Interaktion zwischen *SpDltA* und *SpDltC* nachweisen. Für *SpDltD_{tr}*, einem gekürzten DltD, konnte mit *SpDltA* und *SpDltC* keine Interaktion erkannt werden. Ob dies in der Kürzung begründet ist oder ob die Proteine nicht miteinander interagieren, lässt sich aus den Daten nicht erkennen.

4.2.2 Multimere von *SpDltD_{tr}*

SpDltD_{tr} zeigte in der Größenausschlusschromatographie die Aufteilung in Dimer und Monomer mit höherem Anteil an Monomer. Die Zugabe von LDAO (Lauryldimethylamin-N-oxid) führte zu einer Verschiebung des Peakmaximums der Dimerfraktion zu niedrigeren Sedimentationskoeffizienten und apparenten Molekülmassen (Anhang Seite VII). Da die apparente Molekülmasse das durchschnittliche Gewicht der gemessenen Proteine anzeigt, kann vermutet werden, dass die Zugabe von LDAO eine Erhöhung des Monomeranteils zur Folge hat. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Dimerinteraktionen auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhen.

Für die Interaktionsstudien, aber auch für die Kristallisation und weitere Experimente, wurde das Monomer von *SpDltD_{tr}* genutzt. Im Gegensatz dazu liegt *SpDltD_{tr}* in der asymmetrischen Einheit der Kristallstruktur als Dimer vor. Die Interaktion erfolgt überwiegend über die Dimerhelix (Helix 12). Ein ähnliches Dimer ist auch in der Vergleichsstruktur vorhanden. Dies wird deutlich, wenn ein Monomer, der hier aufgeklärten Struktur, mit einem Monomer der Vergleichsstruktur (pdb-Code 3bma) überlagert wird (Abb. 4.20). Im Gegensatz zur Struktur von *SpDltD_{tr}* wird in der 3bma-Struktur ein Hexamer ausgebildet. Dieses setzt sich aus drei der zuvor genannten Dimere zusammen. Die Dimerinteraktionsfläche im Hexamers beträgt durchschnittlich 954,8 Å². Zusätzlich interagiert jedes Monomer mit drei weiteren Monomeren. Die durchschnittliche Interaktionsfläche beträgt hierbei 247,8 Å² (Berechnung mit PDBePISA [Krissinel und Henrick, 2007]) und entspricht somit circa 26 % der Dimerinteraktionsfläche. Inwieweit das Hexamer in der Vergleichsstruktur auch in Lösung vorhanden war oder erst während der Kristallisation entstand, lässt sich aufgrund fehlender Daten zu vorherigen Experimenten nicht feststellen. In dem in dieser Arbeit genutzten Puffer (25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,0 bei 4 °C) konnten keine Hexamere nachgewiesen werden.

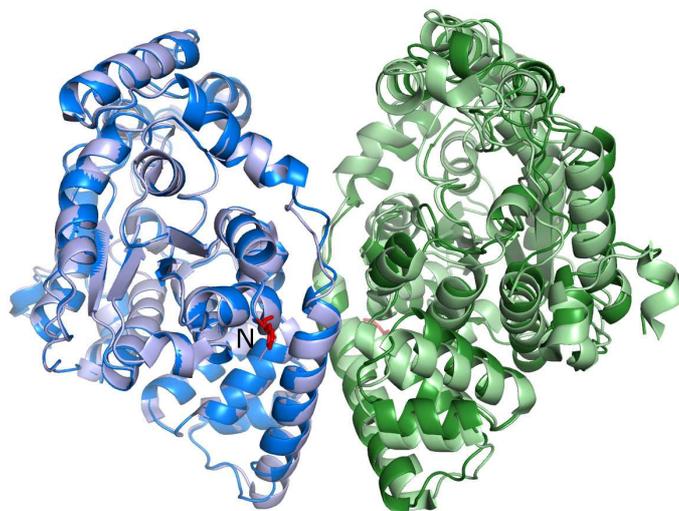


Abb. 4.20: Überlagerung des hier beschriebenen Dimers mit der Referenzstruktur. Gezeigt ist das in dieser Arbeit beschriebene Dimer (grün und blau) sowie ein Dimer der Vergleichsstruktur in helleren Farbtönen. Die Überlagerung erfolgte über Monomer A (blau). Das N-terminale Histidin-36 ist in rot hervorgehoben.

Die Frage, ob $SpDltD_{tr}$ in seiner nativen Form auch als Dimer vorliegt, ist aus den hier gezeigten Experimenten nicht zu beantworten, da mit einem gekürzten Protein gearbeitet wurde. In der Zelle wird $SpDltD$ mit einem N-terminalen hydrophoben Bereich hergestellt und darüber in der Membran verankert [Perego *et al.*, 1995]. Die genaue Orientierung des Proteins auf der Membran bleibt zu untersuchen. Sollte $DltD$ jedoch als Monomer auf der Membran vorliegen, könnten die hydrophoben Reste der amphiphatischen Helix, die die Dimerinteraktionsfläche im Kristall bilden, in die Membran eingebettet werden (schematisch dargestellt in Abb 4.21). Eine solche Orientierung würde die Zugänglichkeit des aktiven Zentrums gewährleisten. Die hypothetische Transmembranhelix könnte hierbei bis zu 35 Aminosäuren umfassen (Nummerierung bezogen auf *S. pneumoniae* R6). Mit einer durchschnittlichen Höhenverschiebung von 1,5 Å/Aminosäure in einer α -Helix könnten somit bis zu 52,5 Å überwunden werden [Kumar und Bansal, 1998].

Die Untersuchung der Bindung von $SpDltD_{tr}$ auf eine Membran könnte analog zu den Versuchen von Löw *et al.* erfolgen [Löw *et al.*, 2008]. Dazu müssten NMR-Messungen in Anwesenheit von Detergenzmizellen durchgeführt werden und dabei für jede Aminosäure der Austausch der Amidprotonen im Millisekundenbereich gemessen werden. Nur solventexponierte Reste sollten einen Amidprotonenaustausch aufweisen, während die in der Mizelle eingebetteten Reste keine Austauschreaktion zeigen dürften. Des Weiteren kann die Einbettung des Proteins in eine Lipidschicht in Untersuchungen mit der Filmwaage untersucht werden (analog zu [Schwieger *et al.*, 2017]). Dies erfordert jedoch Kenntnisse über die Zusammensetzung der Membran von *S. pneumoniae*.

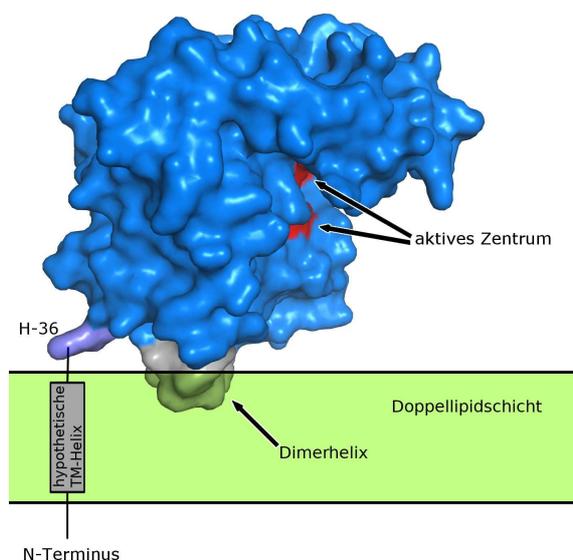


Abb. 4.21: Mögliche Position von $SpDltD_{tr}$ auf der Membran. Die Oberflächendarstellung der in dieser Arbeit gelösten Struktur von $SpDltD_{tr}$ zeigt die Dimerhelix in grau sowie das postulierte aktive Zentrum in rot. In der Kristallstruktur nicht vorhanden sind die N-terminalen 35 Aminosäuren, die möglicherweise eine Transmembranhelix ausbilden. Dieser wurde hier schematisch ergänzt. Die Abbildung ist aus Übersichtsgründen nicht maßstabgetreu.

4.2.3 Hypothetische katalytische Triade

Die Strukturvergleiche sowie die Untersuchung der Konservierung weisen auf eine katalytische Triade hin, die aus Serin-78 (Nukleophil), Asparat-376 (Säure) und Histidin-379 (Protonenakzeptor) besteht. Versuche zur Inhibierung von Serin-78 erfolgten mit drei verschiedenen Inhibitoren, die an katalytisch aktive Serine binden [Gold und Fahrney, 1964; Citron *et al.*, 1996; Ileperuma *et al.*, 2007]. Für diese Inhibitoren konnte jedoch bisher keine kovalente Bindung an *SpDltD_{tr}* nachgewiesen werden.

Eine weitere Möglichkeit, Einblicke in die Funktion von DltD zu erhalten, besteht darin mögliche Substrate zu testen. Hierzu wurde der Thioester aus D-Alanin und N-Acetylcysteamin synthetisiert. Dieser Thioester sollte als Substratanalogon anstelle von D-Alanin-DltC bzw. D-Alanin-ACP genutzt werden (Modell von Neuhaus und Baddiley [Neuhaus und Baddiley, 2003]). Da das Substrat in wässrigen Lösungen auch ohne Protein hydrolysierte, wurde diese Reaktion für jeden Versuch mitbestimmt. Die Zugabe von *SpDltD_{tr}* resultierte in einer geringen, aber nicht signifikanten Erhöhung der Hydrolyserate. In den hier gewählten Bedingungen erhöhte sie sich maximal auf das 1,4-fache der Hydrolyserate ohne Protein. Mit denen in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte eine Aktivität des Proteins gegenüber N-Acetylcysteamin-D-Alanin nicht festgestellt werden.

Neben der Vermutung, dass DltD eine Thioesteraseaktivität besitzt und D-Alanin-ACPs bzw. D-Alanin-DltC hydrolysiert, existiert eine weitere Vermutung zur Funktion von DltD. Hierbei übernimmt das Protein D-Alanin aus einer Membrankomponente und überträgt es anschließend auf die Lipoteichonsäure (Modell von Fischer [Fischer, 1994]). Somit könnten D-Alanin-Phospholipide als weitere mögliche Substratanaloga getestet werden. Neben der Entwicklung einer Synthesestrategie muss die Löslichkeit und Stabilität eines solchen Substrates in wässrigen Lösungen berücksichtigt werden. Dies erschwert die Synthese und den Einsatz eines solchen Analogons. Des Weiteren ist die Erarbeitung einer Nachweisreaktion notwendig. Eine geeignete Methode könnte in der Entwicklung eines HPLC-basierter Nachweises liegen. Eventuell erreicht das Protein auch nur unter Zugabe der Teichonsäure als D-Alaninakzeptor seine volle Reaktionsgeschwindigkeit.

Zusätzlich könnten mit *in vivo* Untersuchungen die funktionell wichtigen Aminosäuren bestimmt werden. Hierzu wären *knock out* und Rekonstitutionsstämme, sowie Stämme mit Aminosäuremutationen zu erstellen. Anschließend kann durch die Untersuchung der Teichonsäure ein Fehlen oder eine geringere Anzahl an D-Alaninen Aufschluss über die Notwendigkeit der einzelnen Aminosäuren geben. Neben den Aminosäuren der hypothetischen katalytischen Triade (Serin-78, Aspartat-376 und Histidin-379), sollte hierbei der Einfluss von Tryptophan-138 aber auch von Serin-77 und Glutamat-79 untersucht werden.

Während des Erstellens dieser Arbeit wurden von Wood *et al.* die Funktionen der analogen Aminosäurenreste der hypothetischen katalytischen Triade in DltD aus *Staphylococcus aureus* in zellbasierten und biochemischen Tests bestimmt. Hierbei wiesen Alaninmutanten des Serins sowie des Histidins, eine Verringerung der Aktivität auf. Die Mutation des Aspartats hingegen hatte auf die Reaktion nur einen geringen Einfluss. Daher wird in der Arbeit von einer katalytischen Dyade ausgegangen [Wood *et al.*, 2018]. Die Rolle des zu Glutamat-79 äquivalenten Rests wurde nicht untersucht. Dieser Rest könnte an der Fixierung der Aminogruppe des D-Alanins beteiligt sein. Wird D-Alanin manuell in die Struktur von *SpDltD_{tr}* eingearbeitet (Abb. 4.22), so erscheint das Ausbilden von Wasserstoffbrückenbindungen der Aminogruppe zu Glutamat-79 sowie Serin-77 möglich.

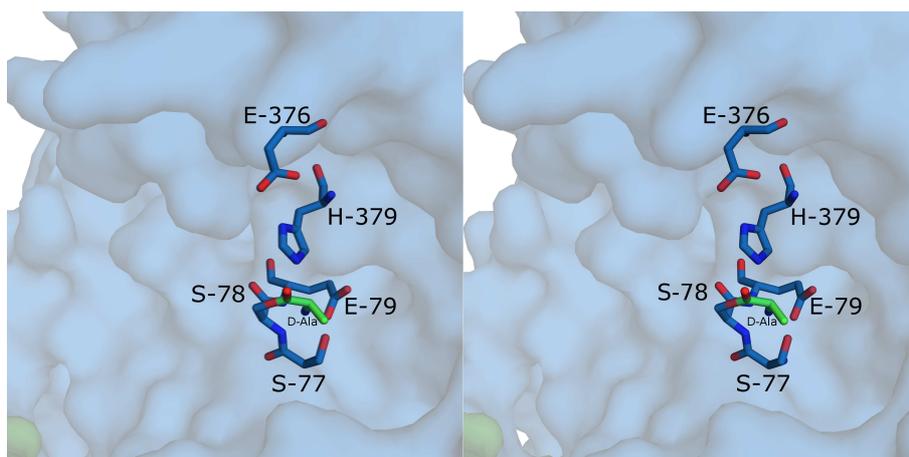


Abb. 4.22: Stereodarstellung der hypothetischen Bindung von D-Alanin an Serin-78. Die Platzierung von D-Alanin in die Struktur von *SpDltD_{tr}* erfolgte per Hand. Die Aminogruppe könnte durch Wechselwirkungen mit Glutamat-79 und Serin-77 fixiert werden.

4.2.4 Vergleich von DltD mit SGNH-Hydrolasen

Da die Funktion von DltD nicht bekannt ist, sollten Sequenz- und Strukturvergleiche weitere Erkenntnisse zu DltD erbringen. Diese Vergleiche lassen vermuten, dass es sich bei *SpDltD_{tr}* um eine SGNH-Hydrolase handelt, die eine katalytische Triade aufweist. Die in Abschnitt 4.5 (S. 92) genannten Proteine werden fast alle den SGNH-Hydrolasen zugeordnet. Diese katalysieren diverse Reaktionen, für die zumeist katalytische Triaden, bestehend aus Nukleophil, Säure und Histidin, notwendig sind. Neben dem katalytischen Serin, sowie dem Histidin der Triade sind zwei weitere Reste im aktiven Zentrum hochkonserviert (Glycin und Asparagin). Diese vier Aminosäuren sind für diese Klasse von Enzymen namensgebend (SGNH-Hydrolasen; Abb. 1.9(b), Seite 14) [Upton und Buckley, 1995]. Es stellt sich somit die Frage ob auch *SpDltD_{tr}* zu den SGNH-Hydrolasen zählt.

Die Struktur von *SpDltD_{tr}* entspricht einem Flavodoxin-ähnlichen Faltungsmuster mit einem zentralen fünfsträngigen β -Faltblatt und umgebenden α -Helices, wie er für SGNH-Hydrolasen typisch ist. Daneben sind in dieser Enzymklasse vier namensgebende Reste (Serin, Glycin, Asparagin, Histidin) sowie eine katalytische Dyade oder Triade enthalten. In SGNH-Hydrolasen befindet sich das katalytisch aktive Serin typischerweise am N-terminalen Ende des Enzyms. Zusätzlich sind die für die Aktivität notwendigen Aminosäuren Aspartat und Histidin in den SGNH-Hydrolasen häufig nur durch zwei Reste voneinander getrennt, während sie z. B. in α/β -Hydrolasen durch mindestens einen β -Strang voneinander getrennt vorliegen [Ollis *et al.*, 1992; Upton und Buckley, 1995]. Wird von der zuvor beschriebenen hypothetischen katalytischen Triade ausgegangen, so sind in *SpDltD_{tr}* sowohl das N-terminale, katalytische Serin (Serin-78) sowie die zwei Reste zwischen Aspartat-376 und Histidin-379 vorhanden. Zusätzlich befindet sich Serin-78 in einem langen *loop*, der auf β -Strang eins folgt, wie es für SGNH-Hydrolasen üblich ist [Upton und Buckley, 1995; Akoh *et al.*, 2004]. Dies spricht zunächst für eine Zuordnung von *SpDltD_{tr}* zu den SGNH-Hydrolasen. Darüber hinaus sind für die SGNH-Hydrolasen, neben der katalytischen Triade, zwei weitere Aminosäuren (Glycin und Asparagin) von Interesse. Beide Aminosäuren sind an der Stabilisierung des Anions, das in der Reaktionsfolge gebildet wird, beteiligt [Upton und Buckley, 1995; Lo *et al.*, 2003; Mølgaard *et al.*, 2000; Brzuszkiewicz *et al.*, 2009].

Die vier namensgebenden Reste der SGNH-Hydrolasen befinden sich in den von Upton *et al.* im Jahr 1995 beschriebenen typischen fünf Blöcken. Vier dieser Blöcke konnten Sequenzmotive zugeordnet werden, die auch in vielen weiteren SGNH-Hydrolasen vorhanden sind [Upton und Buckley, 1995] (Abb. 4.23). Vergleicht man die vier konservierteren Blöcke der SGNH-Hydrolasen mit der Sequenz von *SpDltD_{tr}*, so fallen neben den Gemeinsamkeiten auch Unterschiede auf (Abb. 4.23(a)).

In Block I ist die Consensussequenz GDSLx in *SpDltD_{tr}* nur zum Teil vorhanden. Anstelle des Aspartats wird die Position von Serin eingenommen. Zusätzlich ist C-terminal des katalytischen Serins ein Glutamat anstelle eines hydrophoben Leucins vorhanden. Dieser Rest könnte in *SpDltD_{tr}* eine Rolle in der Substratfixierung innehaben. Block II ist weniger stark konserviert und enthält in SGNH-Hydrolasen, neben dem namensgebenden Glycin, ein Asparagin, das in *SpDltD_{tr}* nicht vorhanden ist. In *SpDltD_{tr}* könnte die Aufgabe des Glycins von Glycin-107 beziehungsweise Glycin-108 übernommen werden. Sequenzvergleiche diverser DltDs zeigen dabei eine höhere Konservierung für Glycin-108, so dass davon ausgegangen wird, dass das namensgebende Glycin in *SpDltD_{tr}* Glycin-108 ist. Block III, mit dem namensgebenden Asparagin, zeigt in SGNH-Hydrolasen meist eine GxNx-Sequenz. In *SpDltD_{tr}* ist keiner der beiden Reste vorhanden. An die Position des Asparagins tritt bei *SpDltD_{tr}* Tryptophan-138. Die beiden weiteren katalytisch aktiven Reste Aspartat und Histidin befinden sich in Block V im DxxHx-Motiv. Für *SpDltD_{tr}* entspricht dies den Resten Aspartat-376 und Histidin-379.

Grundsätzlich kann festgestellt werden, dass die genannten Blöcke zwar in vielen SGNH-Hydrolasen gefunden werden, die hier genannten Sequenzen jedoch nur teilweise in allen bisher bekannten SGNH-Hydrolasen vorhanden sind. In *SpDltD_{tr}* ist das namensgebende Asparagin nicht vorhanden. Stattdessen wird das *oxyanion hole* wahrscheinlich unter anderem von Glycin-108 und Tryptophan-138 gebildet (Abb. 4.23(c)). Beide Reste sind in der substratfreien Struktur 5,2 Å bzw. 6,6 Å von Serin-78 entfernt. Die substratgebundene Struktur könnte jedoch, durch eine Veränderung des aktiven Zentrums, diese Reste näher zum Substrat bringen.

Sind die namensgebenden Reste Serin, Glycin, Asparagin und Histidin nicht vollständig vorhanden, werden Proteine die hinreichende Ähnlichkeit zu den SGNH-Hydrolasen aufzeigen teilweise als SGNH-Hydrolase-ähnlich bezeichnet. Beispiele hierzu wären AlgX und AlgJ. Diese beiden Proteine sind in *Pseudomonas aeruginosa* an der Modifikation von Alginat mit Acetat beteiligt. Sie katalysieren wahrscheinlich den finalen Schritt der Modifikation. Auch diese Proteine weisen anstelle des Asparagins eine aromatische Aminosäure in Block III auf (Abb. 4.23(a), pdb-Codes 4knc und 4o8v). Daneben unterscheidet sich der Aufbau des aktiven Zentrums in zwei weiteren Punkten. Es ist nur eine Aminosäure zwischen dem katalytischen Aspartat und Histidin enthalten (Block V). Das katalytische Serin (Block I) ist C-terminal angeordnet [Riley *et al.*, 2013; Baker *et al.*, 2014].

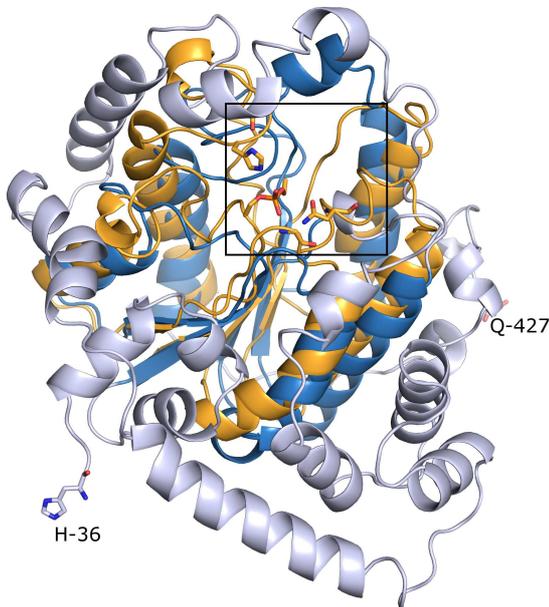
Die Ergebnisse aus den Strukturvergleichen sowie die Sequenzvergleiche lassen folglich darauf schließen, dass *SpDltD_{tr}* den SGNH-Hydrolasen sehr ähnlich ist. Anstatt des namensgebenden Asparagins weist dieses Protein an der Stelle ein Tryptophan auf. Diese Aminosäure ist in DltD aus diversen gram-positiven Bakterien hochkonserviert. Die anderen typischen Reste lassen sich zuordnen und stellen hochkonservierte Reste dar.

Pdb-Code	Block I				Block II				Block III				Block V										
	76	77	78				108				138			376	379								
<i>SpDltD</i>	G	S	S	E	W	L	L	G	Q	G	A	A	S	P	Q	W	F	D	T	I	H	L	
1jrl	G	D	S	L	S	N	A	S	I	S	G	D	T	S	G	G	N	D	D	G	I	H	P
3hp4	G	D	S	L	S	N	A	S	I	S	G	E	T	S	G	A	N	D	D	S	L	H	P
3dt9	G	D	S	L	V	N	F	G	I	G	G	D	S	T	G	T	N	N	D	Y	L	H	L
3mil	G	D	S	I	T	Q	R	G	F	K	G	Y	T	S	G	A	N	D	D	G	L	H	F
2q0q	G	D	S	L	T	E	E	G	L	S	A	R	T	T	G	T	N	D	D	G	I	H	F
4knc	G	T	S	N	S	N	A	V	S	G	G	F	K	T	H	Y	D	D	T	-	H	W	
4o8v	G	T	S	Y	S	N	Y	A	E	D	G	H	G	P	E	R	Y	L	D	H	-	H	W

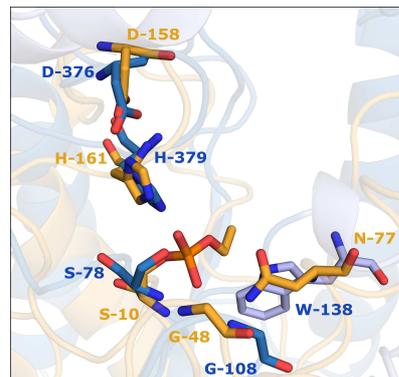
▲
▲
▲
▲

GDSLx
NxxxxGxxx
GxNx
DxxHx

(a) Vergleich der für SGNH-Hydrolasen typischen Blöcke.



(b) *SpDltD_{tr}* und EstA.



(c) Aktives Zentrum von *SpDltD_{tr}* und EstA.

Abb. 4.23: Vergleich von *SpDltD_{tr}* und EstA mit SGNH-Hydrolasen. (a) Sequenzvergleich verschiedener SGNH-Hydrolasen mit *SpDltD_{tr}*. Neben TAP I aus *E. coli* (pdb-Code 1jrl), einer repräsentativen SGNH-Hydrolase, sind die Ergebnisse der Dali-Suche gezeigt (*EstA*: pdb-Code 3hp4; *bovin brain platelet activating factor acetylhydrolase*: pdb-Code 3dt9; *isoamyl acetate-hydrolyzing esterase*: pdb-Code 3mil; *xylose isomerase domain*: pdb-Code 2q0q). Zusätzlich sind die Sequenzen von AlgX und AlgI (pdb-Codes 4knc und 4o8v) dargestellt. Markiert sind die über alle Sequenzen konservierten Aminosäuren in blau, sowie die zusätzlich konservierten Reste in grün. Die roten Pfeile deuten auf die Reste der katalytischen Triade, während durch die gelben Pfeile die zusätzlichen namensgebenden Reste markiert werden. Auffällig ist der Ersatz des namensgebenden Asparagins in *SpDltD* sowie AlgX (pdb-Code 4knc) und AlgI (pdb-Code 4o8v) durch eine aromatische Seitenkette. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf DltD aus *S. pneumoniae* R6. (b) cartoon-Darstellung von *SpDltD_{tr}* (blau) und EstA (gelb) (pdb-Code 3hp4). (c) Überlagerung der aktiven Zentren von *SpDltD_{tr}* (blau) und EstA (gelb).

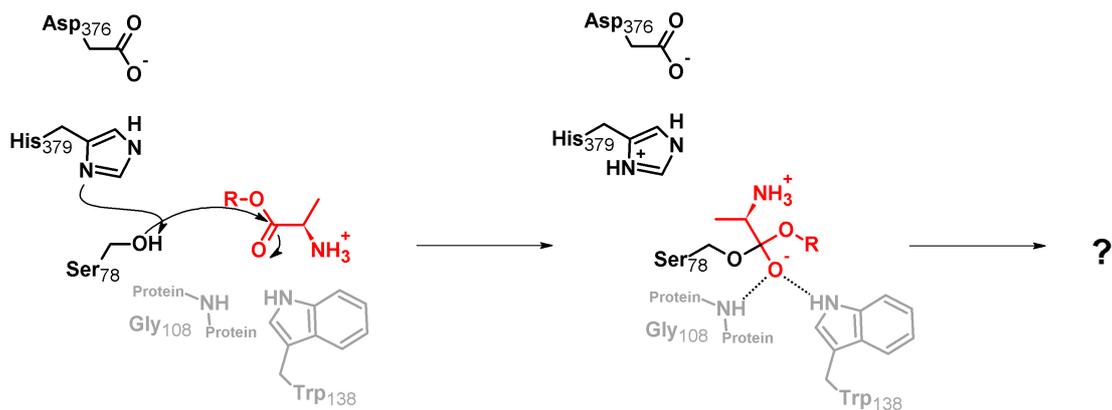


Abb. 4.24: Mögliche Reaktion von $SpDltD_{tr}$. Nach einem nukleophilen Angriff der Hydroxylgruppe von Serin-78 könnte der Übergangszustand durch die Aminosäuren Glycin-108 und Tryptophan-138 stabilisiert werden. Im Modell nach Fischer würde danach die weitere Reaktion mit der Teichonsäure folgen. Ob die Teichonsäure erst nach der hier gezeigten Reaktion an DltD bindet oder bereits vorher gebunden haben muss, bleibt zu erforschen.

Sollte DltD an dem finalen Schritt der D-Alanylierung der Lipoteichonsäure beteiligt sein (Modell von Fischer [Fischer, 1994]), so könnte die Reaktion wie folgt ablaufen: Nach der Annäherung eines D-Alaninsubstrats an das aktive Zentrum von $SpDltD$, könnte das katalytische Serin-78 nukleophil angreifen. Dabei wird das Wasserstoffion des Serins über Histidin-379 und Aspartat-376 fixiert. Das entstehende Anion kann im *oxyanion hole* unter anderem durch das Amid-Stickstoff von Glycin-108 und die Seitenkette von Tryptophan-138 stabilisiert werden. Inwiefern die Teichonsäure als Akzeptor erst anschließend gebunden wird, oder bereits vorher gebunden hat, bleibt zu erkundigen. Das D-Alanin wird danach von dem Protein auf die Teichonsäure übertragen und ein neues D-Alaninsubstrat kann im aktiven Zentrum binden (Abb. 4.24).

In Untersuchungen von DltD aus *S. aureus*, die während der Bearbeitung des Projektes veröffentlicht wurden, wird einem äquivalenten Tryptophan eine stabilisierende Rolle in der Reaktionsfolge zugewiesen. Die Mutation des Restes zu einem wesentlich kürzeren Cystein führte zu einer Veränderung der Reaktivität [Wood *et al.*, 2018]. Die Gründe für den Austausch des Tryptophans mit einem Cystein wurden dabei nicht dargestellt.

4.3 Zusammenfassung und Ausblick zu *SpDltD_{tr}*

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass die Funktion von DltD weiterhin nur bedingt bekannt ist. Allerdings deuten die hier gezeigten strukturellen Analysen zusammen mit den veröffentlichten zellbasierten Tests von DltD-Mutanten von Wood *et al.* [Wood *et al.*, 2018] auf die Existenz eines aktives Zentrum hin. Die Edukte und Produkt dieser katalytischen Aktivität sind bisher unbekannt. Die Entdeckung der potentiellen katalytischen Triade stellt jedoch eine gute Ausgangsposition für weitere Experimente dar. Hierzu bieten sich *in vivo* Untersuchungen mit *SpDltD knock-out*- und Regenerationsstämmen sowie Stämmen mit Mutationen in den aktiven Reste an. Sollte eine Mutation der genannten Reste (Serin-78, Aspartat-376, Histidin-379) ein Fehlen der D-Alanine in der Teichonsäure zur Folge haben, so wäre davon auszugehen, dass DltD eine enzymatische Rolle bei der D-Alanylierung der Teichonsäuren einnimmt. Des Weiteren könnte der Einfluss des Tryptophan-138 auf die Reaktion getestet werden. Insbesondere die Auswirkung der Substitution mit Asparagin, dem typischen Rest in SGNH-Hydrolasen, auf die Aktivität wäre von Interesse. Auch ein Einfluss der Aminosäuren Serin-77 und Glutamat-79 könnte überprüft werden. Diese befinden sich in unmittelbarer Nähe des hypothetisch katalytischen Serins-78 und könnten in die Fixierung des Substrats involviert sein.

Zusammen mit den neuen Erkenntnissen zu DltB, die eine Bindung des DltC an DltB zeigen [Ma *et al.*, 2018], kann ausgehend vom Modell von Fischer eine erweiterte Hypothese zum Ablauf aufgestellt werden: Nach der Aktivierung von D-Alanin mit ATP durch DltA, wird D-Alanin auf die prosthetische Gruppe des DltC (4'-Phosphopantethein) übertragen [Heaton und Neuhaus, 1994; Debabov *et al.*, 1996; Volkman *et al.*, 2001; Crosby und Crump, 2012]. Nachfolgend könnte DltC-D-Alanin an DltB binden und das D-alanylierte 4'-Phosphopantethein in den Trichter von DltB befördern. Die Untersuchungen von Wood *et al.* zeigen, dass für die Übertragung des D-Alanins sowohl DltD als auch DltB notwendig sind [Wood *et al.*, 2018]. Demnach könnte eine Untersuchung einer möglichen Interaktion von DltB und DltD einen weiteren Ansatz zum besseren Verständnis der Reaktion darstellen. Einen zusätzlichen Ansatz stellt die Untersuchung der amphiphatischen Helix und die Bindung von DltD an die Membran dar.

Zusammenfassung

Die Zellwand gram-positiver Bakterien besteht aus einer Peptidoglykanschicht mit integrierten Teichonsäuren. Diese anionischen Polymere können mit D-Alanin modifiziert werden. In diesen Prozess sind vier Proteine involviert, die im *dlt*-Operon codiert werden [Heaton und Neuhaus, 1992]. Neben den bereits detailliert untersuchten Proteinen DltA und DltC, die D-Alanin aktivieren und transportieren, sind die beiden membranständigen Proteine DltB und DltD bisher nicht vollständig charakterisiert worden. Es ist jedoch bekannt, dass diese Proteine für die D-Alanylierung der Teichonsäuren essentiell sind [Perego *et al.*, 1995]. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der weiteren Charakterisierung der offenen, ligandenfreien Konformation von DltA sowie der weiteren Charakterisierung von DltD.

Die offene Konformation von DltA wurde bisher aufgrund von Vergleichen mit strukturell ähnlichen Proteinen auch für DltA angenommen. Sie konnte bisher aber kristallographisch nicht nachgewiesen werden. Bisherige Kristallstrukturen zeigen entweder eine (post)-Adenylierungs- oder eine Transferkonformation. Dabei stellt die (post)-Adenylierungskonformation einen Zustand nach der Reaktion von D-Alanin und ATP zu D-Alaninadenylat dar. Nach der Freisetzung des Pyrophosphats nimmt DltA die Transferkonformation ein. Diese ermöglicht die Bindung von DltC und die Übertragung des D-Alanins an dessen 4'-Phosphopantethein. Die in dieser Arbeit gezeigte offene Konformation von *SpDltA* weist geringe Interaktionsflächen zwischen der kleinen und großen Domäne auf. Zudem sind diese in den beiden Monomeren des Kristalls unterschiedlich zueinander angeordnet. Diese Heterogenität ist auch beim Betrachten weiterer bekannter offener Konformationen auffällig.

Bezüglich der Auswirkungen der Domänenbewegung auf einzelne Reste oder Bereiche existieren Hypothesen, die teilweise in dieser Arbeit überprüft wurden. Eine dieser Hypothesen beschreibt eine Änderung der Position des Arginins im *Linker*. Der Vergleich der offenen Konformation und der Transferkonformation konnte eine signifikante Änderung der Position von Arginin-404 (*SpDltA*) nicht zeigen. Eine Aussage zur zweiten Hypothese, der Änderung der Konformation des *p-loops*, ist aufgrund fehlender Elektronendichte in der ligandenfreien Struktur nicht möglich. Die dritte Hypothese, dass Lysin-503 (*SpDltA*) eine deutliche Veränderung der Position innerhalb der Reaktion durchläuft, lässt sich allerdings erkennen. Zu Vergleichszwecken wurde neben der offenen Konformation von *SpDltA* auch die Transferkonformation per Röntgendiffraktion aufgeklärt.

Des Weiteren sollte DltD näher charakterisiert werden. Hierzu wurde ein N-terminal verkürztes Protein hergestellt ($SpDltD_{tr}$), das dem löslichen Anteil des Proteins entspricht. $SpDltD_{tr}$ liegt in Lösung größtenteils als Monomer vor. Der Dimeranteil ist gering. In dieser Arbeit konnte keine Interaktion mit $SpDltA$ und/oder $SpDltC$ gezeigt werden. Die Kristallisation und anschließende Strukturaufklärung bringen jedoch neue Erkenntnisse zur möglichen Funktion von DltD. $SpDltD_{tr}$ weist ein Flavodoxin-ähnliches Faltungsmuster auf. Es konnten Hypothesen zu funktionell wichtigen Aminosäuren aufgestellt werden. Diese ergaben sich aus dem Vergleiche mit ähnlichen Strukturen sowie Sequenzvergleiche diverser DltDs. Zunächst lassen die Strukturen auf eine hypothetische katalytische Triade schließen, deren Funktionalität aber noch detaillierter bestätigt werden muss. Hierbei handelt es sich um die drei Aminosäurereste Serin-78, Aspartat-376 und Histidin-379. Ein Thioester aus D-Alanin und Phosphopanthetein ist jedoch kein Substratanalogon für $SpDltD_{tr}$. Es müssen weitere Substrate synthetisiert und möglicherweise zusammen mit der Teichonsäure als Akzeptor getestet werden. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass sich zwei weitere hochkonservierte Reste in der potentiellen Bindetasche befinden. Glycin-108 und Tryptophan-138 könnten hierbei eine Stabilisierung des Übergangszustandes bewirken.

Das Faltungsmuster von DltD sowie die katalytische Triade und die beiden anderen konservierten Reste legen nahe, dass es sich um eine SGNH-Hydrolase-ähnliche Struktur handelt, wie sie z. B. in Hydrolasen, Esterasen und Lipasen vorkommt. Dabei ist das typischerweise in SGNH-Hydrolasen enthaltende Aparagin durch ein Tryptophan ersetzt.

Anhang

A.1 Sequenzvergleiche

Die in dieser Arbeit genutzte DNA der Deutschen Stammdatenbank mit der Kennzeichnung DSMZ 20566 ist bisher nicht sequenziert worden. Nach der Klonierung von *SpDltA*, *SpDltC* und *SpDltD_{tr}* wurden die Plasmide sequenziert, translatiert und die Proteinsequenz mit der von *S. pneumoniae* R6, D39 und TIGR4 verglichen (siehe Abb. A.1, Abb. A.2 und Abb. A.3). Zu beachten ist, dass DltA in *S. pneumoniae* R6 normalerweise nicht in dieser Form vorkommt, da durch eine Punktmutation ein Stop-Codon und somit eine *frame shift*-Mutation eingeführt wird. Daher handelt es sich hierbei um die rekonstituierte Aminosäuresequenz, nachdem diese Mutation rückgängig gemacht wurde [Kovacs *et al.*, 2006]. Der Vergleich der Sequenzen von *SpDltC* von *S. pneumoniae* R6, D39 und TIGR4 mit der genutzten Sequenz zeigten keine Unterschiede auf (Abb. A.3). In *SpDltA* und *SpDltD_{tr}* sind die Mutationen in den Sequenzen durch rote Buchstaben markiert.

Zusätzlich sind multiple Sequenzalignments mit DltA, DltC bzw. DltD aus anderen gram-positiven Organismen gezeigt. In Abb. A.1 sind die Subdomänen von *SpDltA* in den in dieser Arbeit verwendeten Farben dargestellt. Für DltD sind in Abb. A.2 die einzelnen Aminosäuren nach Konservierungsgrad eingefärbt, wobei magenta für hohe Konservierung und cyan für niedrige Konservierung steht. Hierbei handelt es sich um eine Auswahl von DltD-Sequenzen. Die Sequenzen für das multiple Sequenzalignment zur farblichen Übertragung der Konservierung auf die Struktur (Abb. 4.15, S. 91) sind in Abschnitt A.4 auf Seite X aufgeführt. Für DltC ist jeweils das Serin markiert, an welches das 4'-Phosphopantethein kovalent angebunden wird. Bei *SpDltC* handelt es sich dabei um Serin-35.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80		
SpDltA	MSNKPIADMIETIEHFAQTQPSYPVYVNLGQEHYTGDLKADSDSLAAVIDQL-GLPEKSPVVFVGGQVEYMLATFVALTKSGHAYIP1										87
P0A399	MSNKPIADMIETIEHFAQTQPSYPVYVNLGQEHYTGDLKADSDSLAAVIDQL-GLPEKSPVVFVGGQVEYMLATFVALTKSGHAYIP1										87
Q04HZ7	MSNKPIADMIETIEHFAQTQPSYPVYVNLGQEHYTGDLKADSDSLAAVIDQL-GLPEKSPVVFVGGQVEYMLATFVALTKSGHAYIP1										87
P0A398	MSNKPIADMIETIEHFAQTQPSYPVYVNLGQEHYTGDLKADSDSLAAVIDQL-GLPEKSPVVFVGGQVEYMLATFVALTKSGHAYIP1										87
Q99ZA6	----MKDKMIDSIQFAQTQADFPVYDCLGERRTYQGLKRDSDSIAAFIDSL-ALLAKSPVLFVGAQTYDMLATFVALTKSGHAYIPV										83
P59591	----MHMDIKITIEHFAQTQADFPVYDCLGERRTYQGLKRDSDSIAAFIDSL-GLVEKSPVLFVGGQVEYMLATFVALTKSGHAYIPV										83
Q53526	MANKKIDMIATIEHFAQTQADFPVYVNLGQEHYTGDLKADSDSLAAHLDQL-DLTAQSPVVFVGGQVEYMLASVVALTKSGHAYIP1										87
Q830N0	---MEKVINMIQTIDEWARKEPQRPVYLVGQEHYTGDLKADSDSLAAHLDQL-K-TDKSAIVVYVGGQVEYMLASVVALTKSGHAYIP1										84
Q2FZW6	----MTDIIINKLQAFADNPQSIARVHTTDELTYQQLMDESSKLAHRLQ----GSKKPMILFHGMSPYMIVGMIGAIKACGGVYV										78
Q8CT93	----HADLILNHFVQEQPEAVAVRHTNDELTYQQLDESSKLAHRLQ----DSKPMILYGHMSPYMIIVGMIGAIKACGGVYV										78
P39581	----MKLHAIQTHAETYPQDADFASQGSQSLTYQQLDESSKLAHRLQ----AAQIKRISCEKSSPILVYGHMSPYMIIVGMIGAIKACGGVYV										82
Q81G39	----MKLEIQIKWAAETPDQATFVWRDAKITTYQQLDESSKLAHRLQ----YPPDRSPIMVYGHMSPYMIIVGMIGAIKACGGVYV										81
Q183T6	----MKIIEGKIKYSN--TDRALMCGDKLSYKLDNEVSDAIHVSFLKDV-YKEEDTPIVYGNKMMIMACMIGALKSGRAYVPL										79
A0A472AR74	----MTTSIIERIADAWAEKTPDFPCYEYAGTRLSYKELKRQSDAFSGFLKLIITDKEKPIIVYGHMSPMLMVAFLGSKSGRAYVVP										84
	90	100	110	120	130	140	150	160	170		
SpDltA	DSHSALERVAILEVAEPSLIIAISAFP--LEQVSTPMLNLAQVQEAFQ-QG-NNYEITHPVKGGDDNYIIFTSGTTGPKGQVQISHD										171
P0A399	DSHSALERVAILEVAEPSLIIAISAFP--LEQVSTPMLNLAQVQEAFQ-QG-NNYEITHPVKGGDDNYIIFTSGTTGPKGQVQISHD										171
Q04HZ7	DSHSALERVAILEVAEPSLIIAISAFP--LEQVSTPMLNLAQVQEAFQ-QG-NNYEITHPVKGGDDNYIIFTSGTTGPKGQVQISHD										171
P0A398	DSHSALERVAILEVAEPSLIIAISAFP--LEQVSTPMLNLAQVQEAFQ-QG-NNYEITHPVKGGDDNYIIFTSGTTGPKGQVQISHD										171
Q99ZA6	DVHSAPERLAIIEIAKPSLIIAIEEFP--LTIEGSLVSSSEIESAKL-AE-MPYERTHSVKGDDNYIIFTSGTTGPKGQVQISHD										167
P59591	DHSALERVAILEVAEPSLIIAISAFP--LEQVSTPMLNLAQVQEAFQ-QG-NNYEITHPVKGGDDNYIIFTSGTTGPKGQVQISHD										171
Q53526	DQHSALERVAILEVAEPSLIIVADDFP--IDNLQVPIVDSYQLEEIFK-QK-LSYQINHAVKGDDNYIIFTSGTTGPKGQVQISHD										167
Q830N0	DHTPKEKRIELILNVAKPTAVIAVHEWP--ELATEVPVITAEELTMMEM-HAPRHAPALMPVVTGASNYIIFTSGTTGPKGQVQISHD										169
Q2FZW6	DTSIPEDRIMKIINKVQPEFVNTDES--FESLEGEVFTIDKTSQ----DPVIFDSQIKNDNTVYIIFTSGTTGPKGQVQIEVA										159
Q8CT93	DTSVPKERVNMIIKDVQPEIIFNTSDET--LEQTNAQVLKVDSDQSQS----YPIVFDQKQNDVYIIFTSGTTGPKGQVQIEVA										159
P39581	DLSIPSERIAKIESSGAELLIIHAAGLS--IDAVGQIQTV--SAEELLENEGGSVSDQVWKEHETFYIYTSGTTGPKGQVQISAA										166
Q81G39	DLSIPADRVQRIEANSKALLSATAVT--VTDLPVRIIVSDMLKIDIFFTHKGGTNPPEHAVKGDENFYIYTSGTTGPKGQVQITYN										167
Q183T6	DISFPDRVFEVTEIKPKVLFNFSDERN--FGDINVIDMKNLYINEYQKSLDENWVDDENAYIIFTSGTTGPKGQVQISSN										164
A0A472AR74	DVSMPVERIEQIKKAADPSMFICTEELPNLLITGCPVLTQDMLDALEKHFGEVPDKEACVNNDDNYIYIYTSGTTGPKGQVQISSN										172
	180	190	200	210	220	230	240	250			
SpDltA	NLLSFTNWMITDKKFAATPSRPQMLAQPYSFDLSVMYWAPTLALGGLTFLPSVITQDFKQLFAAIFSLPIAIWTSPTSPFADMAHMLSE										259
P0A399	NLLSFTNWMITDKKFAATPSRPQMLAQPYSFDLSVMYWAPTLALGGLTFLPSVITQDFKQLFAAIFSLPIAIWTSPTSPFADMAHMLSE										259
Q04HZ7	NLLSFTNWMITDKKFAATPSRPQMLAQPYSFDLSVMYWAPTLALGGLTFLPSVITQDFKQLFAAIFSLPIAIWTSPTSPFADMAHMLSE										259
P0A398	NLLSFTNWMITDKKFAATPSRPQMLAQPYSFDLSVMYWAPTLALGGLTFLPSVITQDFKQLFAAIFSLPIAIWTSPTSPFADMAHMLSE										259
Q99ZA6	NLLSFTNWMITDKKFAATPSRPQMLAQPYSFDLSVMYWAPTLALGGLTFLPSVITQDFKQLFAAIFSLPIAIWTSPTSPFADMAHMLSE										255
P59591	NLLSFTNWMITDKKFAATPSRPQMLAQPYSFDLSVMYWAPTLALGGLTFLPSVITQDFKQLFAAIFSLPIAIWTSPTSPFADMAHMLSE										255
Q53526	NLLSFTNWMITDKKFAATPSRPQMLAQPYSFDLSVMYWAPTLALGGLTFLPSVITQDFKQLFAAIFSLPIAIWTSPTSPFADMAHMLSE										255
Q830N0	NLLSFTNWMITDKKFAATPSRPQMLAQPYSFDLSVMYWAPTLALGGLTFLPSVITQDFKQLFAAIFSLPIAIWTSPTSPFADMAHMLSE										255
Q2FZW6	NLLSFTNWMITDKKFAATPSRPQMLAQPYSFDLSVMYWAPTLALGGLTFLPSVITQDFKQLFAAIFSLPIAIWTSPTSPFADMAHMLSE										255
Q8CT93	NLLSFTNWMITDKKFAATPSRPQMLAQPYSFDLSVMYWAPTLALGGLTFLPSVITQDFKQLFAAIFSLPIAIWTSPTSPFADMAHMLSE										255
P39581	NLLSFTNWMITDKKFAATPSRPQMLAQPYSFDLSVMYWAPTLALGGLTFLPSVITQDFKQLFAAIFSLPIAIWTSPTSPFADMAHMLSE										255
Q81G39	NLLSFTNWMITDKKFAATPSRPQMLAQPYSFDLSVMYWAPTLALGGLTFLPSVITQDFKQLFAAIFSLPIAIWTSPTSPFADMAHMLSE										255
Q183T6	NLLSFTNWMITDKKFAATPSRPQMLAQPYSFDLSVMYWAPTLALGGLTFLPSVITQDFKQLFAAIFSLPIAIWTSPTSPFADMAHMLSE										255
A0A472AR74	NLLSFTNWMITDKKFAATPSRPQMLAQPYSFDLSVMYWAPTLALGGLTFLPSVITQDFKQLFAAIFSLPIAIWTSPTSPFADMAHMLSE										258
	260	270	280	290	300	310	320	330	340		
SpDltA	YFNSEKMPGITHFYFDGEEELTVKTAQKLRERFPNARIINAYGPTTEATVALSAVAVTDEMLATFKRLPIGYTKADSPFTIID--EENGNK										346
P0A399	YFNSEKMPGITHFYFDGEEELTVKTAQKLRERFPNARIINAYGPTTEATVALSAVAVTDEMLATFKRLPIGYTKADSPFTIID--EENGNK										346
Q04HZ7	YFNSEKMPGITHFYFDGEEELTVKTAQKLRERFPNARIINAYGPTTEATVALSAVAVTDEMLATFKRLPIGYTKADSPFTIID--EENGNK										346
P0A398	YFNSEKMPGITHFYFDGEEELTVKTAQKLRERFPNARIINAYGPTTEATVALSAVAVTDEMLATFKRLPIGYTKADSPFTIID--EENGNK										346
Q99ZA6	DFCQAKMPALHIFYFDGEEELTVKTAQKLRERFPNARIINAYGPTTEATVALSAVAVTDEMLATFKRLPIGYTKADSPFTIID--EENGNK										346
P59591	DFNSELPLQTHIFYFDGEEELTVKTAQKLRERFPNARIINAYGPTTEATVALSAVAVTDEMLATFKRLPIGYTKADSPFTIID--EENGNK										342
Q53526	DFWAQKPHLHIFYFDGEEELTVKTAQKLRERFPNARIINAYGPTTEATVALSAVAVTDEMLATFKRLPIGYTKADSPFTIID--EENGNK										342
Q830N0	SFDGHEPLALRTRFLFCGEEELPKPTAEKLAARFPNTAHIMTYGPTTEATVALSAVAVTDEMLATFKRLPIGYTKADSPFTIID--EENGNK										341
Q2FZW6	TLNEEQYVSLNEFFFCGEEELPHRAAKALVNRFPNARIINAYGPTTEATVALSAVAVTDEMLATFKRLPIGYTKADSPFTIID--EENGNK										322
Q8CT93	NLNEEQYVSLNEFFFCGEEELPHRAAKALVNRFPNARIINAYGPTTEATVALSAVAVTDEMLATFKRLPIGYTKADSPFTIID--EENGNK										322
P39581	GFSQDILLHADTFMFCGEEELPVSAKALLERFPNARIINAYGPTTEATVALSAVAVTDEMLATFKRLPIGYTKADSPFTIID--EENGNK										339
Q81G39	SFSSEMLPMNMTFLFCGEEELPVSAKALLERFPNARIINAYGPTTEATVALSAVAVTDEMLATFKRLPIGYTKADSPFTIID--EENGNK										340
Q183T6	EFNSKMLPESMFLFCGEEELPVSAKALLERFPNARIINAYGPTTEATVALSAVAVTDEMLATFKRLPIGYTKADSPFTIID--EENGNK										340
A0A472AR74	MNFQENRPLRTRFLFCGEEELPKPTAEKLAARFPNTAHIMTYGPTTEATVALSAVAVTDEMLATFKRLPIGYTKADSPFTIID--EENGNK										346
	350	360	370	380	390	400	410	420			
SpDltA	PNEGQEQEILVSGPAVSKGYLNNPEKTAEAFFFEF--DLPAYHTGDVGTMTDEGLLGYGRMDFQIKFNGYRLEEDVVSQNLNKSFR										430
P0A399	PNEGQEQEILVSGPAVSKGYLNNPEKTAEAFFFEF--DLPAYHTGDVGTMTDEGLLGYGRMDFQIKFNGYRLEEDVVSQNLNKSFR										430
Q04HZ7	PNEGQEQEILVSGPAVSKGYLNNPEKTAEAFFFEF--DLPAYHTGDVGTMTDEGLLGYGRMDFQIKFNGYRLEEDVVSQNLNKSFR										430
P0A398	PNEGQEQEILVSGPAVSKGYLNNPEKTAEAFFFEF--DLPAYHTGDVGTMTDEGLLGYGRMDFQIKFNGYRLEEDVVSQNLNKSFR										430
Q99ZA6	SSEGEQEIIVSGPAVSKGYLNNPEKTAEAFFFEF--DLPAYHTGDVGTMTDEGLLGYGRMDFQIKFNGYRLEEDVVSQNLNKSFR										426
P59591	PNEGQEQEILVSGPAVSKGYLNNPEKTAEAFFFEF--DLPAYHTGDVGTMTDEGLLGYGRMDFQIKFNGYRLEEDVVSQNLNKSFR										426
Q53526	ANQQEQEILVSGPAVSKGYLNNPEKTAEAFFFEF--DLPAYHTGDVGTMTDEGLLGYGRMDFQIKFNGYRLEEDVVSQNLNKSFR										430
Q830N0	PAGEIGEIVIAIGPSVSKGYLNNPEKTAEAFFFEF--DLPAYHTGDVGTMTDEGLLGYGRMDFQIKFNGYRLEEDVVSQNLNKSFR										424
Q2FZW6	--TDEGELVIEGQSVSLGYLNNPEKTAEAFFFEF--DLPAYHTGDVGTMTDEGLLGYGRMDFQIKFNGYRLEEDVVSQNLNKSFR										405
Q8CT93	--TEGELVIEGQSVSLGYLNNPEKTAEAFFFEF--DLPAYHTGDVGTMTDEGLLGYGRMDFQIKFNGYRLEEDVVSQNLNKSFR										405
P39581	PEGEKGEIVIAIGPSVSKGYLNNPEKTAEAFFFEF--DLPAYHTGDVGTMTDEGLLGYGRMDFQIKFNGYRLEEDVVSQNLNKSFR										425
Q81G39	PDGEKGEIVIAIGPSVSKGYLNNPEKTAEAFFFEF--DLPAYHTGDVGTMTDEGLLGYGRMDFQIKFNGYRLEEDVVSQNLNKSFR										425
Q183T6	KENEKGEIIIGPSVSKGYLNNPEKTAEAFFFEF--DLPAYHTGDVGTMTDEGLLGYGRMDFQIKFNGYRLEEDVVSQNLNKSFR										423
A0A472AR74	PEGEKGEIVIAIGPSVSKGYLNNPEKTAEAFFFEF--DLPAYHTGDVGTMTDEGLLGYGRMDFQIKFNGYRLEEDVVSQNLNKSFR										429
	440	450	460	470	480	490	500	510			
SpDltA	TESAVAVPRYKNDHKVQNLAVVILKDGVRQEFERDITKAIKEDLTDIMMSYHMPKFLYRDSLPLTPNGKIDIKGLINEVNRK										516
P0A399	TESAVAVPRYKNDHKVQNLAVVILKDGVRQEFERDITKAIKEDLTDIMMSYHMPKFLYRDSLPLTPNGKIDIKGLINEVNRK										516
Q04HZ7	TESAVAVPRYKNDHKVQNLAVVILKDGVRQEFERDITKAIKEDLTDIMMSYHMPKFLYRDSLPLTPNGKIDIKGLINEVNRK										516
P0A398	TESAVAVPRYKNDHKVQNLAVVILKDGVRQEFERDITKAIKEDLTDIMMSYHMPKFLYRDSLPLTPNGKIDIKGLINEVNRK										516
Q99ZA6	VASAVAVPRYKNDHKVQNLAVVILKDGVRQEFERDITKAIKEDLTDIMMSYHMPKFLYRDSLPLTPNGKIDIKGLINEVNRK										512
P59591	VKSAAVAVPRYKNDHKVQNLAVVILKDGVRQEFERDITKAIKEDLTDIMMSYHMPKFLYRDSLPLTPNGKIDIKGLINEVNRK										511
Q53526	IASAVAVPRYKNDHKVQNLAVVILKDGVRQEFERDITKAIKEDLTDIMMSYHMPKFLYRDSLPLTPNGKIDIKGLINEVNRK										516
Q830N0	VKAQAVVVPYKQ--NKVQQLIAVVPVQ--AHEFSSDFQLTKAIKELATLTDYMIIPKQFVYVQLEPLTNSNGKIDRKLGMNEVNA										506
Q2FZW6	VKEAVVVPYK--NDKVIHLGAIIVPTEV--TDNAEMTKNINKDLKSRPEYIPRKFEMWELQPLTNSNGKIDRKKIAEAVING										485
Q8CT93	VREAVVVPYK--NGKVIHLGAIIVPTEV--EDNLAMTHIKHKLKSRPEYIPRKFEMWELQPLTNSNGKIDRKKIAEAVING										485
P39581	VRSVAVIPY--PQNGTVEYLIAIVPTEV--EHEPEKEFQLTSAIKKELAAVSLPAYIPRKFVYQDHIQMTANGKIDRKKIAEAVING										503
Q81G39	VEGAVIVP--KKGKEDYLLAVVVPV--EHSPEKEFKLTSIAIKKELNLRPNVIMPRKFMYSSTPMTNGKIDRKKIAEAVING										504
Q183T6	VKAQAVVVPYK--DEKAIYLGAIIVPTEV--EKNDLSNWKMGMIKELGKYSYMIIPRKNISISEPTMNGKIDRKKIAEAVING										504
A0A472AR74	IQNCAITPK--MKDEKVDMLVAQVIPT--THDFEKEYQLSAAIKKELKEMPAYMIPRKYIYKTDFFLTMNGKIDRKLSEVNRK										510

Abb. A.1: Sequenzvergleich von DltA. Neben der genutzten Sequenz (DSMZ 20566), wurden folgende UniProt-Sequenzen verwendet: P0A399 (*Streptococcus pneumoniae* R6), Q04HZ7 (*Streptococcus pneumoniae* D39), P0A398 (*Streptococcus pneumoniae* TIGR4), Q99ZA6 (*Streptococcus pyogenes* M1), P59591 (*Streptococcus agalactiae* V), Q53526 (*Streptococcus mutans* C), Q830N0 (*Enterococcus faecalis* V583), Q2FZW6 (*Staphylococcus aureus* NCTC 8325), Q8CT93 (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228), P39581 (*Bacillus subtilis* 168), Q81G39 (*Bacillus cereus* ATCC 14579), Q183T6 (*Clostridioides difficile* 630), A0A472AR74 (*Listeria monocytogenes*). Die Subdomänen der großen Domäne sowie die kleine Domäne sind farblich markiert (rot: Subdomäne A, gelb: Subdomäne B, grün: Subdomäne C, cyan: loop zwischen den Domänen und blau: kleine Domäne). Die Mutationen sind durch rote Buchstaben dargestellt.

	1	10	20	30	40	50	60	70	
<i>SpDltC</i>	-MDIKSEVIEI	IDELFMED	-VSDMDEDLFDAGVLD	SMGTVELLIVEIENRFDIRVPVTEFGRDDWNTANKIIAGIVELQNA	79				
P63958	-MDIKSEVIEI	IDELFMED	-VSDMDEDLFDAGVLD	SMGTVELLIVEIENRFDIRVPVTEFGRDDWNTANKIIAGIVELQNA	79				
Q04HZ9	-MDIKSEVIEI	IDELFMED	-VSDMDEDLFDAGVLD	SMGTVELLIVEIENRFDIRVPVTEFGRDDWNTANKIIAGIVELQNA	79				
P63957	-MDIKSEVIEI	IDELFMED	-VSDMDEDLFDAGVLD	SMGTVELLIVEIENRFDIRVPVTEFGRDDWNTANKIIAGIVELQNA	79				
P63959	-MSIEETVIELFDRLFMED	-VSEMDEDLFDAGVLD	SLGTVELLIVELESTFNKVPVISEFGRDDWNTVTKIVGVEELQHA	79					
P0A3A1	-MDIKSEVLA	IDDLFMED	-VSSMDEDLFDAGVLD	SMGTVELLIVELESHFNIDIPVIAEFGRDDWNTANKIIVAGVTELCNA	79				
O70055	-MDIKSEVLKI	IDELFMED	-VSDMDEDLFDAGVLD	SMGTVELLIVELENHFDITVPVSEFGRDDWNTANKIEGTELRNA	79				
Q830N2	-MNIQETVLNILE	ITGTEVNVNQDIQLFEEGLLD	SLATVQLLVEIEGQLGIQVPSDFDRVWGTGPKQIQVQVLAQ	--	78				
Q2FZW4	-MEFRQVLLNLLAEVAEN	DIVKENPDVEIFEFGIIDS	EFQTVGLLLEIQNKLDIEVSI	MDFFDRDEWATPNKIVEALEELR	--	78			
Q8CPW0	-MEFRQVLLD	LAEVAENIVKENPDVEIFEFGIIDS	EFQTVGLLLEIQNKLDIEVSI	MDFFDRDEWATPNKIVEALEELR	--	78			
P39579	-MDFRQVLDVLA	AEVQDDIVKENPDIEIFEGLLD	EFQTVGLLLEIQNKLDIEVSI	MDFFDRDEWATPNKIVEALEELR	--	78			
Q81G41	MAEFKQVLD	ILEEVCENDIVKENLDVQLFEEGLLD	SFAVVSLLVEFQERLDIEVSI	SDFDRDEWATPNMVIKLEELR	--	79			
Q183T8	---	MQETVIEIFEDVLGTEIREDDLNL	LFETELLD	SLAMIEVLLIEENRGLIELQPTDLERKDMSTVNNLVKFLERK	--	76			
A0A1E7E4B5	--MAFRENVL	LEIEEITETDEVVQNTNIRLFD	DEGLLD	SMATVQLLIEIESRLDITVPVSEFDRDEWATPEMIITQLEALK	--	78			

Abb. A.3: Sequenzvergleich von DltC. Neben der genutzten Sequenz (DSMZ 20566), wurden folgende UniProt-Sequenzen verwendet: P63958 (*Streptococcus pneumoniae* R6), Q04HZ9 (*Streptococcus pneumoniae* D39), P63957 (*Streptococcus pneumoniae* TIGR4), P63959 (*Streptococcus pyogenes* M1), P0A3A1 (*Streptococcus agalactiae* V), O70055 (*Streptococcus mutans* C), Q830N2 (*Enterococcus faecalis* V583), Q2FZW4 (*Staphylococcus aureus* NCTC 8325), Q8CPW0 (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228), P39579 (*Bacillus subtilis* 168), Q81G41 (*Bacillus cereus* ATCC 14579), Q183T8 (*Clostridioides difficile* 630), A0A1E7E4B5 (*Listeria monocytogenes*). Das rot markierte Serin wird durch 4'-Phosphopantethein-Transferasen modifiziert.

A.2 Reinigung

Die dargestellten Abbildungen zeigen beispielhaft die einzelnen Schritte der Reinigung von *SpDltA*, *SpDltC* und *SpDltD_{tr}*.

SpDltA

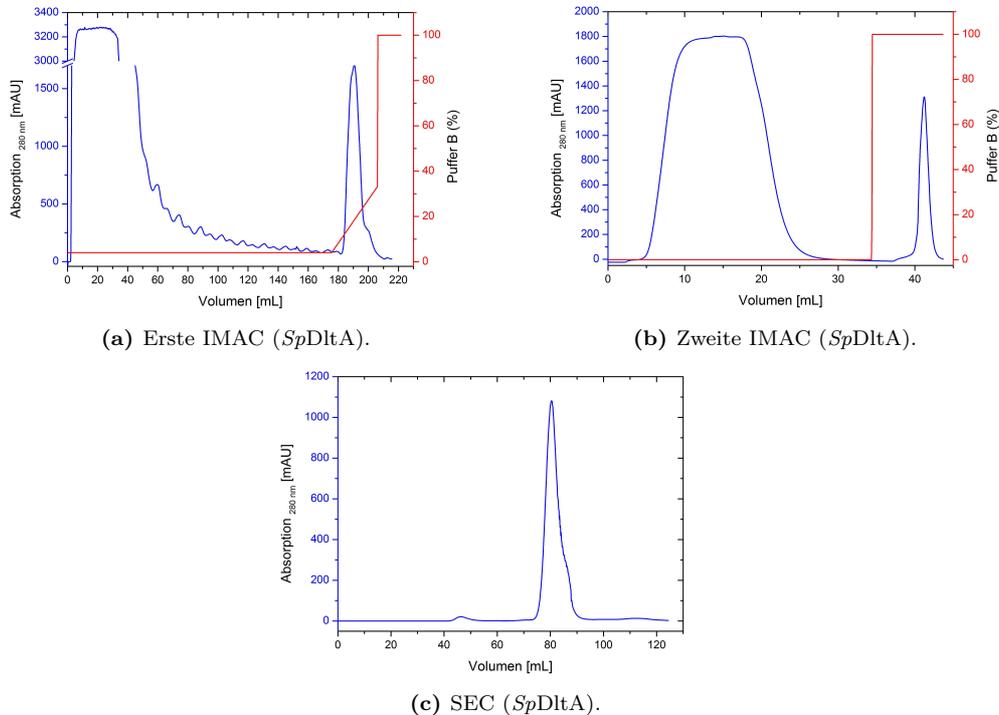


Abb. A.4: Elutionsprofile der Reinigungsschritte (*SpDltA*). *SpDltA* eluierte in der ersten IMAC ab einer Imidazolkonzentration von 75 mM.

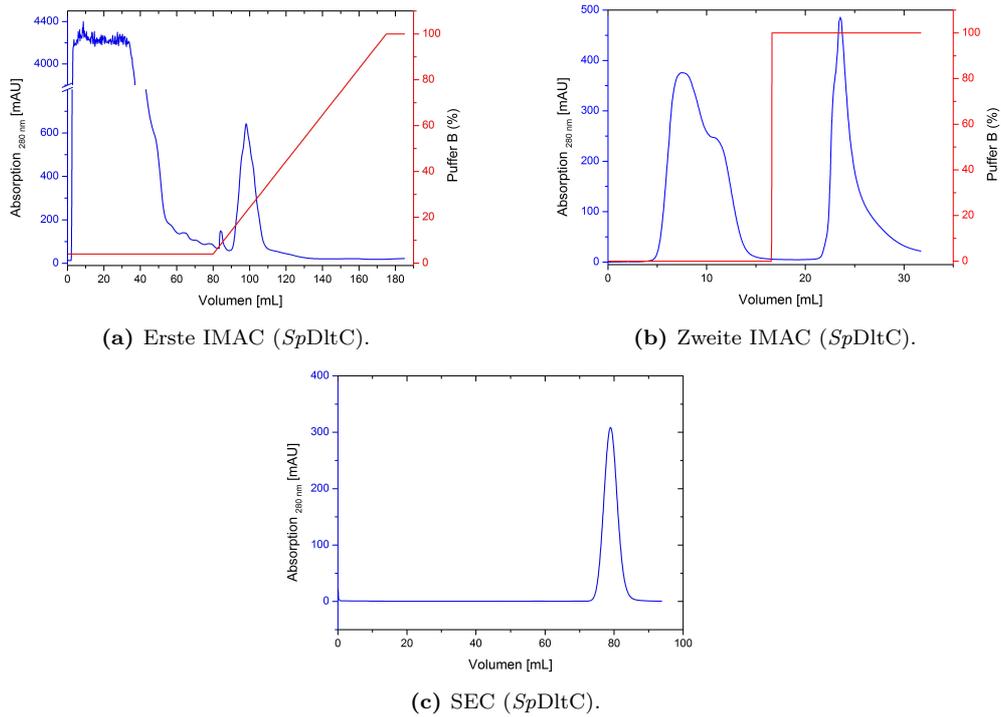
SpDltC

Abb. A.5: Elutionsprofile der Reinigungsschritte (*SpDltC*). *SpDltC* eluierte in der ersten IMAC ab einer Imidazolkonzentration von 60 mM.

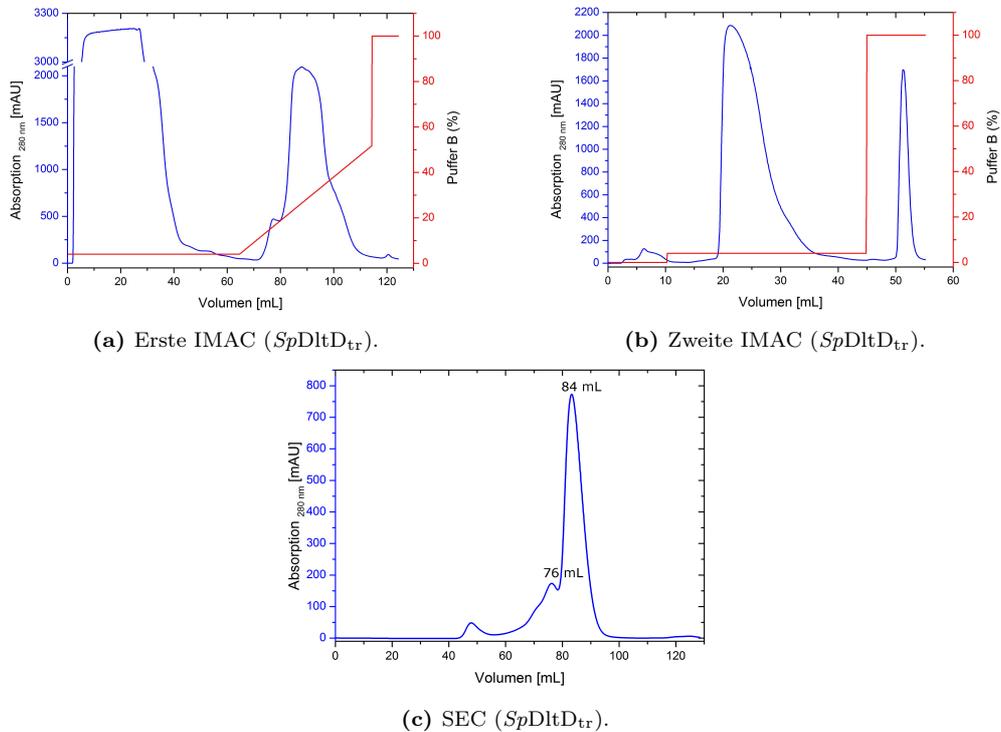
SpDltD_{tr}

Abb. A.6: Elutionsprofile der Reinigungsschritte (*SpDltD_{tr}*). *SpDltD_{tr}* eluierte in der ersten IMAC ab einer Imidazolkonzentration von 85 mM.

Übersicht Größenausschlusschromatographie

Tab. A.1: Elutionsvolumina der Größenausschlusschromatographie. Die Elutionsvolumina beziehen sich auf die Peakmaxima.

Protein	Elutionsvolumen (Maximum)
<i>SpDltA</i>	ca. 80 mL
<i>SpDltC</i>	ca. 79 mL
<i>SpDltD_{tr}</i> (Schulter)	ca. 76 mL
<i>SpDltD_{tr}</i> (Hauptpeak)	ca. 84 mL

Nach der Größenausschlusschromatographie wurden Proben des Monomers sowie des Dimers von *SpDltD_{tr}* für zwei Wochen bei 4 °C gelagert und danach erneut mittels Größenausschlusschromatographie analysiert. Ebenso wurde mit eingefrorenen Proben verfahren. Dies sollte zeigen ob und wie sich ein Gleichgewicht zwischen beiden Spezies ausbildet. Wie in Abbildung A.7 und Tabelle A.2 gezeigt, bleiben dabei die jeweiligen Spezies, bis auf einen geringen Anteil in ihrer Multimerform.

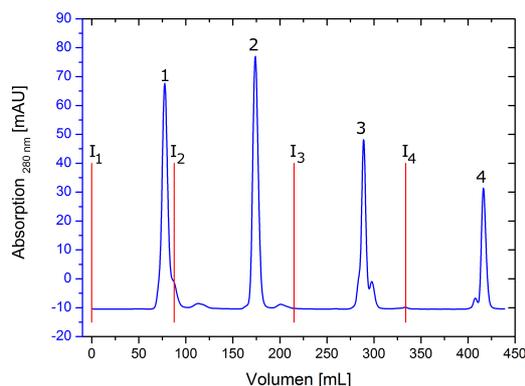


Abb. A.7: Größenausschlusschromatographie nach zwei Wochen bzw. nach dem Einfrieren. Die senkrechten roten Linien stehen für die einzelnen Injektionen (I_1 bis I_4), 1: Dimerpeak nach zwei Wochen; 2: Monomerpeak nach zwei Wochen; 3: Dimerpeak nach dem Einfrieren; 4: Monomerpeak nach dem Einfrieren.

Tab. A.2: Elutionsvolumina der Größenausschlusschromatographie. Die Werte beziehen sich auf das Maximum und stehen im Zusammenhang mit der Abbildung A.7.

Peaknummer	Injektion	Maximum	Elutionsvolumen
1	0	77	77
2	88	174	86
3	214	289	75
4	333	416	83

Untersuchung der Multimere von $SpDltD_{tr}$

Die Strukturanalyse (Abschnitt 4.1.5) lässt vermuten, dass die Interaktion auf hydrophoben Wechselwirkungen beruht. Aus diesem Grund wurden Proteinproben mit 5 mM LDAO (Lauryldimethylamin-N-oxid) versetzt, für eine Stunde inkubiert und dann mit Puffer auf 1 mM LDAO verdünnt. Die anschließende Analyse mittels analytischer Ultrazentrifugation ergab apparente Molekülmassen von 52 kDa (Peak a) und 40,2 kDa (Peak b). Die Zugabe von LDAO führt somit zu einer Abnahme der apparenten Molekülmasse in Peak a (Abb. A.8(c) und (d)). Dies weist auf eine hydrophobe Interaktion hin.

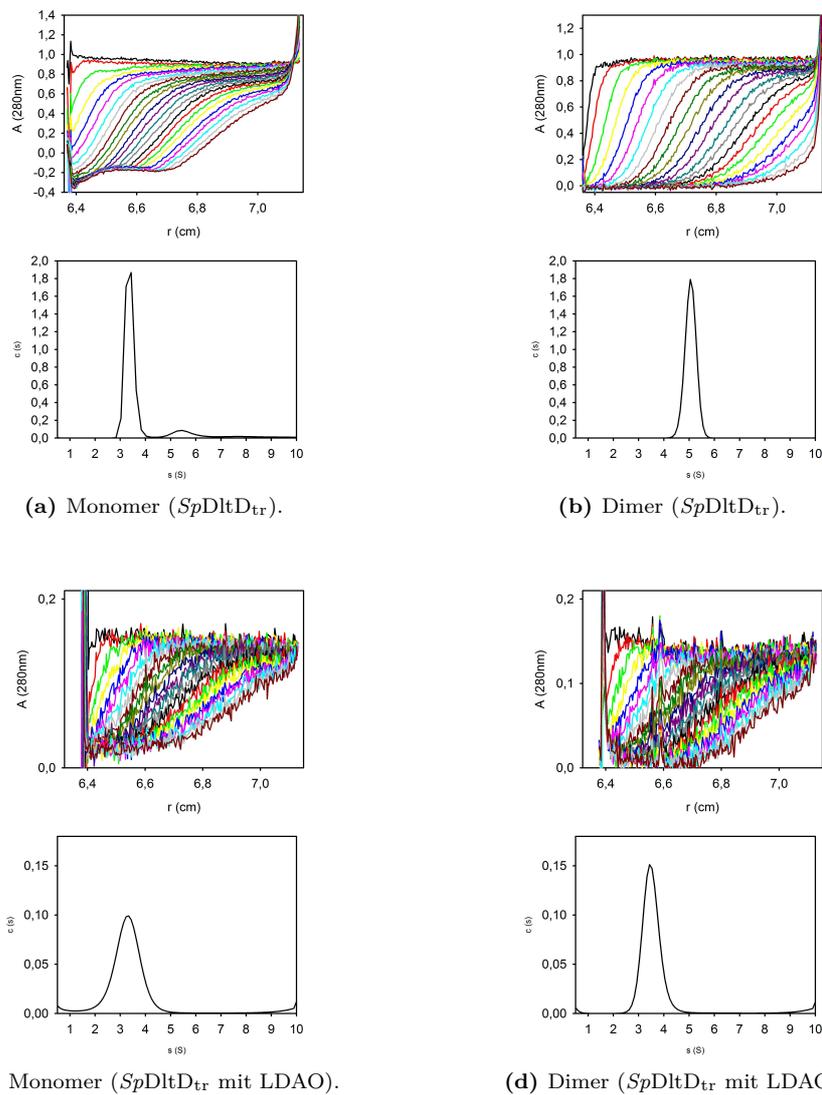


Abb. A.8: Analytische Ultrazentrifugation von $SpDltD_{tr}$. (a) Monomerpeak der Größenausschlusschromatographie von $SpDltD_{tr}$. (b) Dimerpeak der Größenausschlusschromatographie von $SpDltD_{tr}$. (c) Monomerpeak der Größenausschlusschromatographie von $SpDltD_{tr}$. (d) Dimerpeak der Größenausschlusschromatographie von $SpDltD_{tr}$.

A.3 Analyse des Syntheseprodukts

Der Thioester von D-Alanin und N-Acetylcysteamin wurde, wie im Methodenteil beschrieben, hergestellt. Anschließend erfolgte die erste Analyse mittels LC-MS. Nach der Reinigung des Substrates erfolgte eine weitere Analyse per LC-MS (Abb. A.9). Dabei ließ sich neben weiteren Nebenpeaks ein Hauptpeak bei 313 Da finden. Dies entspricht der Masse der Thioesters mit Natrium. Von diesem Zwischenprodukt ließen sich 130 mg (0,45 mmol) gewinnen. Dies entspricht einer Ausbeute von 45%. Anschließend wurde die BOC-Schutzgruppe durch Lösen von 40 mg (140 nmol) Produkt in 300 μ L Dichlormethan sowie der Zugabe von 300 μ L TFA (Trifluoressigsäure) entfernt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Produkt in Diethylether gefällt und getrocknet. Danach erfolgte die Umkristallisation mit Salzsäure. Es konnten 20 mg (88,6 nmol) des HCl-Salzes gewonnen werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 63% bei der Entfernung der Schutzgruppe. Somit ergibt sich eine theoretische Gesamtausbeute von 28,3%. NMR-Messungen wurden zur Bestätigung der Substanz vorgenommen (Abb. A.11 und Abb. A.12). Die Zuordnung der Peaks der NMR-Messungen erfolgte durch Herrn Gröger (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Physik, AG Biophysik). Hierbei beziehen sich die Ziffern auf die in Abbildung A.10 nummerierten Atome beziehungsweise die jeweiligen gebundenen Wasserstoffatome.

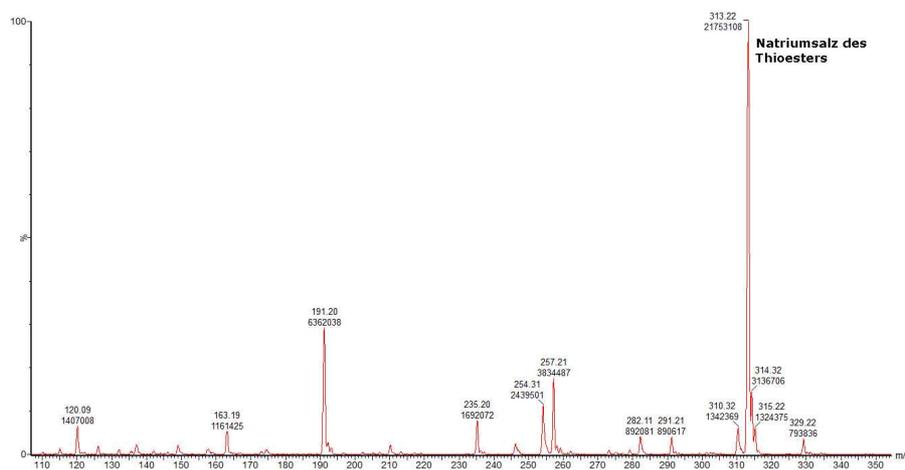


Abb. A.9: Massenspektrometrie des gereinigten Produktes.

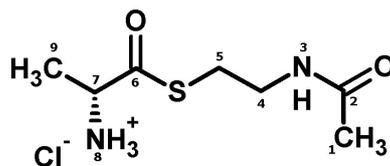


Abb. A.10: Thioester von D-Alanin und N-Acetylcysteamin. Der Thioester wurde als mögliches Substratanalogon des D-Alaninphosphopantthetins in der Reaktion mit $SpDltD_{tr}$ getestet.

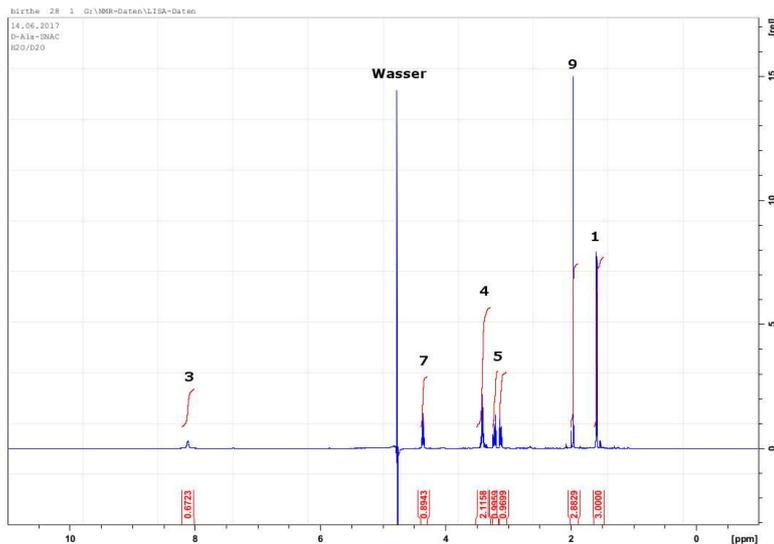


Abb. A.11: ^1H -NMR des Thioesters. Die Messung erfolgte an einem Bruker Advance 4 mit einer Protonen Resonanz bei 600,6 MHz und 32 Scans.

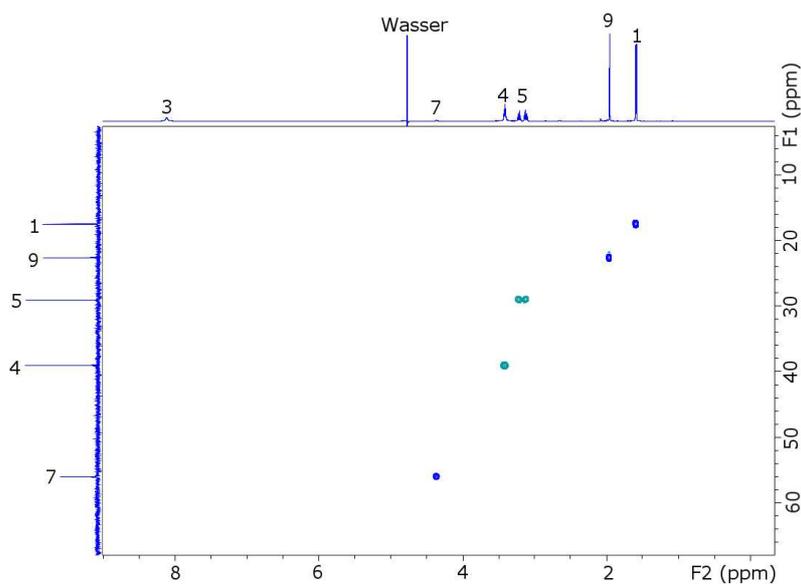


Abb. A.12: HSQC-Messung. HSQC: *heteronuclear single quantum coherence*. Dargestellt werden Korrelationen zwischen ^{13}C - und ^1H -Atomen, die direkt miteinander verbunden sind. Die Verschiebungen der ^1H -Atome werden auf der horizontalen und die Verschiebungen der ^{13}C -Atome auf der vertikalen Achse in ppm angegeben.

A.4 Multiples Sequenzalignment und Consurf

Mit den in den Methoden angegebenen Einstellungen wurde ein multiples Sequenzalignment angefertigt. Es wurden die folgenden Sequenzen (UniRef90-Codes) genutzt:

A0A081Q8G8_32_422	S7YUI0_32_422	A0A081QLB8_32_421	F9P2C1_32_422
A0A0F3HMY0_32_422	E8JXR7_32_422	F2QFY9_32_422	A0A1Q8E534_32_421
F9HET4_32_421	A0A1Q8EF99_32_419	A0A0F3HUY4_31_421	E7S8S1_32_421
UPI00083D1EE1_32_421	I1ZPM1_32_421	UPI000346A978_32_421	Q5M4V2_34_421
F5WX80_33_420	G5JQZ4_32_420	U2KHY2_32_420	G5JYB1_33_420
UPI00036F4397_32_419	H6PCA0_33_416	J3A0Q6_32_417	UPI00070FD7C3_32_419
A0A0U015J0_33_413	UPI00041CCF45_35_419	I7LRH7_32_413	G5KHD7_32_412
A0A2D4DPS0_32_411	K4QCT0_32_411	A0A2A5RYP1_13_393	UPI00041A889F_32_412
Q99ZA9_32_411	A0A0N9XWB4_33_411	Q04H05_31_416	A0A1C3YSK8_35_412
G5KAW3_32_412	A0A075TZA8_34_419	A0A0R2JHX0_33_417	UPI000370C8CE_32_412
G9WHY1_35_414	V7HX74_39_410	UPI000CD92A73_63_412	A0A0R1YIA4_46_415
A0A062X803_47_416	A0A0R1PAT0_49_413	A0A0R1VMQ0_39_413	A0A0U5JSE8_33_414
A0A0R2KW75_37_416	A0A0R1NBM2_53_416	A0A0R1LZA3_38_411	C8PAW4_48_415
I9L0A2_39_415	A0A0R1QD69_39_414	I7LAU8_50_411	A0A0R1X7Q2_32_413
A0A1E7XJ94_66_419	A0A0R1Q8I0_41_411	A0A1B2IVC0_53_422	A0A2J6NLT6_34_415
A0A0R2L9L2_37_411	UPI000CFAF1C5_39_416	A0A0A0M222_1_315	A0A0R2JY60_36_411
C7XXV1_32_414	A0A0R1V724_38_415	A0A0R2M9T9_39_420	R0EPA0_33_415
F4FW57_66_423	UPI00064F1307_39_417	A0A192GZI8_33_412	A0A0R1X6P1_33_414
A0A0R2KQZ6_63_416	A0A0R1W3X4_59_412	I7KHW4_47_413	A0A2I1XNV1_49_411
A0A062XQE8_43_415	K0D9C7_42_415	M5J7F8_40_412	A0A0R2I6G4_31_412
A0A135Z2U1_62_412	A0A0R2C7K3_40_419	A0A0R1KWJ2_39_415	A0A0R1RS31_35_413
A0A1H9T8A9_61_413	A0A0R2I9L8_32_415	H1WR37_41_415	A0A0R1SN98_66_420
A0A2I2ADX5_41_415	A0A0F4KU39_40_412	R3WLR3_61_414	A0A0R1W8V7_38_412
A0A1G6H619_39_420	C8P4K2_33_414	V6DPU1_61_416	A0A0R1WXI0_59_410
D0R670_46_413	A0A176TGZ3_35_411	K0NPN3_45_407	A0A1E5KXA4_53_415
A0A0R1MA19_40_410	A0A0R1X9A7_41_413	R2QXC3_57_415	A0A0R1N4H8_41_415
A0A0R1UY6_40_414	A0A1E5H4G3_58_416	A0A139NQJ8_4_294	Q1G853_42_407
A0A0R1VPV8_42_420	S0NZT6_59_411	A0A0R1ZJA1_56_410	A0A1L8RA50_61_413
A0A0R2ADF7_38_412	A0A242AU93_56_414	A0A0R1HSH9_60_412	A0A0S3KGB5_58_412
A0A2A4DIV2_58_420	A0A0R2EUK6_42_412	A0A1E5HA18_58_413	G2SS06_46_414
A0A112VFS6_61_415	H4GI32_40_414	A0A0R2F7X5_56_411	A0A0R2MWQ7_40_418
A0A0R1GZ76_34_408	A0A0R2B7C7_50_411	A0A1L8TRW9_62_413	A0A1L8SZ18_61_413
R2VHY8_57_415	F3Y9C1_55_417	A0A248VAY2_50_416	A0A1A7T2S3_61_414
A0A2C9XTX5_40_413	A0A0R1TAE3_47_417	A0A0R2BHH8_46_416	SORZI6_62_414
A0A1J0A772_57_411	A0A1D2K0B1_43_413	G6CC81_33_416	A0A022N7P8_56_413
A0A1Q2D3U9_63_415	W7CS92_56_411	S4DAT1_54_411	K8ZAN9_59_411
A0A0R1JS54_62_409	A0A0H4R0B4_34_413	A0A0R2LEK7_29_408	A0A2N7AS37_39_414
A0A0R1KGV5_36_408	A0A1P8Q0D7_39_414	C5IY24_57_425	A0A0K2LA03_40_414
A0A166UE91_49_419	A0AH89_59_412	A0A0R1QK71_33_408	UPI000B588F84_58_401
Q9S388_58_400	H7F5Q4_57_401	Q92D50_59_399	UPI00039D7240_63_401
G2ZE36_64_401	D5T594_41_313	A0A2A7G8M4_38_388	A0A2A5RIY1_41_401
A0A2A7WWA7_53_402	A0A090YKM2_42_391	M5P0M0_56_387	A0A073K748_38_390
UPI0003F51016_48_392	W1SSX0_41_388	UPI00047D72C1_40_387	A0A0U1NSJ6_50_387
A0A268IGQ0_53_386	A0A1S2QUX2_37_387	T5HLW8_55_385	A0A076W654_37_388
J7IYG7_66_417	UPI00047E006D_38_388	A0A2N3LJL4_54_387	D7UY85_59_399
UPI000482F34B_41_389	A0A1S2RDP1_37_388	V6IUU8_58_392	A0A080UR60_61_384
UPI000C263907_60_394	W4F633_54_385	A0A2N0F165_51_383	A0A160F726_55_389
UPI000690DE3D_60_387	A0A268E3P2_62_386	UPI000426BFB7_63_385	A0A2A4CX15_56_387
A0A285P1X7_63_385	A0A268ABD8_48_385	H5XZM4_61_400	UPI000645620A_61_384
A0A120HPK6_56_390	A0A0Q3TAP1_39_388	A0A268BTB4_49_385	A0A2I0V2U4_56_389
A0A2P1TEW2_66_397	W0EBE7_60_400	A0A268FFP7_63_385	A0A0R1SMW4_12_260
A0A1J0GG15_66_398	I4D8Z9_60_398	U7PDG5_59_377	UPI000D02A306_59_377
Q4L4U8_61_372	A0A1M4SIT1_33_384	UPI0003808D1B_50_385	A0A0J1FL71_60_398
A0A1B1G575_64_380	A0A1T1GGA1_62_374	A0A291JM36_62_372	A0A0P8WKF6_69_396
I4A3U5_87_395	A0A1D4J2E8_62_379	Q49W74_62_376	A0A1F1C062_60_380
C5QQN8_62_382	A0A2K3W4D4_62_374	A0A2K3YYT7_62_375	A0A1J0GFT6_64_395
A0A1D4NIQ0_62_372	E1KZI7_71_392	A0A292DH71_63_386	A0A2K4EM91_62_378
UPI000BF37182_39_312	A0A166NGK5_43_371	A0A2D3N3X38_62_373	A0A0L8EZ71_87_391
A0A223B1D9_42_385	A0A0S6UBB3_77_390	A0A2G7H745_63_390	A0A1Y3WGB9_59_384
A0A0A8HRG3_60_377	A0A1Y4MD63_54_384	W2BV24_60_384	R9M0E5_68_397
UPI00067F3DAB_64_390	W1Q3F9_56_378	R6FKJ6_60_383	UPI000D105B89_60_366
A0A069F6K8_60_377	C5NXU2_64_381	A0A2N6SES7_64_381	A0A0C1UEU5_86_385
UPI0008F19D5A_36_383			

A.5 Thiolassay

Als Mimik eines DltC-Phosphopantethein-D-Alanins sollte D-Alanin-N-Acetylcysteamin (Edukt in Abb. A.13) in der Reaktion mit $SpDltD_{tr}$ getestet werden. Der Nachweis der Reaktion beruht auf der weiteren Reaktion des frei werdenden N-Acetylcysteamins mit DTNB (Ellman's Reagenz) und dem photometrischen Nachweis des dabei entstehenden 2-Nitro-5-thiobenzoats.

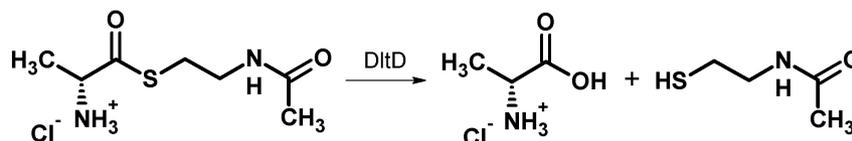


Abb. A.13: Thioesterhydrolyse. Das Produkt der Hydrolyse des Thioesters ist ein Thiol (N-Acetylcysteamin), welches über DNTB (Ellman's Reagenz) nachgewiesen werden kann.

Die Messung der Reaktion erfolgte bei gleichbleibender Substratkonzentration mit vier unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (0 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM). Höhere Proteinkonzentrationen haben dabei eine geringfügig höhere Hydrolyserate zur Folge. Der Anstieg der Absorption der Vergleichsmessung ohne Protein beträgt durchschnittlich 3,2 mAU/min , während mit der höchsten Proteinkonzentration von 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ die Steigung nur 4,58 mAU/min beträgt (Tab. A.3). Die Berechnung der spezifischen Aktivität ($A_{\text{spez.}}$) erfolgte für jede Konzentration, auch wenn keine Substratsättigung erreicht wurde. Dabei zeigten sich Aktivitäten von $1,06 \cdot 10^{-4}$ bis $1,81 \cdot 10^{-4}$ U/mg (Berechnung in Gleichung (A.1), Ergebnisse in Tab. A.3). Die Gleichung ergibt sich aus $A_{\text{spez.}} = \Delta n / \Delta t \cdot m_{SpDltD_{tr}}$, der Änderung der Stoffmenge des Substrats Δn über die Zeitspanne Δt unter Berücksichtigung des Lambert-Beerschen Gesetzes (2.2).

$$A_{\text{spez.}} = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\varepsilon_{412 \text{ nm}} \cdot d \cdot c_{SpDltD_{tr}} \cdot M_{SpDltD_{tr}}} \quad (\text{A.1})$$

Der Anstieg $\Delta E / \Delta t$ ist hierbei in mAU/min angegeben. Der Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{412 \text{ nm}} = 14.150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, die Küvettenlänge $d = 1 \text{ cm}$ und die molare Masse von $SpDltD_{tr}$ beträgt $M_{SpDltD_{tr}} = 46094,97 \text{ g/mol} = 46094,97 \text{ mg/mmol}$. $c_{SpDltD_{tr}}$ ist die Endkonzentration im Ansatz ($V = 1 \text{ mL}$), z. B. $20 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

Tab. A.3: Spezifische Aktivität bei unterschiedlichen Konzentrationen.

$c_{SpDltD_{tr}}$ [M]	$\Delta E / \Delta t$ [mAU/min]	$\Delta E / \Delta t - \Delta E_0 / \Delta t$ [mAU/min]	$A_{\text{spez.}}$ [U/mg]
0	3,20	-	-
$5 \cdot 10^{-6}$	3,79	0,59	$1,81 \cdot 10^{-4}$
$10 \cdot 10^{-6}$	4,11	0,91	$1,40 \cdot 10^{-4}$
$20 \cdot 10^{-6}$	4,58	1,38	$1,06 \cdot 10^{-4}$

Literaturverzeichnis

- Abachin, E., Poyart, C., Pellegrini, E., Milohanic, E., Fiedler, F., Berche, P. und Trieu-Cuot, P. (2002). Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 43(1):1–14.
- Adam, D. (2002). Global antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50 Suppl:1–5.
- Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, 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. und Zwart, P. H. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(2):213–221.
- Afonine, P. V., Grosse-Kunstleve, R. W., Echols, N., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T. C., Urzhumtsev, A., Zwart, P. H. und Adams, P. D. (2012). Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 68:352–367.
- Akoh, C. C., Lee, G.-C., Liaw, Y.-C., Huang, T.-H. und Shaw, J.-F. (2004). GDSL family of serine esterases/lipases. *Progress in Lipid Research*, 43(6):534–552.
- Araki, Y. und Ito, E. (1989). Linkage units in cell walls of gram-positive bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 17(2):121–135.
- Archibald, A. R., Baddiley, J. und Heptinstall, S. (1973). The alanine ester content and Magnesium binding capacity of walls of *Staphylococcus aureus* H grown at different pH values. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 291(3):629–634.
- Armstrong, J. J., Baddiley, J., Buchanan, J. G. und Carss, B. (1958). Nucleotides and the bacterial cell wall. *Nature*, 181:1692–1693.
- Ashkenazy, H., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., Pupko, T. und Ben-Tal, N. (2016). ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Research*, 44(W1):W344–W350.
- Ashkenazy, H., Erez, E., Martz, E., Pupko, T. und Ben-Tal, N. (2010). ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, 38(Web Server):W529–W533.
- Baddiley, J. (1970). Structure, biosynthesis, and function of teichoic acids. *Accounts of Chemical Research*, 3(3):98–105.
- Badger, E. (1944). The structural specificity of choline for the growth of type III Pneumococcus. *Journal of Biological Chemistry*, 153(1):183–191.
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. und McCammon, J. A. (2001). Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(18):10037–10041.

- Baker, P., Ricer, T., Moynihan, P. J., Kitova, E. N., Walvoort, M. T. C., Little, D. J., Whitney, J. C., Dawson, K., Weadge, J. T., Robinson, H., Ohman, D. E., Codée, J. D. C., Klassen, J. S., Clarke, A. J. und Howell, P. L. (2014). *P. aeruginosa* SGNH hydrolase-like proteins AlgJ and AlgX have similar topology but separate and distinct roles in alginate acetylation. *PLoS Pathogens*, 10(8):e1004334.
- Baquero, F., Beltren, J. M. und Loza, E. (1991). A review of antibiotic resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 28(suppl C):31–38.
- Bassetti, M., Merelli, M., Temperoni, C. und Astilean, A. (2013). New antibiotics for bad bugs: Where are we? *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 12(1):22.
- Beeby, M., Gumbart, J. C., Roux, B. und Jensen, G. J. (2013). Architecture and assembly of the gram-positive cell wall. *Molecular Microbiology*, 88(4):664–672.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62:293–300.
- Bertsche, U., Yang, S.-J., Kuehner, D., Wanner, S., Mishra, N. N., Roth, T., Nega, M., Schneider, A., Mayer, C., Grau, T., Bayer, A. S. und Weidenmaier, C. (2013). Increased cell wall teichoic acid production and D-alanylation are common phenotypes among daptomycin-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clinical isolates. *PLoS ONE*, 8(6):e67398.
- Bhavsar, A. P. und Brown, E. D. (2006). Cell wall assembly in *Bacillus subtilis*: How spirals and spaces challenge paradigms. *Molecular Microbiology*, 60(5):1077–1090.
- Bogaert, D., de Groot, R. und Hermans, P. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: The key to pneumococcal disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 4(3):144–154.
- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R. und Casadevall, A. (2015). Through the wall: Extracellular vesicles in gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews Microbiology*, 13:620.
- Brown, S., Santa Maria, J. P. und Walker, S. (2013). Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 67:313–336.
- Brown, S., Xia, G., Luhachack, L. G., Campbell, J., Meredith, T. C., Chen, C., Winstel, V., Gekeler, C., Irazoqui, J. E., Peschel, A. und Walker, S. (2012). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* requires glycosylated wall teichoic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(46):18909–18914.
- Brzuszkiewicz, A., Nowak, E., Dauter, Z., Dauter, M., Cieśliński, H., Długołęcka, A. und Kur, J. (2009). Structure of EstA esterase from psychrotrophic *Pseudoalteromonas* sp. 643a covalently inhibited by monoethylphosphonate. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 65(9):862–865.
- Caballero, J. und Rello, J. (2011). Combination antibiotic therapy for community-acquired pneumonia. *Annals of Intensive Care*, 1(1):48.
- Cartailler, J.-P. und Luecke, H. (2004). Structural and functional characterization of π - bulges and other short intrahelical deformations. *Structure*, 12(1):133–144.

- Celniker, G., Nimrod, G., Ashkenazy, H., Glaser, F., Martz, E., Mayrose, I., Pupko, T. und Ben-Tal, N. (2013). ConSurf: Using evolutionary data to raise testable hypotheses about protein function. *Israel Journal of Chemistry*, 53(3-4):199–206.
- Chatterjee, A. N. (1969). Use of bacteriophage-resistant mutants to study the nature of the bacteriophage receptor site of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 98:519–527.
- Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S. und Richardson, D. C. (2009). MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(1):12–21.
- Childs, W. C., Taron, D. J. und Neuhaus, F. C. (1985). Biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid by *Lactobacillus casei*: Interchain transacylation of D-alanyl ester residues. *Journal of Bacteriology*, 162(3):1191–1195.
- Citron, M., Diehl, T., Capell, A., Haass, C., Teplow, D. und Selkoe, D. (1996). Inhibition of amyloid β -protein production in neural cells by the serine protease inhibitor AEBSF. *Neuron*, 17(1):171–179.
- Coates, A. R., Halls, G. und Hu, Y. (2011). Novel classes of antibiotics or more of the same? *British Journal of Pharmacology*, 163(1):184–194.
- Coico, R. (2006). Gram staining. *Current Protocols in Microbiology*, 00(1):A.3C.1–A.3C.2.
- Cole, J. L., Lary, J. W., Moody, T. P. und Laue, T. M. (2008). Analytical ultracentrifugation: Sedimentation velocity and sedimentation equilibrium. In *Biophysical Tools for Biologists, Volume One: In Vitro Techniques*, Seiten 143–179. Elsevier.
- Collier, H. (1973). A note on the molar absorptivity of reduced Ellman's reagent, 3-carboxylato-4-nitrothiophenolate. *Analytical Biochemistry*, 56(1):310–311.
- Conti, E., Franks, N. P. und Brick, P. (1996). Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Structure*, 4(3):287–298.
- Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M. A. und Brick, P. (1997). Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *The EMBO Journal*, 16(14):4174–4183.
- Crosby, J. und Crump, M. P. (2012). The structural role of the carrier protein – active controller or passive carrier. *Natural Product Reports*, 29(10):1111.
- Davis, I. W., Leaver-Fay, A., Chen, V. B., Block, J. N., Kapral, G. J., Wang, X., Murray, L. W., Arendall, W. B., Snoeyink, J., Richardson, J. S. und Richardson, D. C. (2007). MolProbity: All-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, 35:W375–W383.
- Debabov, D. V., Heaton, M. P., Zhang, Q., Stewart, K. D., Lambalot, R. H. und Neuhaus, F. C. (1996). The D-alanyl carrier protein in *Lactobacillus casei*: Cloning, sequencing, and expression of *dltC*. *Journal of Bacteriology*, 178(13):3869–3876.
- Debabov, D. V., Kiriukhin, M. Y. und Neuhaus, F. C. (2000). Biosynthesis of lipoteichoic acid in *Lactobacillus rhamnosus*: Role of DltD in D-alanylation. *Journal of Bacteriology*,

- 182(10):2855–2864.
- D'Elia, M. A., Millar, K. E., Beveridge, T. J. und Brown, E. D. (2006). Wall teichoic acid polymers are dispensable for cell viability in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 188(23):8313–8316.
- Denapante, D., Brückner, R., Hakenbeck, R. und Vollmer, W. (2012). Biosynthesis of teichoic acids in *Streptococcus pneumoniae* and closely related species: Lessons from genomes. *Microbial Drug Resistance*, 18(3):344–358.
- Draing, C., Pfitzenmaier, M., Zummo, S., Mancuso, G., Geyer, A., Hartung, T. und von Aulock, S. (2006). Comparison of lipoteichoic acid from different serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(45):33849–33859.
- Du, L., He, Y. und Luo, Y. (2008). Crystal structure and enantiomer selection by D-alanyl carrier protein ligase DltA from *Bacillus cereus*. *Biochemistry*, 47(44):11473–11480.
- Du, L. und Luo, Y. (2014). Thiolation-enhanced substrate recognition by D-alanyl carrier protein ligase DltA from *Bacillus cereus*. *F1000Research*.
- Duckworth, M., Archibald, A. und Baddiley, J. (1975). Lipoteichoic acid and lipoteichoic acid carrier in *Staphylococcus aureus* H. *FEBS Letters*, 53(2):176–179.
- Duin, D. van. und Paterson, D. L. (2016). Multidrug-resistant bacteria in the community. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(2):377–390.
- Ellman, G. L. (1958). A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 74(2):443–450.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. und Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(4):486–501.
- Fabretti, F., Theilacker, C., Baldassarri, L., Kaczynski, Z., Kropec, A., Holst, O. und Huebner, J. (2006). Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infection and Immunity*, 74(7):4164–4171.
- Fairbanks, G., Steck, T. L. und Wallach, D. F. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10(13):2606–2617.
- Fischer, W. (1994). Lipoteichoic acid and lipids in the membrane of *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology*, 183:61 – 76.
- Fischer, W. (1997). Pneumococcal lipoteichoic and teichoic acid. *Microbial Drug Resistance*, 3(4):309–325.
- Franklin, M. C., Rudolph, M. J., Ginter, C., Cassidy, M. S. und Cheung, J. (2016). Structures of paraoxon-inhibited human acetylcholinesterase reveal perturbations of the acyl loop and the dimer interface. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 84(9):1246–1256.
- Franks, N., Jenkins, A., Conti, E., Lieb, W. und Brick, P. (1998). Structural basis for the inhibition of firefly luciferase by a general anesthetic. *Biophysical Journal*, 75(5):2205–2211.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. und

- Bairoch, A. (2005). *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; The Proteomics Protocols Handbook; Seiten 571–607*. Humana Press.
- Gill, S. C. und von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*, 182(2):319–326.
- Gisch, N., Kohler, T., Ulmer, A. J., Müthing, J., Pribyl, T., Fischer, K., Lindner, B., Hammerschmidt, S. und Zähringer, U. (2013). Structural reevaluation of *Streptococcus pneumoniae* lipoteichoic acid and new insights into its immunostimulatory potency. *Journal of Biological Chemistry*, 288(22):15654–15667.
- Glaser, F., Pupko, T., Paz, I., Bell, R. E., Bechor-Shental, D., Martz, E. und Ben-Tal, N. (2003). ConSurf: Identification of functional regions in proteins by surface-mapping of phylogenetic information. *Bioinformatics*, 19(1):163–164.
- Gold, A. M. und Fahrney, D. (1964). Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. II. Formation and reactions of phenylmethanesulfonyl α -chymotrypsin. *Biochemistry*, 3(6):783–791.
- Gross, M., Cramton, S. E., Gotz, F. und Peschel, A. (2001). Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infection and Immunity*, 69(5):3423–3426.
- Gulick, A. M. (2009). Conformational dynamics in the Acyl-CoA synthetases, adenylation domains of non-ribosomal peptide synthetases and firefly luciferase. *ACS Chemical Biology*, 4(10):811–827.
- Haas, R., Koch, H. und Fischer, W. (1984). Alanyl turnover from lipoteichoic acid to teichoic acid in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 21(1):27–31.
- Hancock, R. E. und Diamond, G. (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiology*, 8(9):402–410.
- Hao, H., Cheng, G., Dai, M., Wu, Q. und Yuan, Z. (2012). Inhibitors targeting on cell wall biosynthesis pathway of MRSA. *Molecular BioSystems*, 8(11):2828.
- Heaton, M. P. und Neuhaus, F. C. (1992). Biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid: Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Lactobacillus casei* gene for the D-alanine-activating enzyme. *Journal of Bacteriology*, 174(14):4707–4717.
- Heaton, M. P. und Neuhaus, F. C. (1994). Role of the D-alanyl carrier protein in the biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid. *Journal of Bacteriology*, 176(3):681–690.
- Heinig, M. und Frishman, D. (2004). STRIDE: A web server for secondary structure assignment from known atomic coordinates of proteins. *Nucleic Acids Research*, 32(Web Server):W500–W502.
- Heptinstall, S., Archibald, A. R. und Baddiley, J. (1970). Teichoic acids and membrane function in bacteria. *Nature*, 225:519–521.
- Heß, N., Waldow, F., Kohler, T. P., Rohde, M., Kreikemeyer, B., Gómez-Mejía, A., Hain, T., Schwudke, D., Vollmer, W., Hammerschmidt, S. *et al.* (2017). Lipoteichoic acid deficiency permits normal growth but impairs virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Nature Communications*, 8(1):2093.

- Hofmann, K. (2000). A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, 25:111–112.
- Holm, L. und Laakso, L. M. (2016). Dali server update. *Nucleic Acids Research*, 44(W1):W351–W355.
- Holzwarth, G. und Doty, P. (1965). The ultraviolet circular dichroism of polypeptides. *Journal of the American Chemical Society*, 87:218–228.
- Hughes, A. H., Stow, M., Hancock, I. C. und Baddiley, J. (1971). Function of teichoic acids and effect of novobiocin on control of Mg^{2+} at the bacterial membrane. *Nature New Biology*, 229:53–55.
- Ileperuma, N. R., Marshall, S. D. G., Squire, C. J., Baker, H. M., Oakeshott, J. G., Russell, R. J., Plummer, K. M., Newcomb, R. D. und Baker, E. N. (2007). High-resolution crystal structure of plant carboxylesterase AeCXE1, from *Actinidia eriantha*, and its complex with a high-affinity inhibitor paraoxon. *Biochemistry*, 46(7):1851–1859.
- Iwasaki, H., Shimada, A. und Ito, E. (1986). Comparative studies of lipoteichoic acids from several bacillus strains. *Journal of Bacteriology*, 167(2):508–516.
- Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(2):125–132.
- Kantardjiev, K. A. und Rupp, B. (2003). Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Science*, 12(9):1865–1871.
- Keller, L. E., Robinson, D. A. und McDaniel, L. S. (2016). Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*: Emergence and pathogenesis. *mBio*, 7(2):e01792–15.
- Kelly, S. M., Jess, T. J. und Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1751(2):119–139.
- Khattar, Z. A., Rejasse, A., Destoumieux-Garzon, D., Escoubas, J. M., Sanchis, V., Lereclus, D., Givaudan, A., Kallassy, M., Nielsen-Leroux, C. und Gaudriault, S. (2009). The *dlt* operon of *Bacillus cereus* is required for resistance to cationic antimicrobial peptides and for virulence in insects. *Journal of Bacteriology*, 191(22):7063–7073.
- Kojima, N., Araki, Y. und Ito, E. (1985). Structure of the linkage units between ribitol teichoic acids and peptidoglycan. *Journal of Bacteriology*, 161(1):299–306.
- Kovacs, M., Halfmann, A., Fedtke, I., Heintz, M., Peschel, A., Vollmer, W., Hakenbeck, R. und Bruckner, R. (2006). A functional *dlt* operon, encoding proteins required for incorporation of D-alanine in teichoic acids in gram-positive bacteria, confers resistance to cationic antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 188(16):5797–5805.
- Krissinel, E. und Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of Molecular Biology*, 372(3):774–797.
- Kristian, S. A., Datta, V., Weidenmaier, C., Kansal, R., Fedtke, I., Peschel, A., Gallo, R. L. und Nizet, V. (2005). D-alanylation of teichoic acids promotes group A streptococcus antimicrobial peptide resistance, neutrophil survival, and epithelial cell invasion. *Journal*

- of *Bacteriology*, 187(19):6719–6725.
- Kumar, S. und Bansal, M. (1998). Geometrical and sequence characteristics of α -helices in globular proteins. *Biophysical Journal*, 75(4):1935–1944.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685.
- Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C. und Walsh, C. T. (1996). A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chemistry & Biology*, 3:923–936.
- Landau, M., Mayrose, I., Rosenberg, Y., Glaser, F., Martz, E., Pupko, T. und Ben-Tal, N. (2005). ConSurf 2005: the projection of evolutionary conservation scores of residues on protein structures. *Nucleic Acids Research*, 33(Web Server):W299–W302.
- Lanie, J. A., Ng, W.-L., Kazmierczak, K. M., Andrzejewski, T. M., Davidsen, T. M., Wayne, K. J., Tettelin, H., Glass, J. I. und Winkler, M. E. (2006). Genome sequence of avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *Journal of Bacteriology*, 189(1):38–51.
- Lebowitz, J., Lewis, M. S. und Schuck, P. (2002). Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. *Protein Science*, 11(9):2067–2079.
- Levisson, M., Han, G. W., Deller, M. C., Xu, Q., Biely, P., Hendriks, S., Eyck, L. F. T., Flensburg, C., Roversi, P., Miller, M. D., McMullan, D., von Delft, F., Kreusch, A., Deacon, A. M., van der Oost, J., Lesley, S. A., Elsliger, M.-A., Kengen, S. W. M. und Wilson, I. A. (2012). Functional and structural characterization of a thermostable acetyl esterase from *Thermotoga maritima*. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 80(6):1545–1559.
- Lo, Y.-C., Lin, S.-C., Shaw, J.-F. und Liaw, Y.-C. (2003). Crystal structure of *Escherichia coli* thioesterase I/protease I/lysophospholipase L1: Consensus sequence blocks constitute the catalytic center of SGNH-hydrolases through a conserved hydrogen bond network. *Journal of Molecular Biology*, 330(3):539–551.
- Löw, C., Weininger, U., Lee, H., Schweimer, K., Neundorff, I., Beck-Sickinger, A. G., Pastor, R. W. und Balbach, J. (2008). Structure and dynamics of helix-0 of the n-BAR domain in lipid micelles and bilayers. *Biophysical Journal*, 95(9):4315–4323.
- Ma, D., Wang, Z., Merrikh, C. N., Lang, K. S., Lu, P., Li, X., Merrikh, H., Rao, Z. und Xu, W. (2018). Crystal structure of a membrane-bound o-acyltransferase. *Nature*, 562(7726):286–290.
- Marahiel, M. A. (1992). Multidomain enzymes involved in peptide synthesis. *FEBS Letters*, 307(1):40–43.
- Marahiel, M. A., Stachelhaus, T. und Mootz, H. D. (1997). Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical Reviews*, 97(7):2651–2674.
- Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. *Journal of Molecular Biology*, 33:491–497.
- May, J. J., Finking, R., Wiegshoff, F., Weber, T. T., Bandur, N., Koert, U. und Marahiel,

- M. A. (2005). 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. *FEBS Journal*, 272(12):2993–3003.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. und Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*, 40(Pt 4):658–674.
- McGann, P., Snesrud, E., Maybank, R., Corey, B., Ong, A. C., Clifford, R., Hinkle, M., Whitman, T., Lesho, E. und Schaecher, K. E. (2016). *Escherichia coli* harboring mcr-1 and bla CTX-Mon a novel IncF plasmid: First report of mcr-1 in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(7):4420–4421.
- Mølgaard, A., Kauppinen, S. und Larsen, S. (2000). Rhamnogalacturonan acetyltransferase elucidates the structure and function of a new family of hydrolases. *Structure*, 8:373 – 383.
- Müller, U., Darowski, N., Fuchs, M. R., Förster, R., Hellmig, M., Paithankar, K. S., Pühringer, S., Steffien, M., Zocher, G. und Weiss, M. S. (2012). Facilities for macromolecular crystallography at the Helmholtz-Zentrum Berlin. *Journal of Synchrotron Radiation*, 19(Pt 3):442–449.
- Neuhaus, F. C. und Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: Structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4):686–723.
- Neuhaus, F. C., Heaton, M. P., Debabov, D. V. und Zhang, Q. (1996). The dlt operon in the biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid in *Lactobacillus casei*. *Microbial Drug Resistance*, 2(1):77–84.
- O'Brien, K. L., Wolfson, L. J., Watt, J. P., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N., Lee, E., Mulholland, K., Levine, O. S. und Cherian, T. (2009). Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: Global estimates. *The Lancet*, 374(9693):893–902.
- Oku, Y., Kurokawa, K., Matsuo, M., Yamada, S., Lee, B.-L. und Sekimizu, K. (2008). Pleiotropic roles of polyglycerolphosphate synthase of lipoteichoic acid in growth of *Staphylococcus aureus* cells. *Journal of Bacteriology*, 191(1):141–151.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I. und Schrag, J. (1992). The α/β -hydrolase fold. *Protein Engineering*, 5:197–211.
- Osman, K. T., Du, L., He, Y. und Luo, Y. (2009). Crystal structure of *Bacillus cereus* D-alanyl carrier protein ligase (DltA) in complex with ATP. *Journal of Molecular Biology*, 388(2):345–355.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. und Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*, 4(11):2411–2423.
- Park, J. T., Shaw, D. R., Chatterjee, A. N., Mirelman, D. und Wu, T. (1974). Mutants of staphylococci with altered cell walls. *Annals of the New York Academy of Sciences*,

- 236:54–62.
- Percy, M. G. und Gründling, A. (2014). Lipoteichoic acid synthesis and function in gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 68:81–100.
- Perego, M., Glaser, P., Minutello, A., Strauch, M. A., Leopold, K. und Fischer, W. (1995). Incorporation of D-alanine into lipoteichoic acid and wall teichoic acid in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(26):15598–15606.
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R. W., Kalbacher, H., Jung, G. und Götz, F. (1999). Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 274(13):8405–8410.
- Petchiappan, A. und Chatterji, D. (2017). Antibiotic resistance: Current perspectives. *ACS Omega*, 2(10):7400–7409.
- Pfennig, S. (2015). *Strukturelle und thermodynamische Charakterisierung der DltA-DltC-Interaktion und kinetische Analyse der DltA katalysierten D-Alanylierung des DltC*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Institut für Biochemie und Biotechnologie.
- Pilo, P. und Frey, J. (2018). Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. *Infection, Genetics and Evolution*, 64:115–125.
- Pollack, J. H., Ntamere, A. S. und Neuhaus, F. C. (1992). D-alanyl-lipoteichoic acid in *Lactobacillus casei*: Secretion of vesicles in response to benzylpenicillin. *Journal of General Microbiology*, 138(5):849–859.
- Radkov, A. D., Hsu, Y.-P., Booher, G. und VanNieuwenhze, M. S. (2018). Imaging bacterial cell wall biosynthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 87(1):991–1014.
- Reichmann, N. T., Cassona, C. P. und Grundling, A. (2013). Revised mechanism of D-alanine incorporation into cell wall polymers in gram-positive bacteria. *Microbiology*, 159(Pt_9):1868–1877.
- Reinert, R. (2009). The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. *Clinical Microbiology and Infection*, 15:7–11.
- Reusch, V. M. und Neuhaus, F. C. (1971). D-alanine: membrane acceptor ligase from *Lactobacillus casei*. *The Journal of Biological Chemistry*, 246:6136–6143.
- Reuter, K. (1999). Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme Sfp: A prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily. *The EMBO Journal*, 18(23):6823–6831.
- Riddles, P. W., Blakeley, R. L. und Zerner, B. (1983). Reassessment of Ellman's reagent. In *Enzyme Structure Part I*, Seiten 49–60. Elsevier.
- Riley, L. M., Weadge, J. T., Baker, P., Robinson, H., Codée, J. D. C., Tipton, P. A., Ohman, D. E. und Howell, P. L. (2013). Structural and functional characterization of *Pseudomonasaeruginosa* AlgX. *Journal of Biological Chemistry*, 288(31):22299–22314.
- Saar-Dover, R., Bitler, A., Nezer, R., Shmuel-Galia, L., Firon, A., Shimoni, E., Trieu-Cuot, P. und Shai, Y. (2012). D-alanylation of lipoteichoic acids confers resistance to cationic peptides in group B streptococcus by increasing the cell wall density. *PLoS Pathogens*,

- 8(9):e1002891.
- Saraste, M., Sibbald, P. R. und Wittinghofer, A. (1990). The p-loop — a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 15(11):430–434.
- Scheffers, D.-J. und Pinho, M. G. (2005). Bacterial cell wall synthesis: New insights from localization studies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(4):585–607.
- Schirner, K., Marles-Wright, J., Lewis, R. J. und Errington, J. (2009). Distinct and essential morphogenic functions for wall- and lipo-teichoic acids in *Bacillus subtilis*. *The EMBO Journal*, 28(7):830–842.
- Schwieger, C., Meister, A., Daum, S., Blume, A. und Bacia, K. (2017). Binding of the GTPase Sar1 to a lipid membrane monolayer: Insertion and orientation studied by infrared reflection–absorption spectroscopy. *Polymers*, 9(11):612.
- Schägger, H. (2006). Tricine–SDS–PAGE. *Nature Protocols*, 1(1):16–22.
- Seo, H. S., Cartee, R. T., Pritchard, D. G. und Nahm, M. H. (2008). A new model of pneumococcal lipoteichoic acid structure resolves biochemical, biosynthetic, and serologic inconsistencies of the current model. *Journal of Bacteriology*, 190(7):2379–2387.
- Steen, A., Palumbo, E., Deghorain, M., Cocconcelli, P. S., Delcour, J., Kuipers, O. P., Kok, J., Buist, G. und Hols, P. (2004). Autolysis of *Lactococcus lactis* is increased upon D-alanine depletion of peptidoglycan and lipoteichoic acids. *Journal of Bacteriology*, 187(1):114–124.
- Strieker, M., Tanović, A. und Marahiel, M. A. (2010). Nonribosomal peptide synthetases: Structures and dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(2):234–240.
- Swoboda, J. G., Campbell, J., Meredith, T. C. und Walker, S. (2010). Wall teichoic acid function, biosynthesis, and inhibition. *ChemBioChem : a European Journal of Chemical Biology*, 11(1):35–45.
- Tomasz, A. (1968). Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of pneumococcus: chain formation, loss of transformability, and loss of autolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 59(1):86–93.
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L. und Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3):603–661.
- Upton, C. und Buckley, J. T. (1995). A new family of lipolytic enzymes? *Trends in Biochemical Sciences*, 20(5):178–179.
- Velez, M. P., Verhoeven, T. L. A., Draing, C., Aulock, S. V., Pfitzenmaier, M., Geyer, A., Lambrichts, I., Grangette, C., Pot, B., Vanderleyden, J. und Keersmaecker, S. C. J. D. (2007). Functional analysis of D-alanylation of lipoteichoic acid in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(11):3595–3604.
- Vergara-Irigaray, M., Maira-Litran, T., Merino, N., Pier, G. B., Penades, J. R. und Lasa, I. (2008). Wall teichoic acids are dispensable for anchoring the PNAG exopolysaccharide

- to the *Staphylococcus aureus* cell surface. *Microbiology*, 154(3):865–877.
- Volkman, B. F., Zhang, Q., Debatov, D. V., Rivera, E., Kresheck, G. C. und Neuhaus, F. C. (2001). Biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid: The tertiary structure of apo-D-alanyl carrier protein. *Biochemistry*, 40(27):7964–7972.
- Vollmer, W., Blanot, D. und Pedro, M. A. D. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2):149–167.
- Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. und Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO journal*, 1:945–951.
- Wang, M., Opare, P. und Boddy, C. N. (2009). Polyketide synthase thioesterases catalyze rapid hydrolysis of peptidyl thioesters. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(5):1413–1415.
- Ward, J. B. (1981). Teichoic and teichuronic acids: Biosynthesis, assembly, and location. *Microbiological Reviews*, 45(2):211–243.
- Weidenmaier, C., Kokai-Kun, J. F., Kristian, S. A., Chanturiya, T., Kalbacher, H., Gross, M., Nicholson, G., Neumeister, B., Mond, J. J. und Peschel, A. (2004). Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nature Medicine*, 10(3):243–245.
- Wijesekara, P., Kumbukgolla, W., Jayaweera, J. und Rawat, D. (2017). Review on usage of vancomycin in livestock and humans: Maintaining its efficacy, prevention of resistance and alternative therapy. *Veterinary Sciences*, 4(4):6.
- Winstel, V., Xia, G. und Peschel, A. (2014). Pathways and roles of wall teichoic acid glycosylation in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(3-4):215–221.
- Wood, B. M., Maria, J. P. S., Matano, L. M., Vickery, C. R. und Walker, S. (2018). A partial reconstitution implicates DltD in catalyzing lipoteichoic acid D-alanylation. *Journal of Biological Chemistry*, 293(46):17985–17996.
- Wright, G. D. (2012). Antibiotics: A new hope. *Chemistry & Biology*, 19(1):3–10.
- Xia, G., Kohler, T. und Peschel, A. (2010). The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(2):148–154.
- Yonus, H. (2015). *Structural studies on DltA provide insights into the reaction mechanism of NRPS adenylation domains*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Institut für Biochemie und Biotechnologie.
- Yonus, H., Neumann, P., Zimmermann, S., May, J. J., Marahiel, M. A. und Stubbs, M. T. (2008). Crystal structure of DltA. *Journal of Biological Chemistry*, 283(47):32484–32491.
- Zimmermann, S. (2011). *Strukturelle Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen DltA und DltC*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Institut für

Biochemie und Biotechnologie.

Zimmermann, S., Pfennig, S., Neumann, P., Yonus, H., Weininger, U., Kovermann, M., Balbach, J. und Stubbs, M. T. (2015). High-resolution structures of the D-alanyl carrier protein (Dcp) DltC from *Bacillus subtilis* reveal equivalent conformations of apo- and holo-forms. *FEBS Letters*, 589(18):2283–2289.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der Zellwand und Zellmembran von Bakterien.	2
1.2	Strukturen von Teichonsäuren.	3
1.3	Struktur der Teichonsäuren in <i>S. pneumoniae</i>	4
1.4	Schematische Darstellung des <i>dlt</i> -Operons.	6
1.5	Mechanismus der Modifizierung von Teichonsäure mit D-Alanin.	7
1.6	Schematische Darstellung von <i>BsDltA</i>	8
1.7	Schematische Darstellung der nachgewiesenen und hypothetischen Konformationen von DltA.	9
1.8	<i>Cartoon</i> -Darstellung von DltD.	13
1.9	<i>Cartoon</i> -Darstellung von DltD und Thioesterase I.	14
1.10	Modelle der D-Alanylierung von Teichonsäuren.	15
2.1	Thioester von D-Alanin und N-Acetylcysteamin.	39
2.2	Thioesterhydrolyse.	40
3.1	SDS-PAGE der Präparation von <i>SpDltA</i> und <i>SpDltC</i>	42
3.2	CD-Spektrum von <i>SpDltA</i>	42
3.3	Analytische Ultrazentrifugation der Interaktionsversuche.	43
3.4	<i>SpDltA</i> -Kristalle.	45
3.5	<i>cartoon</i> -Darstellung von <i>SpDltA</i> kristallisiert mit ATP.	48
3.6	Struktur von <i>SpDltA</i> ohne Ligand.	49
3.7	Überlagerung der Proteinmoleküle.	50
3.8	Orientierung von Arginin-404 in Molekül A.	51
3.9	Kristallstruktur von <i>SpDltA</i> mit AMP.	52
3.10	Die Bindetasche von AMP.	53
3.11	Orientierung von Arginin-404.	54
3.12	Stereodarstellung des <i>p-loops</i> (AMP-gebundene Struktur).	55
3.13	<i>cartoon</i> -Darstellung von <i>SpDltA</i>	57
3.14	Überlagerung der Domänen in der ligandenfreien und AMP-gebundenen Form.	57
3.15	Vergleich von <i>SpDltA</i> ohne Ligand mit Luciferase.	59
3.16	<i>S. pyogenes</i>	60
3.17	Vergleich von <i>SpDltA</i> ohne Ligand mit DltA aus <i>S. pyogenes</i>	61
3.18	Vergleich der offenen Konformationen.	62
3.19	Orientierung von Arginin-404 (<i>SpDltA</i>) und Arg-437.	63
3.20	Position von Lysin-503 in <i>SpDltA</i>	64
3.21	Vergleich der Positionen von Arginin (R) und Lysin (K) in der Nähe des aktiven Zentrums.	65
3.22	AMP-Bindetasche im Vergleich (<i>SpDltA</i> und <i>BsDltA</i>).	68
3.23	AMP-Bindetasche im Vergleich (<i>SpDltA</i> und <i>BcDltA</i>).	68

3.24	Hypothetische Bindung von D-Alaninadenylat.	69
3.25	Darstellung der drei Konformationen von DltA.	71
4.1	Expression und Reinigung von <i>SpDltD_{tr}</i>	75
4.2	CD-Spektrum von <i>SpDltD_{tr}</i>	75
4.3	Analytische Ultrazentrifugation von <i>SpDltD_{tr}</i>	76
4.4	SDS-PAGE der mutierten Proteine.	77
4.5	CD-Messung der Mutanten.	77
4.6	Analytische Ultrazentrifugation der Interaktionsversuche.	79
4.7	Kristallisationsbilder der <i>SpDltD_{tr}</i> Kristalle.	81
4.8	Stereodarstellung der Struktur von <i>SpDltD_{tr}</i>	83
4.9	Stereodarstellung des Vergleichs von Helix 13 von <i>SpDltD_{tr}</i> in beiden Monomeren.	85
4.10	Detailansicht der Helix 13 von <i>SpDltD_{tr}</i>	86
4.11	Stereodarstellung von Helix 20 von <i>SpDltD_{tr}</i>	87
4.12	Vergleich der Monomere von <i>SpDltD_{tr}</i>	88
4.13	Übersichtsdarstellung des Kristallisationsdimers von <i>SpDltD_{tr}</i>	89
4.14	Detailansicht der Dimerinteraktion in <i>SpDltD_{tr}</i> -Kristallen.	89
4.15	Darstellung der Struktur, Elektrostatik und Konservierung von <i>SpDltD_{tr}</i>	91
4.16	Vergleich der Struktur von EstA mit <i>SpDltD_{tr}</i>	93
4.17	Betrachtung der hypothetischen katalytischen Triade.	94
4.18	Zusammenfassung der Struktur von <i>SpDltD_{tr}</i>	94
4.19	Thioesterhydrolyse.	95
4.20	Überlagerung des hier beschriebenen Dimers mit der Referenzstruktur.	97
4.21	Mögliche Position von <i>SpDltD_{tr}</i> auf der Membran.	98
4.22	Stereodarstellung der hypothetischen Bindung von D-Alanin an Serin-78.	100
4.23	Vergleich von <i>SpDltD_{tr}</i> mit SGNH-Hydrolasen.	103
4.24	Mögliche Reaktion von <i>SpDltD_{tr}</i>	104
A.1	Sequenzvergleich von DltA.	II
A.2	Sequenzvergleich von DltD.	III
A.3	Sequenzvergleich von DltC.	IV
A.4	Elutionsprofile der Reinigungsschritte (<i>SpDltA</i>).	IV
A.5	Elutionsprofile der Reinigungsschritte (<i>SpDltC</i>).	V
A.6	Elutionsprofile der Reinigungsschritte (<i>SpDltD_{tr}</i>).	V
A.7	Größenausschlusschromatographie nach zwei Wochen bzw. nach dem Einfrieren.	VI
A.8	Analytische Ultrazentrifugation von <i>SpDltD_{tr}</i>	VII
A.9	Massenspektrometrie des gereinigten Produktes.	VIII
A.10	Thioester von D-Alanin und N-Acetylcysteamin.	IX

A.11 ^1H -NMR des Thioesters.	IX
A.12 HSQC-Messung.	IX
A.13 Thioesterhydrolyse.	XI

Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Chemikalien.	19
2.2	Genutzte Geräte.	21
2.3	Restriktionsenzyme und Puffer.	23
2.4	Kristallisationsscreen.	23
2.5	Säulenmaterial für die FPLC.	23
2.6	Bakterienstämme und ihre Spezifikationen.	24
2.7	PCR-Ansätze.	25
2.8	Primer für die Erstellung von Vektoren für <i>SpDltA</i> , <i>SpDltC</i> und <i>SpDltD_{tr}</i>	25
2.9	PCR-Protokoll.	25
2.10	Mutageneseprimer.	26
2.11	PCR-Ansätze für die Mutagenese.	26
2.12	PCR-Protokoll für die Mutagenese.	26
2.13	Restriktionsansätze für alle DNA-Konstrukte.	27
2.14	Glycin-SDS-PAGE.	33
2.15	Extinktionskoeffizienten und Molmassen.	33
2.16	Molmassen von <i>SpDltA</i> , <i>SpDltC</i> , <i>SpDltD_{tr}</i> und deren Mutanten.	34
2.17	Einstellung des Consurf-Laufs.	38
3.1	Übersicht der Sequenzunterschiede in <i>SpDltA</i>	41
3.2	Sedimentationskoeffizienten der Interaktionsstudien.	43
3.3	Zellparameter und Statistik zur Datensammlung von <i>SpDltA</i>	46
3.4	Ergebnisse der Verfeinerung der Strukturen von <i>SpDltA</i>	47
3.5	Ergebnisse der Verfeinerung der Struktur von <i>SpDltA</i> mit ATP.	48
3.6	Wasserstoffbrückenbindungen des <i>p-loops</i>	55
3.7	Offene Konformationen adenylatbildender Enzyme.	59
3.8	Zusammenfassung des Vergleichs der offenen Konformationen.	66
4.1	Übersicht der Sequenzunterschiede in <i>SpDltD_{tr}</i>	74
4.2	Sedimentationskoeffizienten der Interaktionsstudien.	78
4.3	Zellparameter und Statistik zur Datensammlung von <i>SpDltD_{tr}</i>	81
4.4	Ergebnisse der Verfeinerung der Struktur von <i>SpDltD_{tr}</i>	83
4.5	Beispiele für DALI-Ergebnisse.	92
A.1	Elutionsvolumina der Größenausschlusschromatographie.	VI
A.2	Elutionsvolumina der Größenausschlusschromatographie.	VI
A.3	Spezifische Aktivität bei unterschiedlichen Konzentrationen.	XI

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Milton Stubbs an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Abteilung Physikalische Biotechnologie erstellt. Hierbei konnte ich mich immer wieder mit Fragen und zur Diskussionen an Kollegen wenden. Hierfür bin ich den Kollegen der Arbeitsgruppe und den weiteren Kollegen der Biochemie sehr dankbar.

Zuerst bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stubbs für die Bereitstellung des interessanten Themas, sowie seinen fachlichen Anmerkungen zu meinen Fortschritten und Nachfragen. Des Weiteren möchte ich auch Frau Dr. Constanze Breithaupt danken, dass sie mir während der Bearbeitung meines Themas mit Anmerkungen zu Experimenten und Auswertungen zur Seite stand. Auch Herrn Dr. Christoph Parthier gilt ein großer Dank bezüglich aller Fragen zur Kristallographie.

Dieses Projekt war auf Kooperationen mit anderen Arbeitsgruppen angewiesen, ohne die die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre. Dafür möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Mike Schutkowski und insbesondere Herrn Dr. Marat Meleshin bei der Auswahl einer Synthesestrategie sowie der begleiteten Synthese des Thioesters bedanken. Vielen Dank für die Geduld und die Zeit. Auch der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jochen Balbach, insbesondere Herrn Stefan Gröger, gilt mein Dank für die NMR-Untersuchungen meiner Syntheseprodukte. Ein weiterer Dank gilt Herrn PD Dr. Lilie für die Messung meiner Proteinproben mittels analytischer Ultrazentrifugation, aber auch für die Hinweise und Anleitungen bei verschiedenen Experimenten. Frau Dr. Miriam Linnert danke ich für die Durchführung der Messungen am Diamond Light Source (Oxfordshire, England).

Für eine gute und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe Physikalische Biotechnologie. Frau Pia Rosenbaum, für ihren unermüdlichen Einsatz bei der Bereitstellung von Material und Chemikalien, sowie der Bereitstellung der Zellen und Einweisung in Laborgeräte. Ich danke meinen beiden Bachelorstudenten Tobias Hasler und Julia Hesselbarth für ihre Arbeiten. Auch den anderen Mitarbeitern, wie z. B. Robert Broneske und Archana, die durch ihr Interesse, ihre Aufmunterungen und Hinweise zum Gelingen beigetragen haben, danke ich herzlich. Essentiell für das Gelingen dieser Arbeit waren aber auch meinen Familien und Freunde, insbesondere Sabryna. Ich danke meinen Eltern und meiner Schwester, die mich immer unterstützt, Texte korrigiert, mich in meinem Weg bestärkt und auch mal an das Leben außerhalb der Arbeit erinnert haben. Ohne euch wäre ich wohl nicht so gut durch diese Zeit gekommen. Aber auch meinen Schwiegereltern gilt ein Dank für die Unterstützung sowie für Korrekturhinweise.

Mein letzter Dank soll meinem Mann Conrad gelten. Vielen Dank für die vielen Stunden, die du geduldig mit mir ertragen und mich beruhigt hast. Danke für die Hinweise, dass die Zeit des Verfassens dieser Arbeit vorübergehen wird und dass du mir in der letzten Zeit den Rücken frei gehalten hast.

Lebenslauf

Persönliche Informationen

Name: Birthe Steigemann
Geburtsdatum: 02. August 1987
Geburtsort: Lönigen

Bildung

2014 - 2018 Doktorandin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Institut für Biochemie, 06120 Halle (Saale), Deutschland

2012 - 2014 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität Greifswald
Institut für Biochemie, 17487 Greifswald, Deutschland

2009 - 2010 Austauschjahr an der University of Saskatchewan
University of Saskatchewan, Saskatoon, Kanada
Fach Biochemie inklusive Forschungsprojekt
„Cocrystallization of a RadA recombinase with inhibitors “

2006 - 2012 Biochemiestudium an der Universität Greifswald
Institut für Biochemie, 17487 Greifswald, Deutschland
Diplomthema:
„Structure determination of the Transcription Factors PC4
of a Bacteriophage and Human Bcl11b “

2006 Abitur
Copernicus-Gymnasium, Lönigen, Deutschland

Halle (Saale), 25.05.2020

Birthe Steigemann

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß §5 der Promotionsordnung vom 13.07.2016 der Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die vorliegende Arbeit

„Struktur- und Funktionsuntersuchungen
von Dlt-Proteinen aus
Streptococcus pneumoniae“

selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen aus anderen Werken habe ich als solche gekennzeichnet. Andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel habe ich nicht benutzt. Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die vorliegende Dissertation an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Erwerb eines akademischen Titels eingereicht zu haben.

Halle (Saale), den 25.05.2020

Birthe Steigemann