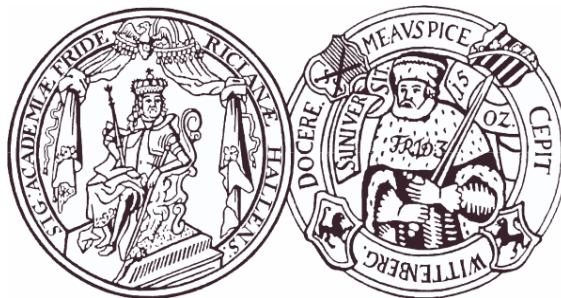


Strukturelle Untersuchungen der 4-Cumarat:Coenzym A Ligase 1 und der Aminotransferase LivB

DISSERTATION
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg



vorgelegt

von Frau Ulrike Bräuer,
geboren am 18.09.1981 in Jena

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. Milton T. Stubbs
2. Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hofmann
3. PD Dr. Udo Wehmeier

Datum der öffentlichen Verteidigung: 27 Juni 2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	8
Abkürzungen und Symbole.....	9
1 Aufbau der Arbeit	11
2 4-Cumarat:Coenzym A Ligase 1	12
2.1 Einleitung	12
2.1.1 Die Adenylat-bildende Enzymfamilie	12
2.1.1.1 Kristallstrukturen der Klasse I der Adenylat-bildenden Familie	15
2.1.2 Ligation von Proteinen.....	17
2.1.2.1 Intein-vermittelte Proteinligation.....	18
2.1.2.2 Protease-vermittelte Proteinligation	19
2.1.3 Die Cumarat:Coenzym A Ligase Familie.....	21
2.1.4 Stand der Arbeiten und Zielsetzung	22
2.2 Ergebnisse und Diskussion.....	25
2.2.1 Klonierung der 4CL1 <i>hinge</i> Varianten.....	25
2.2.1.1 Klonierung der 4CL1 Varianten N _{YRH hinge} , C _{YRH hinge} und C _{YRHA hinge} ...	27
2.2.1.2 Klonierung der 4CL1 Variante YRHA _{hinge}	27
2.2.2 Expression der 4CL1 <i>hinge</i> Varianten	28
2.2.2.1 Expression der Varianten N _{YRH hinge} , C _{YRH hinge} , und C _{YRHA hinge}	28
2.2.2.2 Expression der Variante YRHA _{hinge}	29
2.2.3 Reinigung der 4CL1 <i>hinge</i> Varianten.....	30
2.2.3.1 Reinigung der Varianten N _{YRH hinge} , C _{YRH hinge} und C _{YRHA hinge}	30
2.2.3.2 Reinigung der Variante YRHA _{hinge}	34
2.2.4 Versuche zur Protease vermittelten Proteinligation mit den Varianten 4CL1 N _{YRH hinge} , C _{YRH hinge} und C _{YRHA hinge}	35
2.2.4.1 Abspaltung des Strep-II-tags.....	35
2.2.4.2 Ligation mit Fluoreszenzfarbstoffen	38
2.2.5 Klonierung, Expression und Reinigung der 4CL1 <i>loop</i> Varianten	40
2.2.5.1 Klonierung der 4CL1 Varianten YRH _{loop} , N _{YRH loop} und C _{YRH loop}	41
2.2.5.2 Expression der 4CL1 Varianten YRH _{loop} , N _{YRH loop} und C _{YRH loop}	42
2.2.5.3 Reinigung der 4CL1 Varianten YRH _{loop} und N _{YRH loop}	45
2.2.6 Aktivitätstest der Varianten 4CL1 YRHA _{hinge} und 4CL1 YRH _{loop}	47
2.2.7 Strukturelle Untersuchungen mittels Fluoreszenz- und CD-Messungen ..	48
2.2.8 Abschließende Diskussion	49
3 Aminotransferase LivB	57
3.1 Einleitung	57
3.1.1 Aminoglykosid-Antibiotika (AGA).....	57
3.1.1.1 Aufbau und Klassifizierung von Aminoglykosid-Antibiotika	58

3.1.1.2 Wirkungsweise von Aminoglykosid-Antibiotika und zunehmende Resistenz von Bakterien	61
3.1.2 Aminotransferasen	62
3.1.2.1 Vitamin B6-abhängige Enzyme.....	64
3.1.2.2 Aminotransferase LivB.....	65
3.1.3 Zielsetzung	66
3.2. Ergebnisse Aminotransferase LivB	67
3.2.1 Expression und Reinigung.....	67
3.2.2 Kristallisation	68
3.2.3 Datensammlung, Strukturlösung und Refinement	70
3.2.4 Die Kristallstruktur von LivB.....	75
3.2.4.1 LivB-Apo Struktur und LivB-l3C Struktur.....	77
3.2.4.2 LivB-PLP Struktur	80
3.2.4.3 LivB-PLP-Paromomycin Struktur	81
3.2.5 Diskussion der LivB Strukturen.....	85
3.2.5.1 Vergleich der Gesamtstruktur mit anderen Aminotransferasen.....	90
3.2.5.2 Vergleich der PLP-Bindung.....	91
3.2.5.3 Aminodonorbindung in Aminotransferasen	94
3.2.5.4 Vergleich der Substratbindung.....	95
3.2.5.5 Abschließende Zusammenfassung.....	98
4 Materialien und Methoden	101
4.1 Materialien	101
4.1.1 Geräte	101
4.1.2 Chemikalien.....	103
4.1.3 Medien, Puffer und Lösungen	105
4.1.3.1 Medien und Antibiotika.....	105
4.1.3.2 Puffer	106
4.1.3.3 Lösungen	107
4.1.4 Kits	108
4.1.5 Bakterienstämme und Plasmide	109
4.1.6 Oligonukleotide.....	110
4.1.7 Enzyme und Standards	110
4.2 Methoden	112
4.2.1 Molekularbiologische Methoden	112
4.2.1.1 Herstellung einer Sporenkultur für <i>Streptomyces lividans</i>	112
4.2.1.2 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen.....	112
4.2.1.3 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien.....	113
4.2.1.4 Plasmidpräparation (Isolierung von Plasmid-DNA).....	114
4.2.1.5 Bestimmung der DNA-Konzentration mittels UV/Vis-Spektroskopie	114
4.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese	115
4.2.1.7 Restriktionsverdau	115
4.2.1.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	115
4.2.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten.....	118
4.2.1.10 Sequenzierung.....	118
4.2.2 Proteintechnische Methoden	118
4.2.2.1 Expression von Wildtyp 4CL1 und Varianten in <i>E. coli</i>	118

4.2.2.2 Expression von LivB in <i>Streptomyces lividans</i>	119
4.2.2.3 Zellernte und Zellaufschluss	119
4.2.2.4 Natriumdesoxycholat (NaDoc)-Fällung	120
4.2.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	120
4.2.2.6 Affinitätschromatographie	121
4.2.2.7 Größenausschlusschromatographie (SEC)	123
4.2.2.8 Proteinkonzentrierung.....	123
4.2.2.9 Bestimmung der Proteinkonzentration durch UV/Vis-Spektroskopie	123
4.2.2.10 Fluoreszenzspektroskopie	124
4.2.2.11 CD-Spektroskopie.....	125
4.2.2.12 Aktivitätstest für 4CL1 Varianten.....	126
4.2.2.13 Protease - vermittelte Proteinligation	127
4.2.2.14 Kristallisation.....	127
4.2.2.15 <i>Soaking</i> Experimente.....	128
4.2.2.16 Datensammlung und -prozessierung	129
4.2.2.17 Strukturaufklärung und Verfeinerung	130
5 Literaturverzeichnis	132
Anhang	141
Danksagung	174
Lebenslauf.....	175
Eidesstattliche Erklärung	176

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1: Reaktionsmechanismus der Adenylat-bildenden Enzymfamilie.	12
Abb. 2-2: Reaktionsmechanismus ausgewählter Adenylierungsenzyme.	14
Abb. 2-3: Konserviertes Sequenzmotiv der Klasse I der Adenylat-bildenden Enzymfamilie.	14
Abb. 2-4: Kristallstrukturen der 4-Chlorobenzoyl-CoA Ligase und Luciferase.	15
Abb. 2-5: IMPACT™-Systems nach [David <i>et al.</i> , 2004].	19
Abb. 2-6: Proteinligationsreaktion mit Hilfe der Trypsin-Variante K60E/N143H/E151H/D189K.	20
Abb. 2-7: Reaktionsmechanismus der 4-Cumarat:Coenzym A Ligase.	21
Abb. 2-8: Substrate der 4CL1 aus Sojabohne.	22
Abb. 2-9: Aminosäuresequenz der 4CL1.	23
Abb. 2-10: Modell der Mutationen anhand der Struktur von PheA.	25
Abb. 2-11: Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte.	26
Abb. 2-12: SDS-PAGE der Expression von 4CL1 N _{YRH hinge} , C _{YRH hinge} und C _{YRHA hinge}	29
Abb. 2-13: SDS-PAGE der Expression von 4CL1 YRHA _{hinge}	30
Abb. 2-14: SDS-PAGE der Reinigung der Variante N _{YRH hinge}	31
Abb. 2-15: SDS-PAGE der Reinigung der Variante C _{YRH hinge}	32
Abb. 2-16: SDS-PAGE der Reinigung der Variante C _{YRHA hinge}	33
Abb. 2-17: SDS-PAGE der Reinigung der Variante YRHA _{hinge}	34
Abb. 2-18: Western Blot der Abspaltung des Strep-II-tags der 4CL1 Variante N _{YRH hinge}	36
Abb. 2-19: Analyse der Abspaltung des Strep-II-tags der 4CL1 Variante C _{YRHA hinge}	37
Abb. 2-20: Fluoreszenzanalyse der SDS-PAGE der Modifizierung der 4CL1 Variante N _{YRH hinge} mit 6-Carboxy-fluorescein.	38
Abb. 2-21: Massenspektrometrische Analyse der Modifizierung der Variante C _{YRHA hinge} mit Aminobenzoesäure-Ala ₃	39
Abb. 2-22: Schematische Darstellung der Konstrukte YRH _{loop} , N _{YRH loop} und C _{YRH loop}	41
Abb. 2-23: SDS-PAGE der Expression von 4CL1 YRH _{loop}	43
Abb. 2-24: SDS-PAGE der Expression von 4CL1 N _{YRH loop} and C _{YRH loop}	44
Abb. 2-25: SDS-PAGE der Reinigung der Variante YRH _{loop}	46
Abb. 2-26: SDS-PAGE der Reinigung der Variante N _{YRH loop}	47
Abb. 2-27: Fluoreszenzspektren und Fern-UV-CD Spektren der 4CL1 Varianten WT, YRH _{hinge} und YRH _{loop} im nativen und denaturierten Zustand (6 M Gua).	49
Abb. 2-28: Alignment der Proteinsequenzen der 4CL1 von <i>Populus tomentosa</i> und Sojabohne.	51
Abb. 2-29: Gesamtstruktur der 4CL1 von <i>Populus tomentosa</i>	52
Abb. 2-30: AMP-Bindestelle der 4CL1 aus <i>Populus tomentosa</i>	53
Abb. 2-31: Ausschnitt aus dem Sequenzalignment von sequentiell verwandten 4CLs.	54
Abb. 2-32: Ausschnitt aus dem Sequenzalignment verwandter adenylat-bildender Enzyme mit bekannter Struktur.	55
Abb. 2-33: Aminosäuren 480-492 der <i>P. tom</i> 4CL1 Struktur.	56
Abb. 3-1: Chemische Struktur von Streptomycin (links) und Streptomycin (rechts).	58
Abb. 3-2: Chemische Struktur von 2-Deoxystreptomycin (2-DOS, links) und Paromomycin (rechts).	59

Abb. 3-3: Antibiotika der 2-DOS Klasse.....	59
Abb. 3-4: Biosynthese von Aminoglykosid-Antibiotika am Beispiel von Lividomycin B.	60
Abb. 3-5: <i>E. coli</i> 16S-rRNA mit Paromomycin	61
Abb. 3-6: Transaminierungsreaktion.....	63
Abb. 3-7: <i>liv</i> -Gencluster.	65
Abb. 3-8: Die Enzymreaktion von LivB.	66
Abb. 3-9: SDS-PAGE der Expression und Reinigung von LivB.	67
Abb. 3-10: Proteinkristalle von LivB.	69
Abb. 3-11: Iodatome eines I3C Moleküls in der initialen Elektronendichte.	72
Abb. 3-12: Elektronendichte des Alanin 230.....	74
Abb. 3-13: Nummerierung von PLP und Paromomycin.	75
Abb. 3-14: Struktur eines Monomers von LivB-Apo.....	78
Abb. 3-15: LivB-Apo Dimerstruktur.	79
Abb. 3-16: Darstellung des vermuteten aktiven Zentrums von LivB-Apo und LivB-I3C.	80
Abb. 3-17: Koordination des Kofaktors PLP im aktiven Zentrum von LivB.	81
Abb. 3-18: Elektronendichte des externen Aldimins.	82
Abb. 3-19: Oberflächendarstellung der LivB-PLP-Paromomycin Struktur.	83
Abb. 3-20: Vergleich des aktiven Zentrums von LivB-PLP-Paromomycin in den beiden Monomeren.....	84
Abb. 3-21: Chemische Struktur der Substrate von LivB und NeoB.....	85
Abb. 3-22: Reaktionsschema ausgewählter mit LivB verwandter Enzyme.....	87
Abb. 3-23: Reaktionsschema für PseC, BtrR und TobS2.....	89
Abb. 3-24: Vergleich von LivB-PLP-Paromomycin, GSAM und TobS2.	91
Abb. 3-26: Vergleich der Aminodonor Bindung.....	95
Abb. 3-27: Vergleich der Substratbindung.....	97
Abb. 3-28: Internes und externes Aldimin von LivB.	99
Abb. 3-29: Reaktionsschema der Transaminierungsreaktion von LivB.	99
Abb. A-1: Sequenzalignment von sequentiell verwandten 4CLs	142
Abb. A-2: Sequenzalignment verwandter adenylat-bildender Enzyme mit bekannter Struktur.....	154
Abb. B-1: Sequenzalignment von LivB mit den 15 nächsten Verwandten	161
Abb. B-2: Sequenzalignment der fünf nächsten verwandten Enzyme mit LivB	164
Abb. B-3: Strukturelles Sequenzalignment von LivB mit den Ergebnissen der DALI- Suche	165
Abb. B-4: Strukturelles Sequenzalignment von LivB mit den 11 strukturell verwandtesten Enzymen des Aminotransferase Faltungstyps III	170

Tabellenverzeichnis

Tab.1: Liste der benutzen Abkürzungen	9
Tab.1: Liste der benutzen Abkürzungen (Fortsetzung).....	10
Tab. 2-1: Auflistung der verwendeten 4CL1 Varianten sowie der Beschreibung der entsprechenden Mutationen.	26
Tab. 2-2: Ausbeute der 4CL1 Varianten nach Reinigung	35
Tab. 2-3: Theoretische und gemessene molekulare Massen der Reaktionskomponenten der Reaktion von CYRHA hinge mit Aminobenzoesäure-Ala ₃ (Abz-Ala ₃).	39
Tab. 2-4: 4CL1 Varianten YRH _{loop} , N _{YRH loop} und C _{YRH loop} mit Beschreibung der entsprechenden Mutationen.	41
Tab. 2-5: Ausbeute der 4CL1 Varianten YRH _{loop} und N _{YRH loop} nach Reinigung.....	47
Tab. 2-6: Spezifische Aktivität	48
Tab. 3-1: Die sieben Faltungstypen der Vitamin B ₆ -abhängigen Enzymklasse nach [Grishin <i>et al.</i> , 1995].	65
Tab. 3-2: Statistik der LivB-Datensätze	71
Tab. 3-3: verwendete Liganden und ihre Konzentration und Einwirkzeit	72
Tab. 3-4: Refinementstatistik der LivB-Datensätze.....	73
Tab. 3-5: Statistik der Ramachandran-Analyse der LivB Datensätze	73
Tab. 3-6: <i>rmsd</i> -Werte der einzelnen Monomere zueinander	77
Tab. 3-7: <i>rmsd</i> -Werte der Datensätze	77
Tab. 3-8: Ergebnis der DALI-Suche für LivB.....	88
Tab. 3-9: Ergebnis des paarweisen strukturellen Alignments	89
Tab. 4-1: Liste der verwendeten Chemikalien	103
Tab. 4-1: Liste der verwendeten Chemikalien (Fortsetzung)	104
Tab. 4-2: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngeles	107
Tab. 4-3: Liste der verwendeten <i>E. coli</i> und <i>S. lividans</i> Zelllinien	109
Tab. 4-4: Liste der verwendeten Plasmide	109
Tab. 4-5: Liste der verwendeten Primer	110
Tab. 4-6: Programm für Mutagenese-PCR.....	116
Tab. 4-7: Programm für die PCR mit überhängenden Primern.....	117
Tab. 4-8: Adsorptionskoeffizienten der Varianten von 4CL1 und LivB.....	124
Tab. 4-9: verwendete Verbindungen für Schweratomderivat- <i>Soaking</i> von LivB.....	129
Tab. 4-10: Liste der aufgenommenen Datensätze von LivB	130
Tab. A-1: Liste von 4CL1 verwandten Enzyme mit bekannten Strukturdaten.....	153
Tab. B-1: Liste sequenziell mit LivB verwandter Enzyme	159

Abkürzungen und Symbole

Tab.1: Liste der benutzen Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
4CL	4-Cumarat:Coenzym A Ligase
ACS	Acetyl:Coenzym A Synthetase
AGA	Aminoglykosid Antibiotikum
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
APS	Ammoniumperoxosulfat
As	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp (kB)	Basenpaare (Kilo-Basenpaare)
BSA	Rinderserumalbumin
CBAL	4-Chlorobenzoyl-CoA Ligase
CBD	<i>Chitin binding domain</i> , Chitin-Bindedomäne
CIP	<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i>
CoA / CoASH	Coenzym A / reduzierte Form des Coenzym A
CV	<i>Column volume</i> , Säulenvolumen
Da (kDa)	Dalton (Kilodalton)
ddH ₂ O	Doppeltdestilliertes Wasser
DhbE	2'-3'-Dihydroxybenzonat Adenylierungsdomain
DltA	D-Alanin aktivierende Domäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ϵ	Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPL	<i>expressed protein ligation</i>
EtOH	Ethanol
g	Zentrifugalkraft / Erdbeschleunigung
GSAM	<i>Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
I3C	5-Amino-2,4,6-triiod-Isophthalsäure (<i>magic triangle</i> Verbindung)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LC-FACS	Long chain fatty acyl-CoA synthetase
Luc	Luciferase
mA	milli Ampere
MAD	<i>multi wavelength anomalous dispersion</i>
MAU	<i>milli absorption unit</i>
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MR	<i>molecular replacement</i> , molekularer Ersatz
MW	Molekulargewicht

Tab.1: Liste der benutzen Abkürzungen (Fortsetzung)

Abkürzung	Bedeutung
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NCL	<i>Native chemical ligation</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
NIS	<i>NRPS independent siderophores</i>
NRPS	<i>Non ribosomal peptide synthetases</i> , nicht-ribosomale Peptid-Synthetase
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PheA	Phenylalanin activation domain of Gramicidin S biosynthesis
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PLP	Pyridoxin-5'-phosphat
PMP	Pyridoxamin-5'-Phosphat
PPi	Pyrophosphat
<i>rmsd</i>	<i>Root mean square deviation</i> , Wurzel aus der mittleren quadratischen Verschiebung
RP-HPLC	<i>reversed phase</i> - Hochdruckflüssigkeitschromatographie
rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
<i>S. lividans/lividus</i>	<i>Streptomyces lividans/lividus</i>
SAD	<i>single wavelength anomalous dispersion</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SOC-Medium	<i>salt-optimized broth</i> (SOB) + <i>carbon</i> Medium
<i>spp.</i>	<i>Species pluralis</i>
SPPS	<i>Solid-phase peptide synthesis</i>
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine Hydrochlorid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TES	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TrisHCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid
t-RNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	<i>units</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
VIS	Sichtbares Licht
w/v	<i>weight per volume</i> (Masse pro Volumen)
WT	Wildtyp

Aus dem Englischen übernommene Begriffe, für die kein äquivalenter deutscher Begriff existiert, werden in kursiver Schreibweise dargestellt.

Abkürzungen für Aminosäuren (Einbuchstabencode bzw. Dreibuchstabencode) werden gemäß der biochemischen Literatur verwendet.

1 Aufbau der Arbeit

In der hier vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Proteine bearbeitet. Zum einem die 4-Cumarat:Coenzym A Ligase 1, ein Enzym aus dem Sekundärstoffwechsel der Sojabohne (*Glycine max.*), und zum anderen die Aminotransferase LivB, welche zu einem Antibiotikum produzierendem Gencluster aus dem Bakterium *Streptomyces lividans* gehört.

Um die Lesbarkeit der Arbeit zu verbessern, wurden die Einleitung und die Ergebnisse bzw. Diskussion der jeweiligen Enzyme in einen Abschnitt zusammengefasst. In Abschnitt 2 der Arbeit wird die 4-Cumarat:Coenzym A Ligase 1 behandelt, während Abschnitt 3 die Einleitung, Ergebnisse und Diskussion der Aminotransferase LivB beinhaltet. Da sich die verwendeten Methoden sehr ähneln, wurde ein gemeinsamer Material- und Methodenteil für beide Proteine angefertigt, welcher sich im Abschnitt 4 befindet. Auf die entsprechenden Methoden wird im jeweiligen Ergebnisteil verwiesen.

2 4-Cumarat:Coenzym A Ligase 1

2.1 Einleitung

2.1.1 Die Adenylat-bildende Enzymfamilie

Die Familie der Adenylat-bildenden Enzyme besteht aus Proteinen, bei welchen im Reaktionsverlauf ein Adenylat erzeugt wird. Alle Mitglieder dieser Familie besitzen einen ähnlichen zweistufigen Reaktionsmechanismus (Abb. 2-1). Im ersten Reaktionsschritt (I) wird unter ATP-Verbrauch als Intermediat ein Adenylat gebildet, während im zweiten Reaktionsschritt (II) das adenylierte Substrat auf den Akzeptor (Y) übertragen wird. Durch die Adenylierung wird ein Intermediat mit energiereicher Bindung gebildet, welches durch das Akzeptormolekül leichter angegriffen werden kann. Die Energie für beide Reaktionsschritte wird hierbei durch die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Pyrophosphat (PP_i) und Adenosinmonophosphat (AMP) sowie der anschließenden Hydrolyse des Pyrophosphates zu Phosphat geliefert.

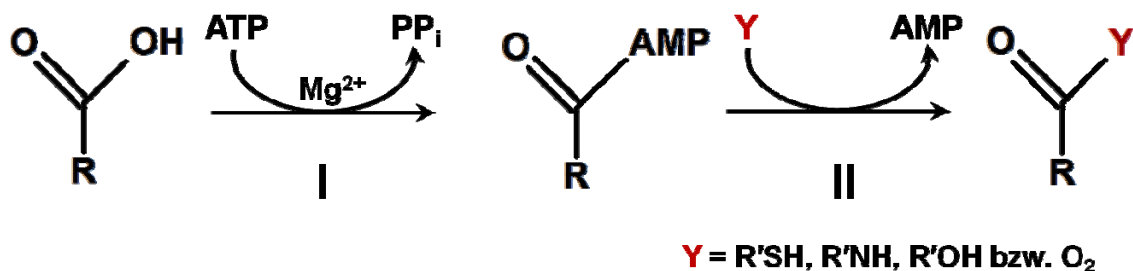


Abb. 2-1: Reaktionsmechanismus der Adenylat-bildenden Enzymfamilie.

Adenylat-bildende Enzyme sind in allen prokaryontischen und eukaryontischen Organismen vertreten. Die Enzymfamilie wurde zunächst aufgrund von sequenziellen und strukturellen Ähnlichkeiten in drei Unterfamilien unterteilt [Fulda *et al.*, 1994; Gulick *et al.*, 2004]. In die Unterfamilie I wurden die nicht-ribosomalen Peptid-Synthetasen (NRPS) wie die Phenylalanin aktivierende Domäne von Gramicidin S (PheA), die D-Alanin aktivierende Domäne (DltA) aus *Bacillus subtilis* und die 2,3-

Dihydroxybenzoat-AMP-Ligase (DhbE) eingegliedert. Die Unterfamilie II beinhaltet die Acyl- und Aryl Coenzym A Synthetasen wie z.B. die Acetyl:Coenzym A Synthetasen (ACSs), die 4-Cumarat:Coenzym A Ligasen (4CLs) und die 4-Chlorobenzoyl-CoA Ligasen (CBALs), während Unterfamilie III die Oxidoreductasen, also die Gruppe der Luciferasen, umfasst. Durch Schmelz und Naismith wurde 2009 eine neue Ordnung eingeführt, welche mehr auf der den Enzymen gemeinsamen chemischen Reaktion beruht und zwei weitere Enzymgruppen enthält, die Aminoacyl-tRNA Synthetasen und die NRPS unabhängigen Siderophor (NIS) Synthetasen, die sich in ihrer Struktur von denen der Unterfamilien unterscheiden [Schmelz *et al.*, 2009]. Klasse I der Superfamilie der Adenylat-bildenden Enzyme besteht aus den früheren Unterfamilien I bis III als Unterklasse Ia, Ib und Ic. Die Klasse II enthält die Aminoacyl-tRNA Synthetasen und die Klasse III die NRPS unabhängigen Siderophor (NIS) Synthetasen.

Obwohl sich der Reaktionsmechanismus sehr ähnelt, sind die von den Enzymen verwendeten Substrate jedoch sehr verschieden. So ist z.B. die ACS von großer Bedeutung für den Zellstoffwechsel bei Bakterien, Pflanzen und Tieren, da durch sie die Bildung von Acetyl-Coenzym A katalysiert wird (Abb. 2-2a). Acetyl-Coenzym A ist als energiereiche Verbindung ein wichtiger Bestandteil sowohl im Kohlenhydratstoffwechsel, bei der Fettsäurebiosynthese als auch für die Synthese von Isoprenoiden [Michal, 1999; Voet *et al.*, 1995]. DhbE ist dagegen als Teil einer nicht-ribosomalen Peptidsynthase an der Synthese von Bacillibactin beteiligt, einem von Bakterien produziertem Siderophor, welches der Eisengewinnung aus der Umgebung dient (Abb. 2-2b) [May *et al.*, 2001]. Bei der Luciferase aus den Glühwürmchen wird hingegen durch die Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin Licht emittiert (Abb. 2-2c) [White *et al.*, 1971], das typische Leuchten der Käfer dient dem Anlocken von potentiellen Partnern für die Fortpflanzung [Stanger-Hall *et al.*, 2007].

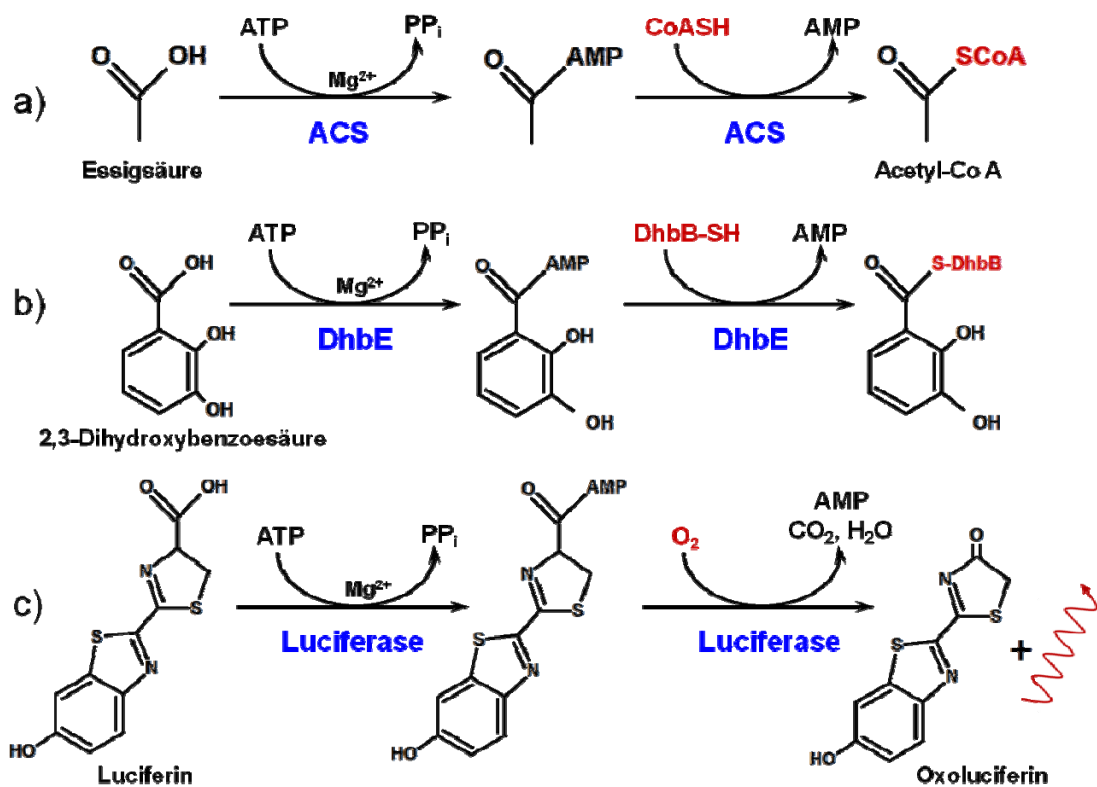


Abb. 2-2: Reaktionsmechanismus ausgewählter Adenylierungsenzyme.

Dargestellt sind Vertreter der drei Unterklassen der Adenylat-bildenden Enzyme. In a) ist die Reaktion der Acetyl:Coenzym A Synthetase (ACS) zu sehen, b) zeigt den Reaktionsmechanismus der nicht-ribosomalen Peptid-Synthetase DhbE und in c) ist die von der Luciferase (Luc) katalysierte Reaktion dargestellt. Jeweils in rot sind die Akzeptormoleküle markiert, in blau die beteiligten Enzyme.

Alle Mitglieder der Klasse I haben jedoch neben dem Reaktionsmechanismus noch ein weiteres Merkmal gemeinsam. So besitzen alle Enzyme eine bestimmte Sequenz konservierter Aminosäuren, durch welche sie sich in diese Klasse einordnen lassen. Mit leichten Variationen kann diese Sequenz in allen Mitgliedern der Enzymklasse gefunden werden (Abb. 2-3) [Chang *et al.*, 1997].



Abb. 2-3: Konserviertes Sequenzmotiv der Klasse I der Adenylat-bildenden Enzymfamilie.

Fettgedruckt sind die am stärksten konservierten Aminosäuren dargestellt, in Klammer alternativ vorkommende Aminosäuren. Der Buchstabe X bezeichnet eine beliebige Aminosäure. Die Zahlen beziehen sich auf die Sequenz der 4-Chlorobenzoyl-CoA Ligase (CBAL) aus *Pseudomonas sp.* [Chang *et al.*, 1997].

2.1.1.1 Kristallstrukturen der Klasse I der Adenylat-bildenden Familie

Ein weiteres Merkmal der Enzyme der Klasse I ist ein ähnliches Faltungsmuster, was durch die Aufklärung der Kristallstrukturen einiger Mitglieder gezeigt werden konnte. So weisen die Strukturen der Luciferase [Conti *et al.*, 1996], der Acetyl-CoA Synthetasen aus Bakterien [Gulick *et al.*, 2003] und Hefe [Jogl *et al.*, 2004], der CBAL [Gulick *et al.*, 2004], der Acyl-CoA Synthetase langkettiger Fettsäuren (LC-FACS) aus *Thermus thermophilus* [Hisanaga *et al.*, 2004] sowie der Adenylierungsdomänen PheA [Conti *et al.*, 1997], DhbE [May *et al.*, 2002] und DltA [Du *et al.*, 2008; Yonus *et al.*, 2008] den gleichen Aufbau auf (Abb. 2-4). Die Enzyme lassen sich in zwei Domänen unterteilen, in eine große N-terminale und eine kleine C-terminale Domäne. Beide sind durch einen kurzen *loop*, der sogenannten *hinge* Region, miteinander verbunden. Die N-terminale Domäne kann noch in drei Subdomänen, zwei β -Faltblätter und ein α -barrel, untergliedert werden.

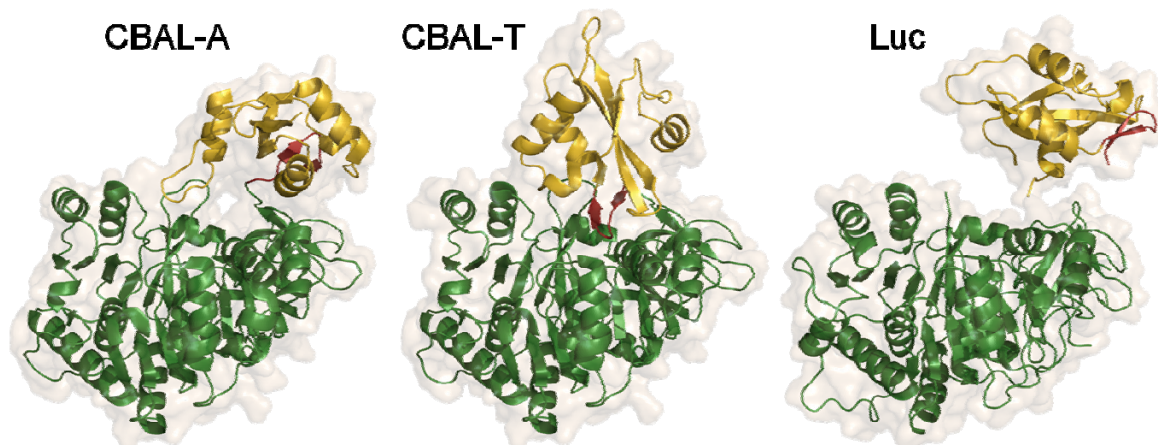


Abb. 2-4: Kristallstrukturen der 4-Chlorobenzoyl-CoA Ligase und Luciferase.

Dargestellt sind die Kristallstrukturen der 4-Chlorobenzoyl-CoA Ligase aus *Alcaligenes sp.* in der für die Adenylierung (CBAL-A) und Thioesterbildung (CBAL-T) benötigten Konformation sowie der Luciferase (Luc) aus *Photinus pyralis* in der offenen Konformation. Es wurde eine strukturelle Überlagerung der N-terminalen Domäne der 4-Chlorobenzoyl-CoA Ligase auf die N-terminale Domäne der Luciferase vorgenommen. In dunkelgrün ist die große N-terminale Domäne dargestellt, in gelb die kleine C-terminale Domäne. In rot sind die zwei ersten β -Stränge der kleinen C-terminalen Domäne nach der *hinge* Region markiert, um die Bewegung der Domäne deutlicher darzustellen. Die PDB-Codes der Enzyme sind: 3cw8 (CBAL-A), 3cw9 (CBAL-T) [Reger *et al.*, 2008] und 1lci (Luc) [Conti *et al.*, 1996].

Die Größe der Domänen schwankt zwischen den Mitgliedern der Enzymfamilie, so ist die N-terminale Domäne zwischen 400-550 Aminosäuren groß, während die C-terminale Domäne zwischen 100-140 Aminosäuren besitzt [Reger *et al.*, 2008]. Beim

Vergleichen der Strukturen zeigte sich zudem, dass die kleine C-terminale Domäne in verschiedenen Orientierungen bezüglich der N-terminalen Domäne auftritt (siehe Abb. 2-4). Zusammen mit Untersuchungen der Auswirkung von bestimmten Punktmutationen auf die Aktivität von der Luciferase und CBAL [Branchini *et al.*, 2005; Reger *et al.*, 2007] wurden als Erklärung für die unterschiedlichen Orientierungen der C-terminalen Domänen Konformationsänderungen während der Enzymreaktion postuliert [Reger *et al.*, 2008; Gulick, 2009]. So steht die Konformation der ersten Teilreaktion (Abb. 2-4, CBAL-A) für die Bildung des Adenylatintermediats und wird durch die Strukturen der Luciferase von *Luciola cruciata* [Nakatsu *et al.*, 2006], der Adenylierungsdomänen PheA [Conti *et al.*, 1997], DhbE [May *et al.*, 2002] sowie DltA aus *B. subtilis* [Yonus *et al.*, 2008], der ACS aus Hefe [Jogl *et al.*, 2004] und der CBAL [Gulick *et al.*, 2004] präsentiert. In der Adenylierungskonformation (*adenylation*) ist das aktive Zentrum durch eine enge Zusammenlagerung beider Domänen vom umgebenden Lösungsmittel abgetrennt [Yonus *et al.*, 2008; Gulick, 2009]. Die zweite Konformation entspricht dem zweiten Teilschritt der jeweiligen Enzymreaktion (Abb. 2-4, CBAL-T) und ist deshalb sehr unterschiedlich. Auch hier ist das aktive Zentrum vom Lösungsmittel separiert, jedoch ist die kleine Domäne um 140° im Vergleich zur ersten Konformation gedreht. Diese Konformation konnte bisher bei der bakteriellen ACS [Gulick *et al.*, 2003], der LC-FACS [Hisanaga *et al.*, 2004], DltA aus *B. cereus* [Du *et al.*, 2008] und der CBAL [Reger *et al.*, 2008] gefunden werden. Weitere Konformationen (Abb. 2-4, Luc) konnten bei Abwesenheit von Liganden in den Luciferasen aus *Photinus pyralis* [Conti *et al.*, 1996; Franks *et al.*, 1998] und der LC-FACS [Hisanaga *et al.*, 2004] entdeckt werden, siehe [Yonus *et al.*, 2008] und [Gulick, 2009]. Diese werden als „offene“ Konformationen bezeichnet, da die für die Enzymreaktion benötigten Aminosäurereste zu weit auseinanderliegen. Durch die Strukturen der CBAL in beiden Konformationen von Reger *et al.* konnte die These schließlich bestätigt werden [Reger *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008].

Da Kristallstrukturen nur einen Blick auf die Konformation zu einem bestimmten Zeitpunkt zulassen, wären Untersuchungen mittels Fluoreszenz oder NMR sehr interessant, um die Konformationsänderung während der Enzymreaktion in Lösung zu verfolgen. Die üblichen NMR-Methoden können jedoch nur für kleinere Proteine mit einer Größe von unter 30 kDa genutzt werden. Die Mitglieder der Klasse I der adenylat-bildenden Enzyme sind mit molekularen Größen zwischen 55-65 kDa für

NMR-Untersuchungen zu groß. Eine Möglichkeit mit Hilfe der NMR dennoch strukturelle Erkenntnisse zu gewinnen, wäre die partielle Isotopenmarkierung der Enzyme. So könnten sich durch eine Markierung der kleinen C-terminalen Domäne und NMR-Messungen mit verschiedenen Substraten bzw. Substratanaloga Aussagen über die Konformationsänderungen während der Reaktion treffen lassen. Die partielle Isotopenmarkierung sollte hierbei mit Hilfe der Methode der Protease-vermittelten Proteinligation (siehe Abschnitt 2.1.3.2) durchgeführt werden.

2.1.2 Ligation von Proteinen

Die Modifikation von Proteinen und Peptiden mit Fluoreszenzmarkern, nicht-proteinogenen Aminosäuren oder die Markierung von Proteinen mit Isotopen stellen wichtige Werkzeuge bei der Untersuchung von Protein-Protein Wechselwirkungen und bei der strukturellen Aufklärung von Proteinen dar. Die Ligation von Proteinen ist hierbei eine häufig angewandte Methode, um Peptide oder Proteine miteinander zu verknüpfen.

Isotopenmarkierte Peptide oder Proteine lassen sich mit Hilfe bakterieller Expressionssysteme produzieren [Marley *et al.*, 2001; Jansson *et al.*, 1996], allerdings kann die Einführung von nicht-proteinogenen Aminosäuren nur begrenzt auf diese Weise durchgeführt werden [Wang *et al.*, 2002]. Dafür wird vor allem die Methode der Festphasensynthese (*Solid-phase peptide synthesis* (SPPS)) verwendet, wobei die Limitierung hier bei Peptiden mit einer Länge von 60 Aminosäuren liegt. Dies kann durch die Methode der Proteinsynthese durch segmentierte Kondensation [Wallace, 1995] umgangen werden. Eine weitere Methode ist die Bromcyanspaltung und -religation, so konnte für Cytochrom c die Modifikation und Religation von Fragmenten gezeigt werden [Dyckes *et al.*, 1974; Wallace, 1993]. Der Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass an der Schnittstelle ein Methionin vorhanden sein muss.

Die Methode der *native chemical ligation* (NCL) wird zur Produktion längerer Peptide und kleiner Proteine von bis zu 120 Aminosäuren genutzt [Dawson *et al.*, 1994]. Die Reaktion eines Peptids mit N-terminalen Cysteinrest mit einem C α -Thioesterrest des zweiten Peptids erzeugt eine Amidbindung. Die Reaktion kann auch mehrfach ausgeführt werden um so längere Proteine zu synthetisieren [Becker *et al.*, 2003].

Eine Erweiterung der NCL erfolgt durch die Methode der *expressed protein ligation* (EPL), welche von Muir *et al.* [Muir *et al.*, 1998] entwickelt wurde. Dabei wird die rekombinate Produktion von Proteinen mit C α -Thioestern genutzt, um diese anschließend mit Peptiden mit einem N-terminalen Cystein zu verknüpfen.

2.1.2.1 Intein-vermittelte Proteinligation

Die Methode der Intein-vermittelten Proteinligation wurde zuerst von Evans *et al.* [Evans *et al.*, 2000] beschrieben. Inteine sind Segmente eines Proteins, welche sich autokatalytisch aus diesem herausschneiden können [Gogarten *et al.*, 2002]. Die verbleibenden Proteinsegmente (Exteine) werden durch das Intein wieder miteinander verbunden. Die Fähigkeit der Inteine wird im IMPACT™-System (New England Biolabs) mit der NCL kombiniert (Abb. 2-5) [Chong *et al.*, 1997; Southworth *et al.*, 1999]. Für die Produktion von Proteinen mit einem C α -Thioester wird das Zielgen zunächst in einen Expressionsvektor kloniert, welcher N-terminal ein Intein und C-terminal eine Chitinbindedomäne (CBD) enthält. Mit Hilfe der CBD kann das exprimierte Fusionsprotein an eine Chitinhaltige Matrix gebunden werden und so gereinigt werden. Durch Inkubation der an die Matrix gebundenen Fusionsproteine mit einer Thiolverbindung kann die Spaltung des Inteins veranlasst werden und das Zielprotein als C-terminaler Thioester eluiert werden [David *et al.*, 2004]. Das zweite Zielprotein kann auf ähnliche Weise mit einem N-terminalen Cystein versehen werden, dazu wird das Zielgen an den C-Terminus eines Inteins kloniert. Nach Reinigung von Fremdproteinen und Abspaltung des Inteins kann das Zielprotein fusioniert mit einem N-terminalen Cystein eluiert werden. Die Verknüpfung beider Zielproteine erfolgt anschließend über die NCL.

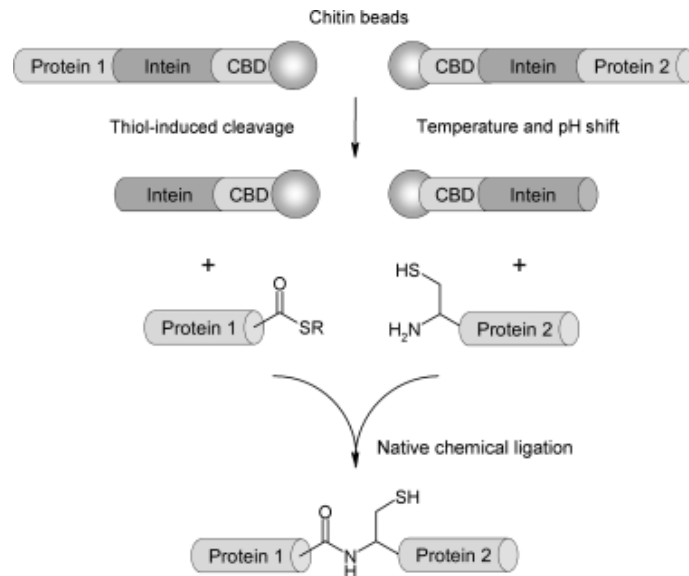


Abb. 2-5: IMPACT™-Systems nach [David *et al.*, 2004].
Die Chitin-Bindedomäne wird mit CBD abgekürzt.

2.1.2.2 Protease-vermittelte Proteinligation

Die beschriebenen Methoden haben jedoch Nachteile: zum einem muss stets ein Thioester an dem C-Terminus des ersten Zielpeptids oder -proteins vorliegen, zum anderen wird in die Aminosäuresequenz ein zusätzliches Cystein eingebaut. An sich stellt der Einbau einer zusätzlichen Aminosäure kein großes Problem dar, da in den meisten Fällen die Struktur eines Proteins dadurch nur gering verändert wird. Liegt die zusätzliche Aminosäure jedoch an einer wichtigen Stelle, z.B. in der Nähe des aktiven Zentrums, so kann durch den Einbau die Funktion des Proteins durchaus beeinträchtigt werden. Der Einbau eines zusätzlichen Cysteins kann außerdem zu Problemen bei der Faltung des Proteins führen, da das vorhandene Disulfidbrückenmuster dadurch gestört werden kann und es zu falsch verknüpften Disulfidbrücken und eventuellen Fehlfaltungen kommen kann.

In einer neuen Methode soll die schon sehr gut charakterisierte Protease Trypsin zur Proteinligation verwendet werden. Durch Untersuchungen von Trypsinmutanten konnte festgestellt werden, dass das Enzym unter bestimmten Bedingungen auch die Rückreaktion, also die Knüpfung einer Amidbindung, katalysiert [Wehofsky *et al.*, 2000; Rall *et al.*, 2002; Wehofsky *et al.*, 2003]. Zudem ist es der Arbeitsgruppe von Prof. F. Bordusa durch gezielte Mutagenese gelungen, eine Trypsin-Variante mit reduzierter Protease-Aktivität und modifizierter Erkennungssequenz zu entwickeln.

Die Trypsin-Variante K60E/N143H/E151H/D189K (Trypsinligase) erkennt spezifisch die Aminosäuresequenz Tyrosin-Arginin-Histidin (YRH) und schneidet diese nach dem Tyrosin [Liebscher *et al.*, 2006; Liebscher *et al.*, 2008]. Diese Erkennungssequenz wurde gewählt, weil sie laut Datenbankrecherchen in bisher bekannten Proteinsequenzen nur zu einem Prozentsatz von unter 0,5 % vorkommt und somit die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Nebenreaktionen sehr gering ist [Liebscher *et al.*, 2008].

Die Trypsin-Variante, auch Restriktionsligase genannt, schneidet zunächst das Zielprotein an der Erkennungssequenz unter Bildung eines Acyl-Enzym-Intermediats (Abb 2-6, 1). Im zweiten Teilschritt der Reaktion (Abb.2-6, 2) wird durch den Angriff eines geeigneten Nukleophils die Rückreaktion, also die Ligation, katalysiert. Normalerweise liegt das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite der Proteolyse, durch Zugabe des Nukleophils im Überschuss kann das Gleichgewicht auf die Seite der Ligation verschoben werden. Die Methode konnte schon erfolgreich zur Modifikation von Antikörperfragmenten mit Polyethylenglykol (PEG) angewandt werden, auch die Verknüpfung von zwei kleinen Parvulinen konnte nachgewiesen werden [Liebscher *et al.*, 2006; Liebscher *et al.*, 2008].

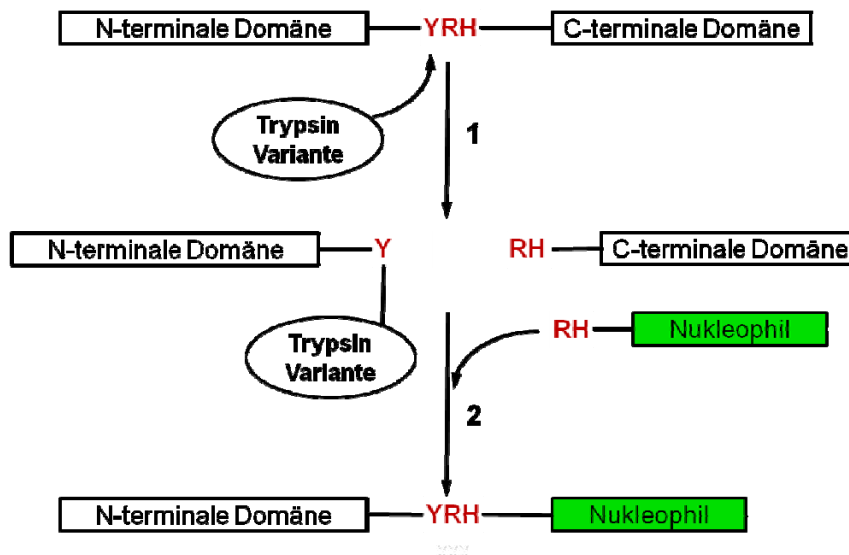


Abb. 2-6: Proteinligationsreaktion mit Hilfe der Trypsin-Variante K60E/N143H/E151H/D189K. Im ersten Teilschritt (1) der Reaktion ist die Proteolyse, in Schritt (2) die Ligation zu sehen. Die Erkennungssequenz der Trypsin-Variante ist rot markiert.

2.1.3 Die Cumarat:Coenzym A Ligase Familie

Die 4-Cumarat:CoA Ligase (4CL, E.C. 6.2.1.12) ist ein wichtiges Enzym im pflanzlichen Phenylpropanmetabolismus. In Pflanzen wird die Synthese vieler sekundärer Naturstoffe wie Farbpigmente, Signalstoffe oder Abwehrstoffe gegen Fraßfeinde durch den Phenylpropanmetabolismus geregelt [Ebel *et al.*, 1984; Dharmatilake *et al.*, 1992; Dixon *et al.*, 1995]. Die 4CL produziert dabei wichtige Vorstufen für die Synthese von Lignin, Stilbenen, Cumarinen und Flavonoiden [Douglas, 1996].

Durch die 4CL wird die Bildung von Thioestern aus Zimtsäurederivaten katalysiert (Abb. 2-7). In Schritt I wird das Zimtsäurederivat adenyliert, dieser Teilschritt wird durch die Hydrolyse von ATP zu Pyrophosphat angetrieben. Durch den Angriff des Thiols von CoA auf die energiereiche Bindung des adenylierten Intermediats in Schritt II kann unter AMP-Abspaltung das Produkt gebildet werden [Knobloch *et al.*, 1975; Heller *et al.*, 1993]. Die 4CL nutzt dabei verschiedene Zimtsäurederivate wie z.B. die 4-Cumarsäure, die Kaffeesäure, die Ferulasäure und die Sinapinsäure (Abb. 2-8).

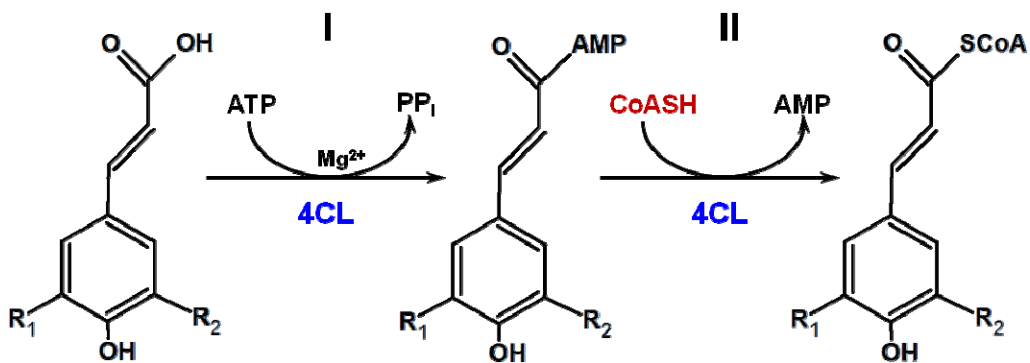


Abb. 2-7: Reaktionsmechanismus der 4-Cumarat:Coenzym A Ligase.

Im ersten Schritt (I) ist die Adenylierungsreaktion dargestellt, im zweiten Teilschritt (II) wird das Intermediat auf den Akzeptor CoA übertragen.

4-Cumarat:CoA Ligasen treten in Pflanzen oft in Isoformen auf, so besitzen z.B. Kartoffel (*Solanum tuberosum*), Pinie (*Pinus taeda*), Himbeere (*Rubus idaeus*), *Arabidopsis* und Sojabohne (*Glycine max*) [Lozoya *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2003; Ehlting *et al.*, 1999; Lindermayr *et al.*, 2002] mehrere Isoformen von 4CL. Meist haben diese Isoformen die gleiche Substratspezifität, in einigen Fällen wie z.B. bei *Arabidopsis* und Sojabohne (*Glycine max*) zeigen die einzelnen

Isoformen aber auch unterschiedliche Substratspezifitäten [Ehltling *et al.*, 1999; Lindermayr *et al.*, 2002].

Die 4-Cumarat:CoenzymA Ligase 1 (4CL1) ist eine von vier in der Sojabohne vorkommenden Isoformen [Lindermayr *et al.*, 2002]. Diese konnten mit Hilfe einer cDNA-Bank isoliert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die 4CL1 neben den für 4CLs üblichen Substraten noch zwei weitere Substrate, die Sinapinsäure und die künstlich hergestellte 3,4-Dimethoxyzimtsäure, umsetzt (Abb. 2-8) [Lindermayr *et al.*, 2003].

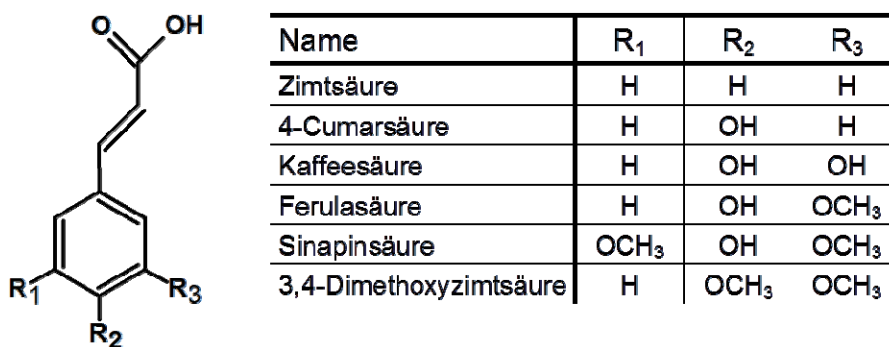


Abb. 2-8: Substrate der 4CL1 aus Sojabohne.

2.1.4 Stand der Arbeiten und Zielsetzung

Die 4CL1 wurde als Gegenstand der Untersuchungen ausgewählt, weil es für sie ein etabliertes Expressions- und Reinigungsprotokoll gibt, sich die Aktivität des Enzyms gut durch einen einfachen enzymatischen Test nachweisen lässt und es bisher noch keine strukturellen Ergebnisse von Mitgliedern der 4CL Familie gibt. Aufgrund ihrer Zugehörigkeit zur Familie der Adenylat-bildenden Enzyme und dem Vergleich der Sequenzen von strukturell aufgeklärten Mitgliedern mit der Aminosäuresequenz der 4CL1 konnte eine Unterteilung der 4CL1 in zwei Domänen durchgeführt werden (Abb. 2-9).

```

1-MAPSPQEIIIF RSPLPDIPIP THLPLYSYCF QNLSQFHDRP CLIDGDTGET LTYADVDLAA
RRIASGLHKI GIRQGDVIML VLRNCPQFAL AFLGATHRGA VVTANPFYT PAELAKQATA
TKTRLVITQS AYVEKIKSFA DSSSDVMVMC IDDDFSYEND GVLHFSTLSN ADETEAPAVK
INPDELVALP FSSGTSGLPK GVMLSHKNLV TTIAQLVDGE NPHQYTHSED VLLCVLPMFH
IYALNSILLC GIRSGAAVLI LQKFEITLL ELIEKYKVTV ASFVPPIVLA LVKSGETHRY
DLSSIRAVVT GAAPLGGELQ EAVKARLPHA TFGQGYGMTE AGPLAISMAF AKVPSKIKPG
ACGTVVRNAE MKIVDTETGD SLPRNKHGEI CIIGTKVMKG YLNDPEATER TVDKEGWLHT
GDIGFIDDDD ELFIVDRIKE LIKYKGFQVA PAELEALLIA HPNISDAAVV GMKDEAAGEI
PVAFVVRNNG SEIAEDEIKK YISQQVVFYK RICRVFFTDS IPKAPSGKIL RKVLTARLNE
GLVVAN-546
    
```

Abb. 2-9: Aminosäuresequenz der 4CL1.

Die N-terminale Domäne ist in dunkelgrün dargestellt, die C-terminale Domäne in gelb und die *hinge* Region ist rot markiert.

Für die rekombinante Expression wurde die 4CL1 in den Vektor pQE30 mit einem N-terminalen His₆-tag kloniert. Die 4CL1 hat, inklusive Fusionstag, 563 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von etwa 61 kDa. In Expressionsversuchen in *E. coli* konnte festgestellt werden, dass die 4CL1 sowohl als lösliches Protein als auch als unlösliches Protein produziert wird. Das Verhältnis von löslichem zu unlöslichem Protein kann jedoch durch Variation der Expressionsbedingungen beeinflusst werden [Höfer, 2004]. Ein Absenken der Expressionstemperatur sowie eine Erhöhung des pH-Wertes des Mediums führen hierbei zu einem größeren Anteil von löslich exprimiertem Protein. Durch N. Höfer konnte zudem sowohl die Reinigung von löslich exprimierter 4CL1 als auch die Rückfaltung und anschließende Reinigung der in *inclusion bodies* vorliegenden 4CL1 etabliert werden [Höfer, 2004].

Bisher durchgeführte Kristallisationsversuche der WT 4CL1 haben noch zu keinem Ergebnis geführt, weshalb auch andere Methoden wie die Strukturaufklärung mittels NMR in Betracht gezogen wurden, zudem diese auch Untersuchung von Konformationsänderungen während der Enzymreaktion ermöglichen. Die 4CL1 ist mit knapp 60 kDa für NMR-Untersuchungen leider zu groß. Dieses Problem soll mit Hilfe der partiellen Isotopenmarkierung der 4CL1 mittels der Methode der Protease-vermittelten Proteinligation (siehe Abschnitt 2.1.3.2) umgangen werden. Dafür wurde zunächst eine Variante von 4CL1 hergestellt, welche die Erkennungssequenz YRH der Trypsin-Variante in der *hinge* Region besitzt. Die Aktivität der 4CL1 Variante Y₄₃₆R₄₃₇H₄₃₈, welche als 4CL1 YRH_{hinge} bezeichnet wurde, konnte ebenfalls nachgewiesen werden [Bräuer, 2005]. Bei ersten Versuchen zur Protease-vermittelten Ligation mit dieser Variante zeigte sich jedoch, dass der für die Reinigung genutzte His₆-tag die Reaktion störte, da er die für die Enzymreaktion

notwendigen Zn^{2+} Ionen komplexierte und die Trypsin-Variante infolgedessen ausfiel. Daraufhin wurde der His₆-tag der 4CL1 Variante YRH_{hinge} mit Thrombin abgespalten und die Variante mittels Größenausschlusschromatographie von Thrombin abgetrennt. Allerdings konnte anscheinend das Thrombin trotz der Unterschiede in der Größe beider Proteine (4CL1 YRH_{hinge} 61 kDa, Thrombin 34 kDa) nicht vollständig abgetrennt werden, da die 4CL1 Variante nach der Reinigung im Reaktionspuffer abgebaut wurde. Die Verwendung von Proteasehemmern war nicht möglich, da davon auch die Trypsin-Variante gehemmt worden wäre [Bräuer, 2005].

Deshalb sollten in fortführenden Arbeiten im Rahmen der Doktorarbeit weitere Versuche zur partiellen Markierung der 4CL1 mit Hilfe der Protease-vermittelten Ligation durchgeführt werden. Hierfür mussten zunächst weitere Varianten von 4CL1 hergestellt werden. Zum einem wurden für Untersuchungen der Enzymaktivität und der Faltung des Proteins Vollängen-Varianten mit der Erkennungsequenz für die Trypsin-Variante benötigt. Zu anderen erforderten weitere Versuche zur Protease-vermittelten Ligation Varianten der einzelnen Domänen von 4CL1.

Damit sollte sowohl dem Ziel der strukturellen Aufklärung der 4CL1 als auch der Etablierung der Methode der Protease-vermittelten Ligation an großen Proteinen ein Stück näher gekommen werden.

2.2 Ergebnisse und Diskussion

2.2.1 Klonierung der 4CL1 *hinge* Varianten

Wie in Abschnitt 2.1.4 bereits erwähnt, war es bisher nicht möglich gewesen, das Vollängenkonstrukt 4CL1 YRH_{hinge} (siehe Abb. 2-10, 2-11 sowie Tab. 2-1) mit Hilfe der veränderten Trypsinvariante K60E/N143H/E151H/D189K zu spalten. Für weitere Untersuchungen wurden nun Konstrukte der einzelnen Domänen mit der Sequenz YRH in der *hinge* Region hergestellt (Abb. 2-11). Da der His₆-tag die Trypsinvariante stört, wurde ein Strep-II-tag für die Reinigung angefügt. Die Trypsinvariante besitzt zudem die Eigenschaft die Erkennungssequenz schlechter zu schneiden, wenn die der YRH Sequenz folgende Aminosäure sehr groß (Lysin/Argin) ist. Deshalb wurde eine Vollängenvariante und eine Variante der C-terminalen Domäne mit der Mutation YRHA in der *hinge* Region hergestellt (Abb. 2-11 und Tab. 2-1).

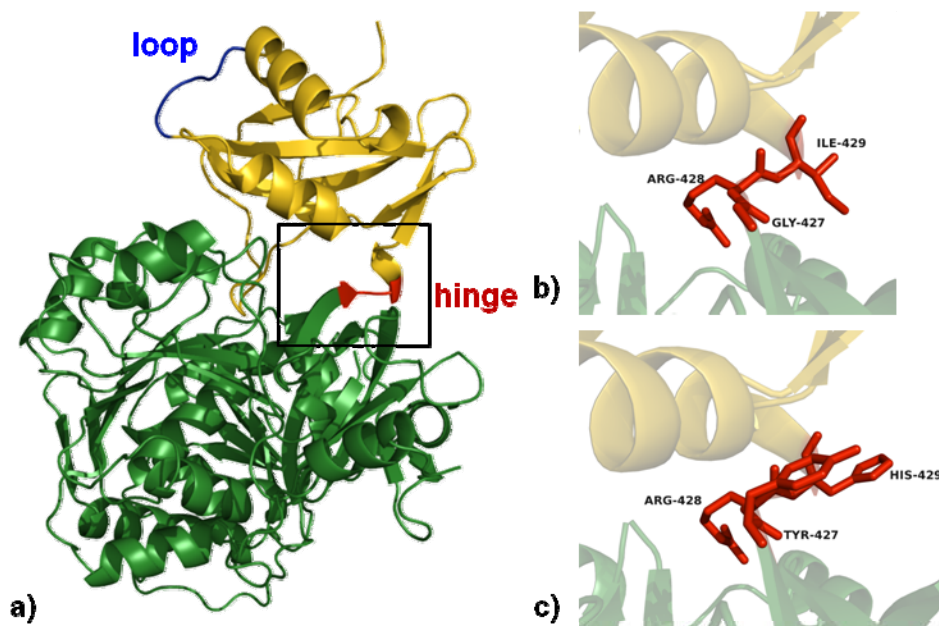


Abb. 2-10: Modell der Mutationen anhand der Struktur von PheA.

Darstellung der Mutageneseorte anhand der Struktur des verwandten Enzyms *Phenylalanine activating domain of gramicidin synthetase 1* (PheA), pdb code: 1amu [Conti *et al.*, 1997]. a) PheA wird in der Cartoondarstellung angezeigt. Die N-terminale Domäne ist in grün, die C-terminale Domäne in gelb dargestellt. Zusätzlich sind die Mutationsregionen markiert, die *hinge* Region in rot und die *loop* Region in blau. b) *hinge* Region von PheA in *stick*-Darstellung c) Modell der *hinge* Region von PheA mit der Erkennungssequenz Tyr-Arg-His in *stick*-Darstellung erstellt mit Pymol [Delano *et al.*, 2005].

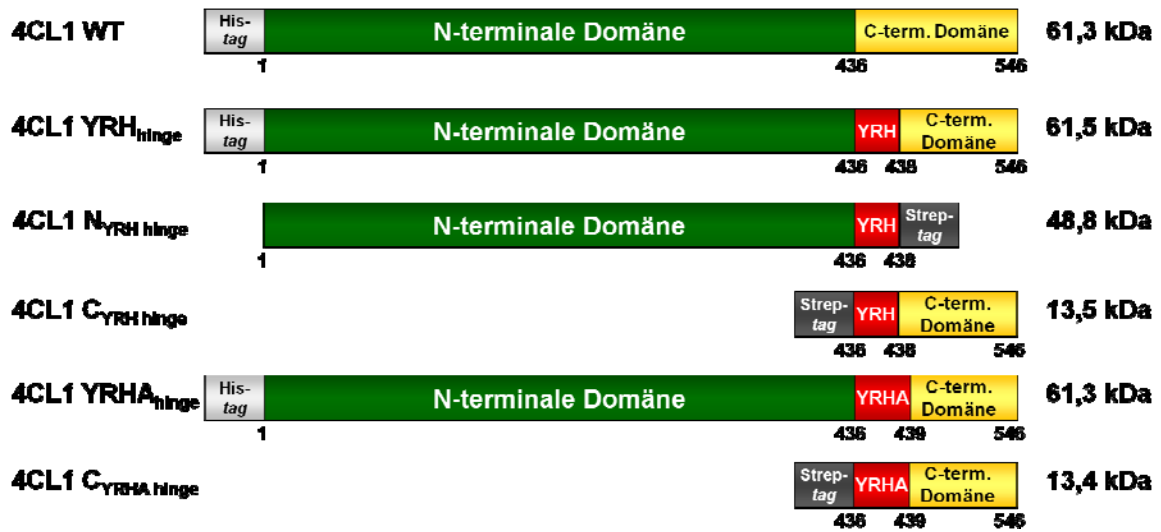


Abb. 2-11: Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte.

In grün ist die N-terminale Domäne dargestellt, gelb die kleine C-terminale Domäne. Die *hinge* Region mit der Erkennungssequenz Tyr-Arg-His bzw. Tyr-Arg-His-Ala ist in rot gefärbt.

Tab. 2-1: Auflistung der verwendeten 4CL1 Varianten sowie der Beschreibung der entsprechenden Mutationen.

Name der Variante	Beschreibung der Variante	Mutationen	Vektor	
4CL1 WT	4-Coumarat:Coenzym A ligase Wildtyp (WT) Isoform 1	---	pQE30	Diplomarbeit Nicole Höfer
4CL1 YRH _{hinge}	WT mit YRH Sequenz in der <i>hinge</i> Region	D436Y und L438H	pQE30	Diplomarbeit Ulrike Bräuer
4CL1 N _{YRH hinge}	N-Terminus des 4CL1 WT Variante von Aminosäure 2 - 435 + YRH Sequenz + Strep-tag	D436Y und L438H	pET11a	Ulrike Bräuer, diese Arbeit
4CL1 C _{YRH hinge}	Strep-tag + YRH Sequenz + C-Terminus des 4CL1 WT von Aminosäure 439-563	D436Y und L438H	pET11a	
4CL1 YRHA _{hinge}	4CL1 WT mit der Sequenz YRHA in der <i>hinge</i> Region	D436Y, L438H und K439A	pQE30	
4CL1 C _{YRHA hinge}	Strep-tag + YRH Sequenz + K439A + C-Terminus des 4CL1 WT von Aminosäure 440-563	D436Y, L438H und K439A	pET11a	

Die für die Klonierung verwendeten Primer sind in Tabelle 4-5 im Abschnitt 4.1.6 aufgeführt. Für alle hergestellten Varianten wurde die korrekte Sequenz anhand von DNA-Sequenzierungen überprüft.

2.2.1.1 Klonierung der 4CL1 Varianten N_{YRH hinge}, C_{YRH hinge} und C_{YRHA hinge}

Die Varianten N_{YRH hinge}, C_{YRH hinge} und C_{YRHA hinge} wurden durch PCR mit überhängenden Primern hergestellt. Als *template* diente die DNA der WT 4CL1. Für N_{YRH hinge} wurde N-terminal eine *Nde* I - Schnittstelle eingefügt und C-terminal ein Strep-II-tag zur Reinigung und eine *Bam*H I - Schnittstelle integriert. Als Primer wurden YRH_hinge_N_for und YRH_hinge_N_rev verwendet. Für die Varianten C_{YRH hinge} und C_{YRHA hinge} wurde N-terminal nach der Schnittstelle für *Nde* I der Strep-II-tag integriert, während C-terminal nur die *Bam*H I - Schnittstelle eingefügt wurde. Für die Amplifizierung der Varianten konnte derselbe *reverse* Primer YRH_hinge_C_rev verwendet werden, als *forward* Primer diente YRH_hinge_C_for bzw. YRH_hinge_C2_for.

Nach erfolgreicher Amplifizierung der Fragmente wurden diese anschließend mit den Restriktionsenzymen *Nde* I und *Bam*H I geschnitten und über das QIAquick PCR Purification Kit gereinigt. Nach der Ligation in den Vektor pET11a wurden die Varianten in den *E. coli* Stamm XL1 blue transformiert und von einigen Klonen die Plasmid-DNA isoliert und zur Sequenzierung geschickt.

2.2.1.2 Klonierung der 4CL1 Variante YRHA_{hinge}

Die Variante 4CL1 YRHA_{hinge} wurde durch Einführung der Mutation K439A in die Sequenz der Variante 4CL1 YRH_{hinge} im Vektor pQE30 mittels ortsgerechter Mutagenese erzeugt. Dabei wurden die Primer YRHA_hinge_for und YRHA_hinge_rev für die Amplifizierung verwendet.

Nach der Mutagenese wurden die *template* DNA mit dem Restriktionsenzym *Dpn* I abgebaut und die Plasmide mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt. Nach erfolgreicher Transformation wurde von einigen Klonen die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert.

2.2.2 Expression der 4CL1 *hinge* Varianten

Nicole Höfer konnte mit Untersuchungen zur Expression der WT Variante zeigen, dass diese nur zum Teil löslich exprimiert wird und der Anteil des löslichen Proteins an der Expression von der Expressionstemperatur und dem pH-Wert des Mediums abhängig ist [Höfer, 2004]. Als optimale Bedingungen für einen größtmöglichen Anteil von löslichem Protein wurde von ihr die Expression über Nacht (~ 16h) bei einem pH-Wert des Mediums von 8 und einer Temperatur von 30 °C angegeben.

Für alle Varianten wurden zunächst Testexpressionen durchgeführt, um Expressionsbedingungen für jede Variante zu finden. Der pH-Wert wurde für die Testexpressionen auf einen Wert von 8 eingestellt. Die Expression wurde in den *E. coli* Stämmen BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS, Rosetta (DE3), Rosetta (DE3) pLysS, BL21(DE3) Tuner und SG13009 (pREP4) getestet. Außerdem wurde die Konzentration des Induktionsmittels IPTG sowie die Expressionstemperatur und -länge variiert.

2.2.2.1 Expression der Varianten N_{YRH hinge}, C_{YRH hinge}, und C_{YRHA hinge}

Für die drei 4CL1 Varianten N_{YRH hinge}, C_{YRH hinge} und C_{YRHA hinge} konnte in Testexpressionen kein Unterschied in der Expression zwischen den verschiedenen *E. coli* Stämmen festgestellt werden, deshalb wurden weitere Testexpressionen jeweils mit dem Stamm BL21 (DE3) durchgeführt.

Die Variante 4CL1 N_{YRH hinge} zeigte die beste Expression bei Bedingungen, die denen der WT Variante ähneln. So konnte der größte Anteil an löslichem Protein bei 25 °C und einer niedrigen IPTG-Konzentration von 100 µM erzielt werden. Nach einer Expressionszeit von ~16 h betrug die Ausbeute aus 6 L Medium etwa 30 g Zellen. Trotz der optimierten Expressionsbedingungen wurde ein Großteil des produzierten Proteins als unlösliche *inclusion bodies* und nur ein vergleichsweise geringer Anteil als lösliches Protein gebildet, wie in Abbildung 2-12a zu erkennen ist. Die Menge des löslich exprimierten Proteins war jedoch ausreichend, um weitere Experimente durchführen zu können.

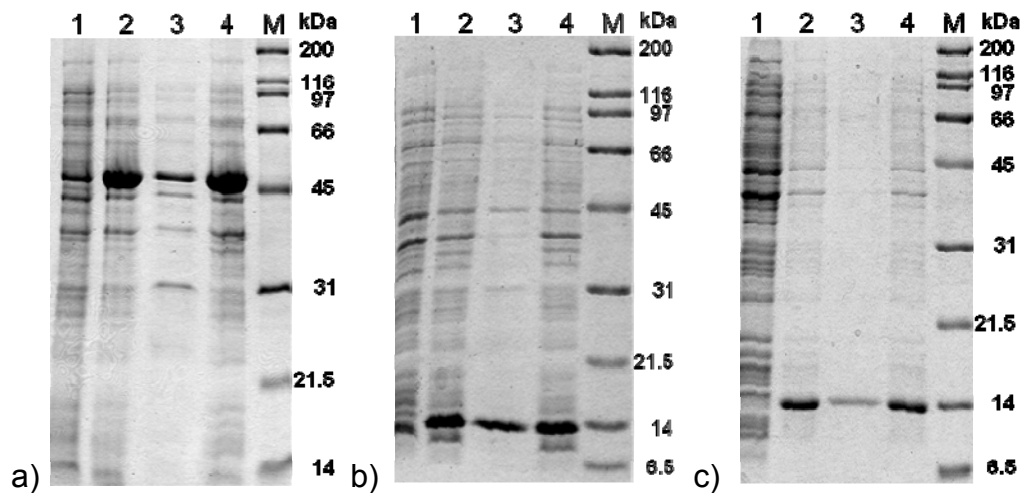


Abb. 2-12: SDS-PAGE der Expression von 4CL1 N_{YRH hinge}, C_{YRH hinge} und C_{YRHA hinge}.
a) 4CL1 Variante N_{YRH hinge}, Spur 1 - Zellen vor Induktion, Spur 2 - Zellen 16 h nach Induktion, Spur 3 - löslicher Überstand 16 h nach Induktion, Spur 4 - unlösliche Fraktion 16 h nach Induktion, M - Marker;
b) 4CL1 Variante C_{YRH hinge}, Spur 1 - Zellen vor Induktion, Spur 2 - Zellen 4 h nach Induktion, Spur 3 - löslicher Überstand 4 h nach Induktion, Spur 4 - unlösliche Fraktion 4 h nach Induktion, M - Marker;
c) 4CL1 Variante C_{YRHA hinge}, Spur 1 - Zellen vor Induktion, Spur 2 - Zellen 4 h nach Induktion, Spur 3 - löslicher Überstand 4 h nach Induktion, Spur 4 - unlösliche Fraktion 4 h nach Induktion, M - Marker.

Auch die beiden Varianten der C-terminalen Domäne zeigten bei der Expression sowohl einen löslichen als auch unlöslich exprimierten Proteinanteil (siehe Abb. 2-12b und c). Für die Varianten 4CL1 C_{YRH hinge} und C_{YRHA hinge} konnten bei Expression bei verschiedenen Temperaturen und auch mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen keine gravierenden Unterschiede im Verhältnis von unlöslich zu löslich exprimierten Protein gefunden werden. Die Expression erfolgte deshalb bei 37 °C und 1 mM Induktionsmittel über 4 Stunden. Die Zellausbeute war bei beiden Varianten gleich und betrug 20 g Zellen aus 6 L Medium. Es konnte von beiden Varianten genügend löslich exprimiertes Protein erhalten werden, um mit weiterführenden Versuchen fortfahren zu können.

2.2.2.2 Expression der Variante YRHA_{hinge}

Die Vollängenvariante 4CL1 YRHA_{hinge} zeigte die beste Expression im *E. coli* Stamm Sg13009 [Gottesman *et al.*, 1981], welcher durch das zusätzliche Plasmid pREP4 eine sehr gute Kontrolle der Induktion der Proteinexpression mit IPTG zulässt.

Das beste Verhältnis von löslich zu unlöslich exprimierten Protein wurde für die Variante YRHA_{hinge} bei einer Expressionstemperatur von 25 °C und 100 µM IPTG gefunden (siehe Abb. 2-13). Nach Expression über Nacht (~16 h) konnten 24 g Zellen aus 6 L Medium geerntet werden.

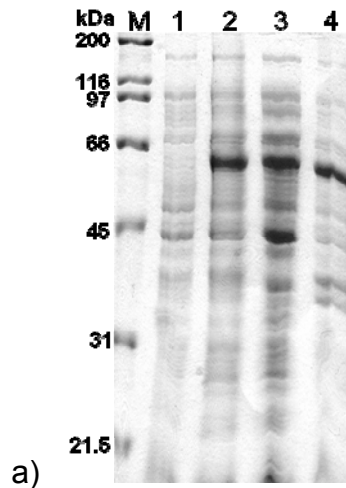


Abb. 2-13: SDS-PAGE der Expression von 4CL1 YRHA_{hinge}. 4CL1 Variante YRHA_{hinge}, Spur 1 - Zellen vor Induktion, Spur 2 - Zellen 16 h nach Induktion, Spur 3 - löslicher Überstand 16 h nach Induktion, Spur 4 - unlösliche Fraktion 16 h nach Induktion, M - Marker

2.2.3 Reinigung der 4CL1 *hinge* Varianten

Die Varianten N_{YRH hinge}, C_{YRH hinge} und C_{YRHA hinge} wurden zunächst durch Hochdruckdispersion aufgeschlossen, und der lösliche Überstand wurde mittels Zentrifugation isoliert (siehe 4.2.2.3). Anschließend wurden die Proteine über eine Streptactin Säule gereinigt (siehe 4.2.2.6). Je nach Reinigungsgrad der eluierten Proteine wurde nach diesem Schritt eine Größenausschlusschromatographie (siehe 4.2.2.7) durchgeführt. Bei dem Vollängenkonstrukt 4CL1 YRHA_{hinge} verlief die Reinigung nach dem Zellaufschluss über eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie (siehe 4.2.2.6).

2.2.3.1 Reinigung der Varianten N_{YRH hinge}, C_{YRH hinge} und C_{YRHA hinge}

Über eine Streptactin-Säule konnte die Variante N_{YRH hinge} von einem Großteil der sich im Überstand befindlichen *E. coli* Proteine abgetrennt werden (Abb. 2-14a). Da

die Elutionsfraktionen jedoch noch Verunreinigungen enthielten, wurde zusätzlich eine Gelfiltrationssäule zur Reinigung genutzt. Hiermit gelang es, N_{YRH hinge} von Aggregaten und den restlichen Verunreinigungen (siehe Abb. 2-14b, Spur 2 und 4) zu trennen. Die nach der Größenausschlusschromatographie gesammelte Proteinfraction zeigte in der SDS-PAGE keine sichtbaren Verunreinigungen mehr (siehe Abb. 2-14b, Spur 3). Für die Variante N_{YRH hinge} konnte eine Ausbeute von 4,2 mg Protein/L Expression berechnet werden (Tab. 2-2).

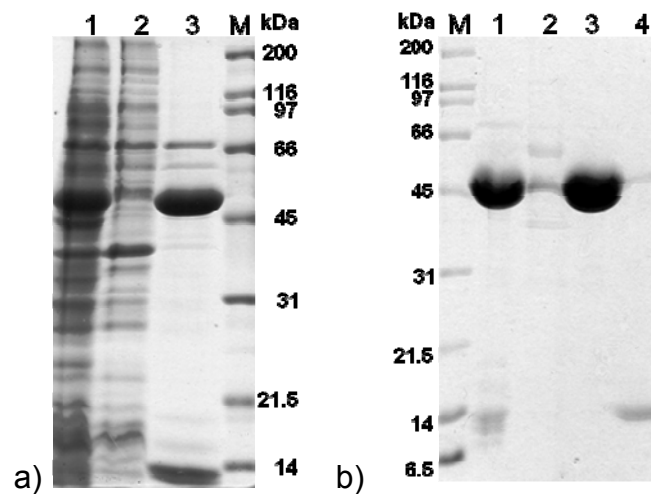


Abb. 2-14: SDS-PAGE der Reinigung der Variante N_{YRH hinge}.

a) Strep-tag Reinigung der 4CL1 Variante N_{YRH hinge}, Spur 1 - löslicher Überstand nach Zellaufschluss, Spur 2 - Durchflussfraktion, Spur 3 - Elutionsfraktion, M - Marker; b) Größenausschlusschromatographie der 4CL1 Variante N_{YRH hinge}, Spur 1 - konzentrierte Proteinprobe nach Strep-tag Reinigung, Spur 2 - erster Peak der Größenausschlusschromatographie (Aggregate), Spur 3 - zweiter Peak der Größenausschlusschromatographie (Elutionspeak), Spur 4 - dritter Peak der Größenausschlusschromatographie (Verunreinigung), M - Marker.

Sowohl die Variante C_{YRH hinge} als auch C_{YRHA hinge} zeigte nach dem ersten Reinigungsschritt schon eine sehr große Reinheit. Für C_{YRH hinge} ist in den Elutionsfraktionen nur eine zusätzliche Bande (Verunreinigung) bei etwa 30 kDa zusehen (Abb. 2-15a, Spur 5-7), bei C_{YRHA hinge} hingegen sind zwei zusätzliche Banden bei etwa 20 und 30 kDa in der SDS-PAGE vorhanden (Abb. 2-16a, Spur 5). Bei beiden Varianten konnte in den Waschfraktionen der Reinigung (Abb. 2-15a und Abb. 2-16a, Spur 3+4) auch das Zielprotein nachgewiesen werden. Da in den Durchflussfraktionen der Reinigung (Abb. 2-15a und Abb. 2-16a, Spur 2) keine Bande auf der Höhe von 13,5 kDa zu sehen ist, kann eine Überschreitung der Säulenkapazität ausgeschlossen werden. Anscheinend ist jedoch die Bindung des Strep-II-tags beider Varianten an die Streptactinsäule nicht sehr fest und durch zu

langes Waschen der Säule kann bereits ein Teil des Proteins ausgewaschen werden.

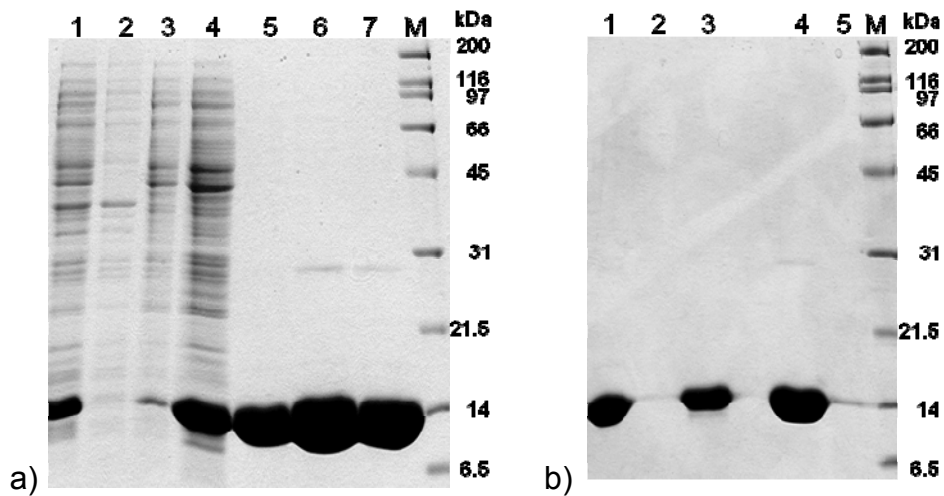


Abb. 2-15: SDS-PAGE der Reinigung der Variante $C_{YRH\ hinge}$.

a) Strep-tag Reinigung der 4CL1 Variante $C_{YRH\ hinge}$, Spur 1 - löslicher Überstand nach Zellaufschluss, Spur 2 - Durchflussfraktion, Spur 3+4 - Waschfraktionen, Spur 5-7- Elutionsfraktionen, M - Marker; b) Größenausschlusschromatographie der 4CL1 Variante $C_{YRH\ hinge}$, Spur 1 - konzentrierte Proteinprobe nach Strep-tag Reinigung, Spur 2 - Peak I der Größenausschlusschromatographie, Spur 3 - Peak II der Größenausschlusschromatographie, Spur 4 - Peak III der Größenausschlusschromatographie, Spur 5 - Peak IV der Größenausschlusschromatographie, M - Marker.

Nachdem es bei ersten Versuchen zur Protease vermittelten Proteinligation mit der Variante $C_{YRH\ hinge}$ unerwartet niedrige Reaktionsumsätze gab (siehe 2.2.4.1), wurde für beide Varianten noch eine Größenausschlusschromatographie als zusätzliche Reinigung angeschlossen. Wie schon beim ersten Reinigungsschritt verlief auch die Größenausschlusschromatographie bei beiden Varianten gleich. Der Verlauf der Größenausschlusschromatographie von $C_{YRH\ hinge}$ und $C_{YRHA\ hinge}$ (Abb. 2-17) zeigte, dass sich die Varianten in zwei Hauptpeaks (Abb. 2-16c, Peak II und III), einen Aggregationspeak (Abb. 2-16c Peak I) sowie einen weiteren kleinen Peak (Abb. 2-16c Peak IV) auftrennen lassen. In der SDS-PAGE Analyse der Reinigung war in den Fraktionen des Peaks I nur wenig Protein vorhanden (Abb. 2-15b und 2-16b, Spur 2), wobei es sich wahrscheinlich um aggregiertes Protein oder größere Oligomere handelt. Die Fraktionen des Peak IV der Größenausschlusschromatographie (Abb. 2-15b und 2-16b, Spur 5) enthielten ebenfalls nur sehr wenig Protein. Hierbei kann es sich aber auch um ein Artefakt im Gel handeln, da die sehr späte Elution des Peak IV eher auf niedermolekulare Substanzen wie Salze hinweist. Die beiden Hauptpeaks II und III enthielten beide das gesuchte Protein (Abb. 2-15b und 2-16b, Spur 3 und

4). Das Laufverhaltens auf der Gelfiltrationssäule (Abb. 2-16c) lässt darauf schließen, dass es sich hierbei um Monomer- und Dimerespezies der Varianten $C_{YRH\ hinge}$ und $C_{YRHA\ hinge}$ handelt. Die Verunreinigungen, welche nach Streptactinsäule bei 30 kDa, und für $C_{YRHA\ hinge}$ zusätzlich bei 20 kDa, im Gel zu sehen waren, konnten durch die Größenausschlusschromatographie nicht vollständig entfernt werden. Für die Variante $C_{YRH\ hinge}$ war es möglich, die Dimer Fraktion von der 30 kDa Bande zu reinigen. Bei $C_{YRHA\ hinge}$ ließen sich die Verunreinigungen weder in der Dimer-Spezies noch der Monomer-Spezies entfernen. Eine mögliche Erklärung für die Banden könnten Verunreinigungen sein, die sehr stark an die Varianten binden und sich somit durch eine Größenausschlusschromatographie nicht abtrennen lassen. Die Ausbeute nach der Gelfiltrationssäule betrug für die Variante $C_{YRH\ hinge}$ 20,6 mg Protein/L Expression und für die Variante $C_{YRHA\ hinge}$ 9,5 mg Protein/L Expression (Tab. 2-2).

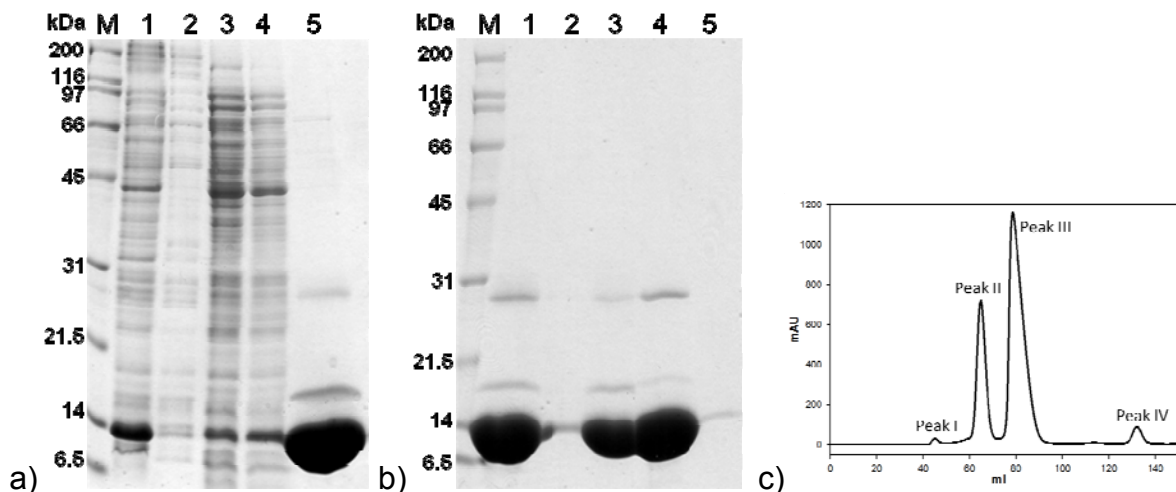


Abb. 2-16: SDS-PAGE der Reinigung der Variante $C_{YRHA\ hinge}$.
a) Strep-tag Reinigung der 4CL1 Variante $C_{YRHA\ hinge}$, Spur 1 - löslicher Überstand nach Zellaufschluss, Spur 2 - Durchflussfraktion, Spur 3+4 - Waschfraktionen, Spur 5 - Elutionsfraktion, M - Marker; b) Größenausschlusschromatographie der 4CL1 Variante $C_{YRHA\ hinge}$, Spur 1 - konzentrierte Proteinprobe nach Strep-tag Reinigung, Spur 2 - Peak I der Größenausschlusschromatographie, Spur 3 - Peak II der Größenausschlusschromatographie, Spur 4 - Peak III der Größenausschlusschromatographie, Spur 5 - Peak IV der Größenausschlusschromatographie, M - Marker. c) Laufschemata der Größenausschlusschromatographie der Variante 4CL1 $C_{YRHA\ hinge}$

2.2.3.2 Reinigung der Variante YRHA_{hinge}

Für die Reinigung des Vollängenkonstruktes YRHA_{hinge} wurde das Reinigungsschema der WT Variante leicht optimiert.

Die Variante YRHA_{hinge} wurde im Puffer A, welcher 20 mM Imidazol enthielt, auf die Säule aufgetragen, damit die Bindung von Fremdprotein an die Säulenmatrix verringert wurde. Mit einer anschließenden Gradientenstufe auf 10 % Puffer B (etwa 43 mM Imidazol) wurden weitere Verunreinigungen entfernt (siehe Abb. 2-17, Spur 4). Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten über 10 CV auf 100 % Puffer B. Das Zielprotein eluierte dabei bei einer Imidazolkonzentration von ungefähr 80 mM. In der SDS-PAGE Analyse zeigte sich, dass Elutionsfraktion neben dem Zielprotein YRHA_{hinge} nur noch leichte Verunreinigungen aufwies (Abb. 2-17, Spur 5). Für den anschließenden Aktivitätstest war diese Reinheit ausreichend. Die Variante YRHA_{hinge} zeigte nach der Affinitätschromatographie eine Ausbeute von 5,3 mg Protein/L Expression (Tab. 2-2).

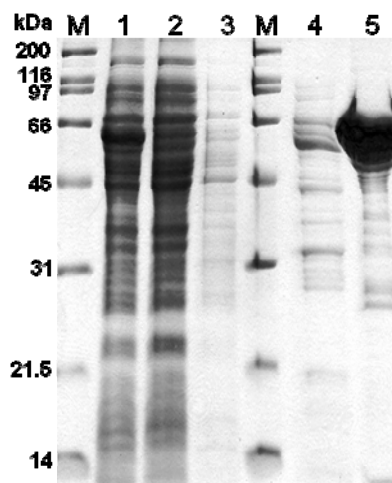


Abb. 2-17: SDS-PAGE der Reinigung der Variante YRHA_{hinge}. Ni²⁺-Affinitätschromatographie der 4CL1 Variante YRHA_{hinge}, Spur 1 - löslicher Überstand nach Zellaufschluss, Spur 2 - Durchflussfraktion, Spur 3 - Waschfraktion, Spur 4 - Peak I (10 % Gradient, 43 mM Imidazol), Spur 5 – Peak II (26 % Gradient, 80 mM Imidazol), M – Marker.

Tab. 2-2: Ausbeute der 4CL1 Varianten nach Reinigung

Variante	Ausbeute nach Affinitätschromatographie [mg/L Expression]	Ausbeute nach Größenausschlusschromatographie [mg/L Expression]
4CL1 WT	28,7	27,0
4CL1 YRH _{hinge}	34,0	17,4
4CL1 N _{YRH hinge}	6,2	4,2
4CL1 C _{YRH hinge}	33,0	20,6
4CL1 YRHA _{hinge}	5,3	-
4CL1 C _{YRHA hinge}	23,2	9,5
4CL1 YRH _{loop}	27,3	24,3
4CL1 N _{YRH loop}	12,2	-

2.2.4 Versuche zur Protease vermittelten Proteinligation mit den Varianten 4CL1 N_{YRH hinge}, C_{YRH hinge} und C_{YRHA hinge}

Für die Versuche wurden die Variante N_{YRH hinge}, C_{YRH hinge} und C_{YRHA hinge} zunächst gegen den Puffer D (siehe 4.2.2.13) dialysiert, um das Reduktionsmittel DTT zu entfernen. Die verwendete Trypsin-Variante K60E/N143H/E151H/D189K [Liebscher *et al.*, 2006; Liebscher *et al.*, 2008] ist gegen DTT empfindlich und schon geringe Mengen von 5-10 mM können die Aktivität der Protease beeinträchtigen. Um den Puffer weiterhin unter reduzierenden Bedingungen zu halten, wurde stattdessen das Reduktionsmittel TCEP verwendet. Dies kann in geringeren Mengen eingesetzt werden, da es nicht durch Luftsauerstoff oxidiert werden kann. Für die ersten Tests wurde die Variante N_{YRH hinge} auf 100 - 470 µM und die Varianten C_{YRH hinge} und C_{YRHA hinge} auf 100 - 1100 µM konzentriert und für die Versuche an Dr. S. Liebscher weitergegeben.

2.2.4.1 Abspaltung des Strep-II-tags

Als erster Schritt wurde getestet, ob die Trypsin-Variante in der Lage ist, den Strep-II-tag von den 4CL1 Varianten abzuspalten. Damit liesse sich eine erste Aussage darüber treffen, ob die Schnittstelle gut zugänglich ist. Für die Variante N_{YRH hinge} konnte über einen Western Blot mit einem Strep-II-tag-Antikörper nachgewiesen

werden (siehe Abb. 2-18), dass der Strep-II-tag abgespalten wird. Nach 30 Minuten ist deutlich zu erkennen, dass die Bande auf Höhe des Proteins mit Strep-II-tag schwächer ist. Allerdings scheint die Trypsinvariante auch nach einer Stunde die eingesetzte Menge des zu spaltenden Proteins noch nicht vollständig umgesetzt zu haben. Eine Erklärung hierfür könnte darin liegen, dass die Domäne mit 438 Aminosäuren (siehe Abb. 2-11) recht groß ist und die Schnittstelle direkt an die Domäne anschließt, ohne weitere Aminosäuren als Spacer. Das kann dazu führen, dass die Trypsin-Variante die Schnittstelle nicht gut erreichen kann. Es lässt sich dadurch aber nicht erklären, warum der Umsatz nach 30 Minuten stagniert. Eventuell kann es sein, dass sich der Strep-II-tag bei einigen Proteinspecies im Inneren des Proteins versteckt und so nicht mehr zugänglich ist. Dies kann jedoch erst nach der Proteinreinigung erfolgt sein, da die Affinitätsreinigung über den Strep-II-tag läuft und das Protein nicht an die Säule gebunden hätte, wenn der Strep-II-tag nicht exponiert gewesen wäre.

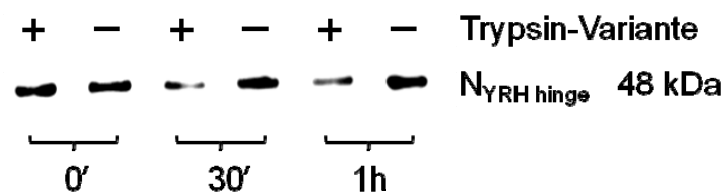


Abb. 2-18: Western Blot der Abspaltung des Strep-II-tags der 4CL1 Variante $N_{YRH\ hinge}$ (Dr. S. Liebscher).

Analyse der Spaltreaktion von 4CL1 Variante $N_{YRH\ hinge}$ durch die Trypsin-Variante K60E/N143H/E151H/D189K mittels Western Blot mit Anti-Strep-II-tag Antikörper. Aufgetragen sind Proben der Reaktion zum Zeitpunkt 0, nach 30 min und nach 60 min.

Die ersten Versuche für die kleine Domäne wurden zunächst mit der Variante $C_{YRH\ hinge}$ durchgeführt. Nach ersten Testversuchen zeigte sich jedoch, dass erhebliche Probleme auftraten. Durch einen zusätzlichen Reinigungsschritt, einer Größenausschlusschromatographie, konnten zwei Proteinspecies, eine Monomer- und eine Dimer-Species, voneinander getrennt werden (siehe Abschnitt 2.2.3). Da die Monomerspecies dem Zustand der WT Variante entspricht, wurden nachfolgende Versuche mit dieser Species durchgeführt. Dennoch blieben die Probleme mit der Umsetzung durch die Trypsin-Variante bestehen. Eine denkbare Ursache könnte die Aminosäure an Position 439 sein. Im WT und auch in der Variante $C_{YRH\ hinge}$ befindet sich an dieser Position ein Lysin, welches eine sterische Behinderung der Trypsin-

Variante verursachen könnte. Die Variante C_{YRHA hinge} hat an dieser Position eine Mutation zu einem Alanin. Mit dieser Variante konnte ein Umsatz durch die Trypsin-Variante nachgewiesen werden. Es zeigten sich jedoch nach der Spaltung zwei Endprodukte, anscheinend konnte die Trypsin-Variante die Sequenz Y444/K445/G446 ebenfalls spalten, wodurch ein zweites kürzeres Produkt entstand (Abb. 2-19a Peak 1). Durch eine Veränderung der Trypsin-Variante von K60E/N143H/E151H/D189K zu K60E/N143H/E151H/D189S konnte die Affinität für die zweite Schnittstelle unterdrückt und eine vollständige Abspaltung des Strep-II-tags nachgewiesen werden (siehe Abb. 2-19b).

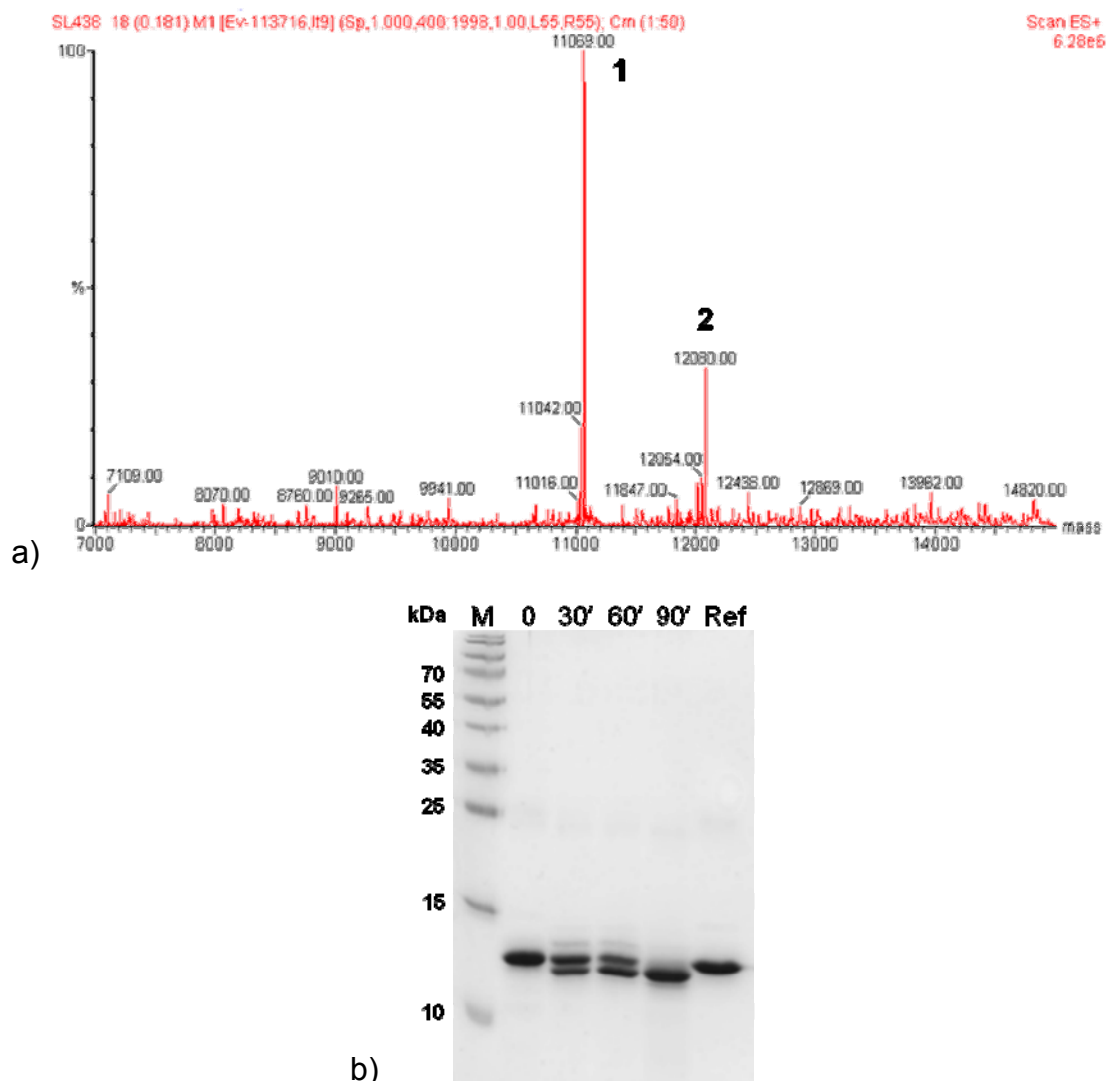


Abb. 2-19: Analyse der Abspaltung des Strep-II-tags der 4CL1 Variante C_{YRHA hinge} (Dr. A. Schierhorn und S. Liebscher).

a) Massenspektrometrische Analyse der Spaltung der Variante C_{YRHA hinge} mit der Trypsinvariante K60E/N143H/E151H/D189K b) SDS-PAGE Analyse der Spaltreaktion der 4CL1 Variante C_{2YRH hinge} mit der Trypsin-Variante K60E/N143H/E151H/D189S, aufgetragen sind Proben der Reaktion zum Zeitpunkt 0, nach 30 min, nach 60 min und nach 90 min, Ref - Variante C_{YRHA hinge}, M – Marker.

2.2.4.2 Ligation mit Fluoreszenzfarbstoffen

Nachdem die Abspaltung des Strep-II-tags bei beiden Varianten $N_{YRH\ hinge}$ und $C_{YRHA\ hinge}$ erfolgreich war, sollte in einem zweiten Schritt die Modifizierung beider Varianten mit Fluoreszenzfarbstoffen nachgewiesen werden, bevor Versuche zur Ligation beider Domänen miteinander unternommen wurden.

Für die Variante $N_{YRH\ hinge}$ konnte eine erfolgreiche Modifizierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxy-fluorescein durch Fluoreszenzanalyse nach SDS-PAGE nachgewiesen werden, bereits nach 5 min ist eine leichte Bande bei etwa 50 kDa zu sehen (siehe Abb. 2-20). Die Stärke der Bande nimmt im weiteren Verlauf der Reaktion zu. Eine vollständige Umsetzung des gesamten Ansatzes konnte jedoch nicht erreicht werden, was aber wahrscheinlich am schlechten Spaltungsverhalten der Variante $N_{YRH\ hinge}$ liegt (siehe 2.2.4.1).

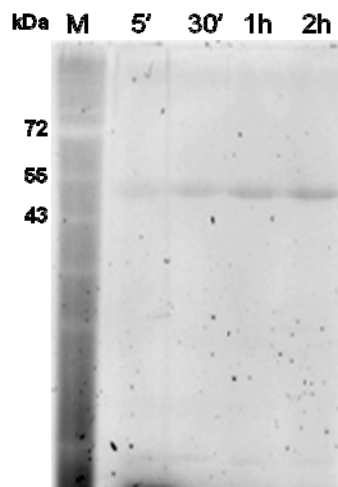


Abb. 2-20: Fluoreszenzanalyse der SDS-PAGE der Modifizierung der 4CL1 Variante $N_{YRH\ hinge}$ mit 6-Carboxy-fluorescein (Dr. S. Liebscher).

Analyse der Modifizierungsreaktion der 4CL1 Variante $N_{YRH\ hinge}$ mit 6-Carboxy-fluorescein, aufgetragen sind Proben der Reaktion nach 5 min, nach 30 min, nach einer Stunde und nach zwei Stunden, M – Marker.

Die Variante $C_{YRHA\ hinge}$ konnte hingegen fast vollständig mit dem Fluoreszenzfarbstoff Aminobenzoesäure- Ala_3 ($Abz-Ala_3$) umgesetzt werden (Abb. 2-21). So ist in der massenspektrometrischen Analyse des Reaktionsansatzes fast ausschließlich ein Peak mit der Masse des Produkt $Abz-Ala_3-C_{YRHA\ hinge}$ vorhanden (Abb. 2-21, Peak 1). Die gemessene molekulare Masse weicht dabei von der

theoretischen Masse von Abz-Ala₃-C_{YRHA hinge} nur um 2,6 Da ab (Tab. 2-3), was noch innerhalb des Toleranzbereiches des Massenspektrometers liegt.

Tab. 2-3: Theoretische und gemessene molekulare Massen der Reaktionskomponenten der Reaktion von C_{YRHA hinge} mit Aminobenzoesäure-Ala₃ (Abz-Ala₃).

	theoretische molekulare Masse in (Da)	gemessene molekulare Masse in (Da)	Differenz in (Da)	Peaknummer in Abb. 2-24
Aminobenzoesäure-Ala ₃ -C _{YRHA hinge}	12412,4	12415,0 (Peak1)	2,6	1
C _{YRHA hinge} , gespalten	12080,0	12082,0 (Peak 2)	2,0	2
C _{YRHA hinge} , ungespalten	13414,5	13418,0 (Peak 3)	3,5	3

Im Ansatz konnten auch zu einem geringen Anteil die Massen der ungespaltenen Variante C_{YRHA hinge} (Abb. 2-21, Peak 3) und der durch die Restriktionsligase gespaltenen Variante C_{YRHA hinge} (Abb. 2-21, Peak 1) nachgewiesen werden.

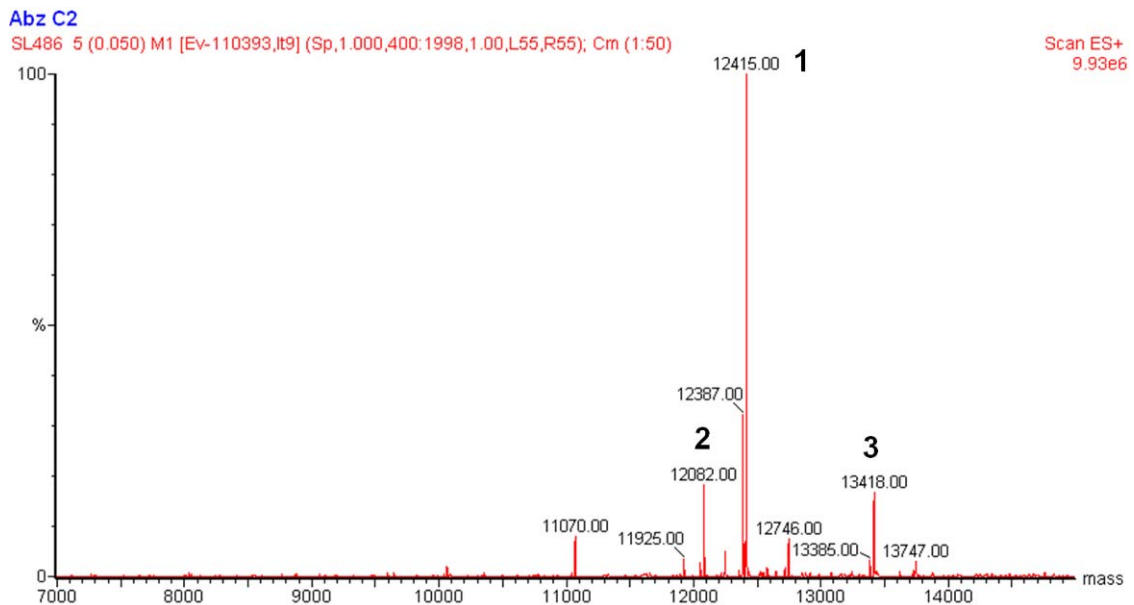


Abb. 2-21: Massenspektrometrische Analyse der Modifizierung der Variante C_{YRHA hinge} mit Aminobenzoesäure-Ala₃ (Dr. A. Schierhorn und Dr. S. Liebscher).

Während die Variante C_{YRHA hinge} sich von der Reaktionsligase sowohl gut spalten als auch religieren lässt, traten bei den bisherigen Versuchen bei der Variante N_{YRH hinge} Probleme auf. So zeigte sich, dass die Variante N_{YRH hinge} im Reaktionspuffer Puffer D (siehe 4.2.2.13) in hohen Konzentrationen von über 400 µM nicht mehr stabil ist

und ausfällt. Da der Reaktionspuffer für die Trypsin-Variante optimiert wurde, enthält er sowohl weniger Reduktionsmittel als auch eine geringere Konzentration an Natriumchlorid, beides wirkt aber stabilisierend auf die Proteinvarianten. Zudem war die Ausbeute der Ligationsreaktion von $N_{YRH\ hinge}$ mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxy-fluorescein nicht sehr hoch, was bedeutet, dass im ersten Reaktionsschritt, dem Abspalten des Strep-II-tags, schon sehr viel mehr Protein eingesetzt werden müsste, um eine ausreichende Menge für den zweiten Schritt zu erhalten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich beide Varianten einzeln durch Fluoreszenzfarbstoffe modifizieren lassen, wenn auch mit unterschiedlicher Effizienz. Die Ligation der großen N-terminalen Domäne $N_{YRH\ hinge}$ mit der kleinen C-terminalen Domäne $C_{YRH\ hinge}$ bzw. $C_{YRHA\ hinge}$ konnte jedoch in den bisherigen Experimenten nicht erfolgreich nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die Schnittstelle in der hinge Region des Proteins für die Trypsin-Variante doch zu schlecht zugänglich. Für dieses Argument spricht auch die Tatsache, dass die Variante der größeren der beiden Domänen $N_{YRH\ hinge}$ sich ebenfalls nur schlecht umsetzen lässt. Deshalb wurden nach neuen Varianten mit der Schnittstelle in einer besser zugänglichen Region des Proteins gesucht.

2.2.5 Klonierung, Expression und Reinigung der 4CL1 *loop* Varianten

Nach einer Analyse der WT 4CL1 Proteinsequenz mit mehreren Sekundärstrukturvorhersageprogrammen (GOR [Garnier *et al.*, 1996], Jprep [Cole *et al.*, 2008], Porter [Pollastri *et al.*, 2005] und Prof [Ouali *et al.*, 2000]) und dem Vergleich der Kristallstrukturen verwandter Enzyme aus der Familie der adenylylatbildenden Enzyme, wurden Varianten mit der Sequenz YRH in einer vermutlich besser zugänglichen *loop*-Region (As 488-494) kloniert (Abb. 2-10a). Es wurden sowohl Vollängenkonstrukte als auch Konstrukte der entsprechenden N- bzw. C-terminalen Bereiche hergestellt (siehe Abb. 2-22 und Tab. 2-4).

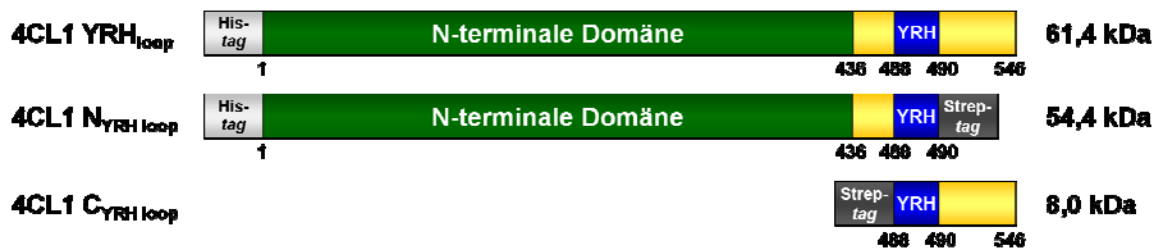


Abb. 2-22: Schematische Darstellung der Konstrukte YRH_{loop}, N_{YRH loop} und C_{YRH loop}.
In grün ist die N-terminale Domäne dargestellt, gelb die kleine C-terminale Domäne. Die Erkennungssequenz Tyr-Arg-His in der *loop*-Region ist in blau dargestellt.

Tab. 2-4: 4CL1 Varianten YRH_{loop}, N_{YRH loop} und C_{YRH loop} mit Beschreibung der entsprechenden Mutationen.

Name der Variante	Beschreibung der Variante	Mutationen	Vektor	
4CL1 YRH _{loop}	4CL1 WT mit der Sequenz YRH in der <i>loop</i> -Region (As 488-494)	S488Y, N489R und G490H	pQE30	Ulrike Bräuer, diese Arbeit
4CL1 N _{YRH loop}	N-Terminus des 4CL1 WT Variante von Aminosäure 2 - 487 + YRH Sequenz + Strep-tag	S488Y, N489R und G490H	pET11a	
4CL1 C _{YRH loop}	Strep-tag + YRH Sequenz + C-Terminus des 4CL1 WT von Aminosäure 488-546	S488Y, N489R und G490H	pET11a	

Die Varianten wurden mittels DNA-Sequenzierungen auf die korrekte Sequenz überprüft. In Tabelle 4-5 wurden die für die Klonierung verwendeten Primer aufgeführt.

2.2.5.1 Klonierung der 4CL1 Varianten YRH_{loop}, N_{YRH loop} und C_{YRH loop}

Die Variante YRH_{loop} wurde durch Mutation der Aminosäurereste 488-490 von SNG zur YRH mittels ortsgerechter Mutagenese hergestellt. Als *template* diente in diesem Fall die DNA des 4CL1 Wildtyps im Vektor pQE30 und es wurden die Primer YRH_{loop_for} und YRH_{loop_rev} benutzt.

Nach der Mutagenese wurden die *template* DNA mit dem Restriktionsenzym *Dpn I* abgebaut und die Plasmide mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt. Nach erfolgreicher Transformation wurde von einigen Klonen die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert.

Ausgehend von der Variante YRH_{loop} wurde durch PCR mit überhängenden Primern die beiden Varianten $N_{YRH_{loop}}$ und $C_{YRH_{loop}}$ hergestellt. Dafür wurde für die Variante $N_{YRH_{loop}}$ N-terminal die *Nde* I - Schnittstelle und C-terminal die *BamH* I - Schnittstelle sowie der Strep-II-tag mittels der Primers *YRH_hinge_N_for* und *N_YRH_loop_rev* eingefügt. Für $C_{YRH_{loop}}$ wurde N-terminal die Schnittstelle für *Nde* I integriert, während C-terminal nach der *BamH* I - Schnittstelle zusätzlich der Strep-II-tag eingefügt wurde. Als Primer wurden *C_YRH_loop_for* und *YRH_hinge_C_rev* verwendet.

Die amplifizierten Fragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *Nde* I und *BamH* I geschnitten und über das QIAquick PCR Purification Kit gereinigt. Anschließend wurden die Varianten in den Vektor pET11a ligiert und in den *E. coli* Stamm XL1 blue transformiert. Von einigen Transformaten wurde die Plasmid-DNA isoliert und zur Sequenzierung geschickt.

2.2.5.2 Expression der 4CL1 Varianten YRH_{loop} , $N_{YRH_{loop}}$ und $C_{YRH_{loop}}$

Wie schon in Abschnitt 2.2.2 erwähnt, wurden zunächst Testexpressionen mit mehreren Expressionsstämmen durchgeführt und außerdem die Konzentration des Induktionsmittels IPTG sowie die Expressionstemperatur und -länge variiert, um die besten Expressionsbedingungen für jede Variante zu finden.

Die Vollständigvariante 4CL1 YRH_{loop} zeigten die beste Expression im *E. coli* Stamm Sg13009 [Gottesman *et al.*, 1981]. Als bisher beste Expressionsbedingungen konnten eine niedrige IPTG-Konzentration (200 μ M) und Expressionstemperatur (30 °C) festgestellt werden. Bei Expression für 16 h zeigte die Variante eine Ausbeute von ~20 g Zellen aus 6 L Medium. Die Analyse der Expression von YRH_{loop} per SDS-PAGE (siehe Abb. 2-23) ergab jedoch nur eine verhältnismäßig geringe Expressionsrate von löslichem Protein. Im Vergleich zu Variante $YRHA_{hinge}$ (Abschnitt 2.2.2.2), welche etwa zu Hälfte lösliches Protein exprimiert, liegt bei YRH_{loop} die Ausbeute an löslichem Protein wesentlich niedriger. Da die Ausbeute jedoch für weitere Untersuchungen ausreichend war, wurde aus Zeitgründen darauf verzichtet, die Expression weiter zu optimieren. Es ist anzunehmen, dass die

Senkung der Expressionstemperatur und die Verwendung von weniger Induktionsmittel auch hier zu einem besseren Verhältnis zwischen löslich und unlöslich exprimierten Protein führen würden.

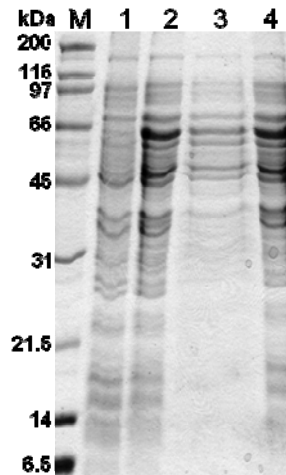


Abb. 2-23: SDS-PAGE der Expression von 4CL1 YRH_{loop}.
4CL1 Variante YRH_{loop}, Spur 1 - Zellen vor Induktion, Spur 2 - Zellen 16 h nach Induktion, Spur 3 - löslicher Überstand 16 h nach Induktion, Spur 4 - unlösliche Fraktion 16 h nach Induktion, M – Marker.

Die beste Expression der Variante N_{YRH loop} konnte im E. coli Stamm BL21(DE3) Tuner erzielt werden. In diesem Stamm ist der Laktosetransporter deletiert, weshalb nach Zugabe des Induktionsmittels IPTG die Proteinexpression nur langsam startet. Die Variante wurde bei einer Expressionstemperatur von 30 °C und 100 µM IPTG über Nacht (~16 h) exprimiert und es konnte ein Zellpellet von 27 g Zellen aus 6 L Medium gewonnen werden. Nach Analyse der Expression (siehe Abb. 2-24a) zeigte sich, dass N_{YRH loop} trotz optimierter Bedingungen nur zu einem kleinen Anteil als lösliches Protein exprimiert wurde. Möglicherweise kann die Ausbeute an löslichem Protein durch niedrigere Expressionstemperaturen und niedrigere IPTG-Konzentrationen noch verbessert werden. Ein Vergleich der Expressionsrate mit den Vollängenkonstrukten oder der Variante N_{YRH hinge} (Abschnitt 2.2.2.1) zeigte außerdem, dass N_{YRH loop} insgesamt schlechter exprimiert wird. Da die Proteinvariante nur einen Teil der C-terminalen Domäne besitzt, kann es sein, dass dieser Teil nicht vollständig gefaltet vorliegt. Dadurch ließe sich die schlechte Expression der Variante erklären.

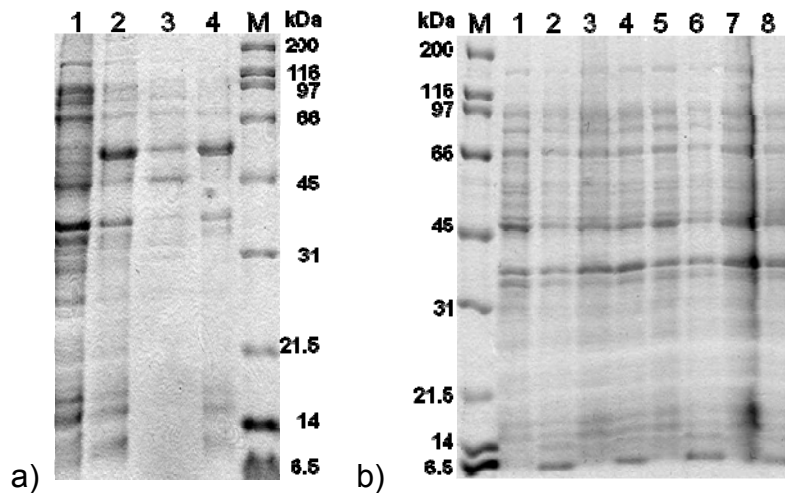


Abb. 2-24: SDS-PAGE der Expression von 4CL1 N_{YRH loop} and C_{YRH loop}.

a) 4CL1 Variante N_{YRH loop}, Spur 1 - Zellen vor Induktion, Spur 2 - Zellen 16 h nach Induktion, Spur 3 - löslicher Überstand 16 h nach Induktion, Spur 4 - unlösliche Fraktion 16 h nach Induktion, M - Marker;
 b) 4CL1 Variante C_{YRH loop}, Spur 1 + 2 Klon C9 *E. coli* Stamm BL21(DE3), 1- Zellen vor Induktion, 2 - Zellen 4 h nach Induktion, Spur 3 + 4 Klon C9 *E. coli* BL21(DE3) Tuner, 3 - Zellen vor Induktion, 4 - Zellen 4 h nach Induktion, Spur 5 + 6 Klon C11 *E. coli* Stamm BL21(DE3), 5- Zellen vor Induktion, 6 - Zellen 4 h nach Induktion, Spur 7 + 8 Klon C11 *E. coli* BL21(DE3) Tuner, 7 - Zellen vor Induktion, 8 - Zellen 4 h nach Induktion M – Marker.

Die Variante C_{YRH loop} zeigte in den Testexpressionen nur in zwei der verwendeten *E. coli* Stämmen eine Expression. So konnten für die Klone C9 und C11 in der SDS-PAGE nach Expression in den Stämmen BL21(DE3) und BL21(DE3) Tuner eine Bande auf der erwarteten Höhe (8 kDa) gefunden werden (siehe Abb. 2-24b). Die Testexpression erfolgte bei 37 °C, einer IPTG-Konzentration von 100 µM über 4 h. Bei Analyse der Expression auf ihren löslichen und unlöslichen Anteil konnte hingegen eine Bande der entsprechenden Höhe im SDS-Gel nicht wieder festgestellt werden. Dafür kann es verschiedene Gründe geben. Zum einem ist es möglich, dass es sich bei der Bande im Gel (siehe Abb. 2-24b, Spuren 2, 4, 6 und 8) um ein Artefakt der Färbung handelt und die Variante von den Zellen gar nicht exprimiert wurde. Zum anderen ist es möglich, dass die Variante C_{YRH loop} nicht stabil ist und schnell abgebaut wird, da es sich nur um einen kleinen Teil der C-terminalen Domäne handelt. Die Variante ist nur 68 Aminosäuren groß und liegt eventuell nicht gefaltet vor, was einen schnellen Abbau durch Proteasen begünstigt.

2.2.5.3 Reinigung der 4CL1 Varianten YRH_{loop} und N_{YRH loop}

Das Volllängenkonstrukten 4CL1 YRH_{loop} wurden zunächst durch Hochdruckdispersion aufgeschlossen, und der lösliche Überstand wurde mittels Zentrifugation isoliert (siehe 4.2.2.3). Das Proteine wurde über eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie (siehe 4.2.2.6) gereinigt und im Anschluss wurde eine Größenausschlusschromatographie (siehe 4.2.2.7) durchgeführt. Bei der Variante 4CL1 N_{YRH loop} verlief die Reinigung nach dem Zellaufschluss über eine Streptactin Säule (siehe 4.2.2.6).

Für die Reinigung der Volllängenkonstrukte YRH_{loop} wurde das Reinigungsschema der WT Variante leicht optimiert. Wie bei Variante YRHA_{hinge} (Abschnitt 2.2.3.2.), wurde auch die 4CL1 Variante YRH_{loop} mit 20 mM Imidazol im Auftragspuffer A auf die Säule geladen und mit einer Gradientenstufe von 10 % (~43 mM Imidazol) von Verunreinigungen gereinigt. Die Elution der Variante erfolgte ebenso über einen linearen Gradienten über 10 CV auf 100 % Puffer B. Im Unterschied zur Variante YRHA_{hinge} eluierte die Proteinvariante YRH_{loop} schon bei einer Imidazolkonzentration von etwa 60 mM Imidazol. Das Zielprotein zeigte nach der Ni²⁺-Affinitätschromatographie schon eine sehr große Reinheit und in der SDS-PAGE wurde lediglich eine weitere Bande (Abb. 2-25, Spur 3) gefunden werden. Da die Variante für CD- und Fluoreszenzmessungen verwendet werden sollte, wurde eine Größenausschlusschromatographie als zweiter Reinigungsschritt angeschlossen. Die Verunreinigung ließ sich aber auch durch die nachfolgende Größenausschlusschromatographie nicht entfernen (Abb. 2-25, Spur 4). Die Ausbeute für die Variante YRH_{loop} betrug nach der Gelfiltration 24,3 mg Protein/L Expression (Tab. 2-5).

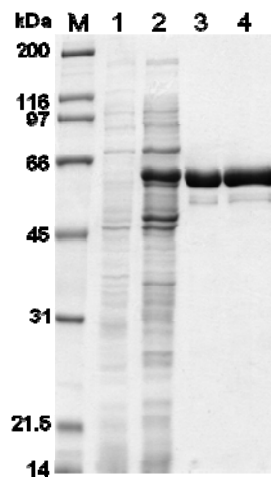


Abb. 2-25: SDS-PAGE der Reinigung der Variante YRH_{loop}.

4CL1 Variante YRH_{loop}, Spur 1 - Zellen nach 16 h Expression, Spur 2 - löslicher Überstand nach Zellaufschluss, Spur 3 - Elutionspeak nach Ni²⁺-Affinitätschromatographie, Spur 4 - Elutionspeak nach Größenausschlusschromatographie, M – Marker.

Wie die Variante N_{YRH hinge} (Abschnitt 2.2.3.1) zeigte auch die Variante N_{YRH loop} nach der Streptactinsäule bereits eine recht hohe Reinheit. In der SDS-PAGE Analyse ist zu sehen, dass sich weder im Durchfluss der Säule (Abb. 2-26a, Spur 2) noch in den Waschfraktionen (Abb. 2-26a, Spur 3-5), sondern nur in der Elutionsfraktion (Abb. 2-26a, Spur 6) das gesuchte Protein befindet. Dies kann einerseits daran liegen, dass die Variante besser an die Säule bindet als die beiden Varianten C_{YRH hinge} und C_{YRHA hinge} und sich nicht auswaschen lässt. Andererseits wird die Proteinvariante N_{YRH loop} wesentlich schlechter exprimiert als die anderen Varianten, weshalb eine Überladung der Säule, und damit verbunden eine schlechtere Bindung an die Säulenmatrix, bei der Verwendung der gleichen Zellmasse unwahrscheinlich ist. Die Variante N_{YRH loop} zeigte nach der Affinitätschromatographie eine Ausbeute von 12,2 mg Protein/L Expression (Tab. 2-5).

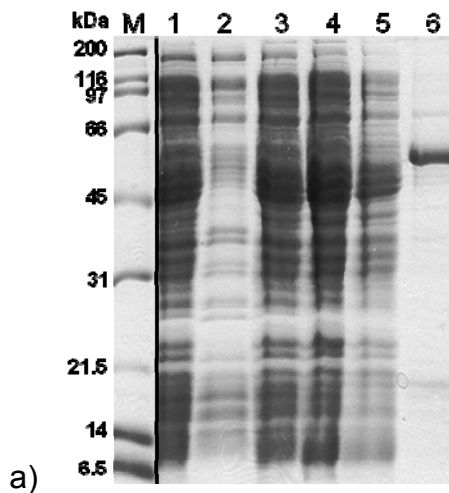


Abb. 2-26: SDS-PAGE der Reinigung der Variante N_{YRH loop}.
a) Strep-tag Reinigung der 4CL1 Variante N_{YRH loop}, Spur 1 - löslicher Überstand nach Zellaufschluss, Spur 2 - Durchflussfraktion, Spur 3-5 - Waschfraktionen, Spur 6 - Elutionsfraktion, M – Marker.

Tab. 2-5: Ausbeute der 4CL1 Varianten YRH_{loop} und N_{YRH loop} nach Reinigung

Variante	Ausbeute nach Affinitätschromatographie [mg/L Expression]	Ausbeute nach Größenausschlusschromatographie [mg/L Expression]
4CL1 YRH _{loop}	27,3	24,3
4CL1 N _{YRH loop}	12,2	-

2.2.6 Aktivitätstest der Varianten 4CL1 YRHA_{hinge} und 4CL1 YRH_{loop}

Für den Aktivitätstest (siehe 4.2.2.12) der 4CL1 Variante YRHA_{hinge} wurden Enzymproben nach der Ni²⁺-Affinitätsreinigung in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 24 µM im Reaktionsansatz eingesetzt. Es konnte für die Variante YRHA_{hinge} jedoch keine Aktivität festgestellt werden.

Die Aktivitätstests der Variante YRH_{loop} wurden mit Enzymproben nach der Größenaustauschchromatographie durchgeführt. Die Konzentration der Variante betrug dabei 4 µM und für die Reaktion mit p-Cumarsäure ($\epsilon = 21 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ließ sich für die Variante eine spezifische Aktivität von $1,11 \cdot 10^{-4} \text{ U/mg}$ ermitteln. Im Vergleich mit den spezifischen Aktivitäten der WT Variante und der Variante YRH_{hinge}, beide ebenfalls nach der Größenausschlusschromatographie gemessen, zeigt sich, dass YRH_{loop} etwa 60 % der Aktivität des Wildtyps und das etwa

Fünffache der Aktivität der Variante YRH_{hinge} besitzt (Tab. 2-6). Das Einfügen der Trypsin-Erkennungssequenz in die *loop*-Region As488-494, hat also geringere Auswirkungen auf die Aktivität der Variante als die Mutation in der *hinge*-Region.

Tab. 2-6: Spezifische Aktivität

Variante	Spezifische Aktivität in U/mg
4CL1 WT	$1,87 \pm 0,15 \cdot 10^{-4}$
4CL1 YRH _{loop}	$1,11 \pm 0,05 \cdot 10^{-4}$
4CL1 YRH _{hinge}	$0,23 \pm 0,01 \cdot 10^{-4}$
4CL1 YRHA	Nicht bestimmbar

2.2.7 Strukturelle Untersuchungen mittels Fluoreszenz- und CD-Messungen

Um einen Eindruck zugewinnen, ob die eingefügten Mutationen in den Varianten YRH_{hinge} und YRH_{loop} eine Auswirkung auf die dreidimensionale Struktur der Proteine haben, wurden sowohl Fluoreszenz- als auch CD-Messungen für beide Varianten durchgeführt (siehe 4.2.2.10 und 4.2.2.11). Die erhaltenen Spektren wurden mit den Spektren des WT von 4CL1 verglichen, welche unter den gleichen Bedingungen gemessen wurden.

Die Fluoreszenzspektren wurden bei einer Proteinkonzentration von 3 μ M und bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm bzw. 280 nm gemessen. Da sowohl bei 295 nm als auch bei 280 nm keine Verschiebung der Emissionsmaxima zu erkennen war, werden hier nur die Spektren bei 295 nm diskutiert (Abb. 2-27a). In den Spektren sind keine hervorstechenden Unterschiede zwischen den drei 4CL1 Varianten festzustellen. Bei den Spektren der Variante YRH_{loop} fällt auf, dass diese eine höhere Intensität zeigen als die der WT und 4CL1 YRH_{hinge}. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Mutation Ser488Tyr sein. Diese liegt laut Strukturvorhersagen in einem dem Medium zugänglichen *loop*-Bereich, womit die Aminosäure Tyrosin exponiert ist und ihre Fluoreszenz nicht durch andere umgebende Aminosäuren gequencht werden kann. Die Variante YRH_{hinge} enthält zwar ebenfalls ein zusätzliches Tyrosin (D436Y) im Vergleich zum WT, aber in der *hinge* Region, welche genau zwischen den beiden Domänen liegt. Das Tyrosin ist

also von vielen Aminosäuren umgeben, welche die Fluoreszenz der Aminosäure beeinflussen könnten.

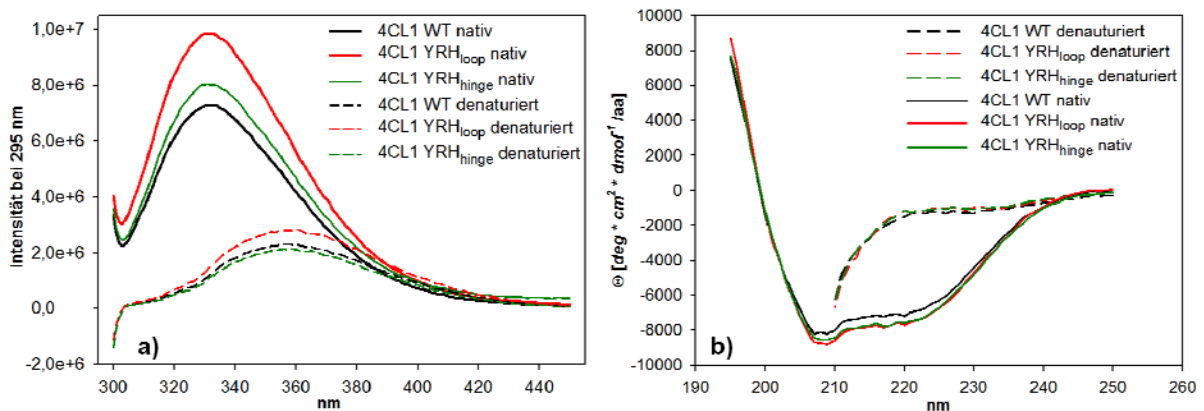


Abb. 2-27: Fluoreszenzspektren und Fern-UV-CD Spektren der 4CL1 Varianten WT, YRH_{hinge} und YRH_{loop} im nativen und denaturierten Zustand (6 M Gua).

a) Fluoreszenzspektren, Anregungswellenlänge 295 nm, Proteinkonzentration: 3 μ M b) Fern-UV-CD Spektren, Proteinkonzentration: 1mg/ml.

Die Proteinkonzentration der Varianten für die CD-Messungen betrug 1 mg/ml. Die CD-Spektren zeigen keine dominanten Unterschiede zwischen den einzelnen 4CL1 Varianten (Abb. 2-27b). Daraus lässt sich schließen, dass das Einfügen der Mutationen keine schwerwiegenden Änderungen in der Struktur der Varianten YRH_{hinge} und YRH_{loop} verursacht hat.

2.2.8 Abschließende Diskussion

Obwohl bisherige Versuche zur Protease vermittelten Proteinligation nicht erfolgreich verliefen, kann man aus diesen Versuchsergebnissen wichtige Hinweise für die Planung weiterer Experimente ziehen. Die Idee, die Trypsin-Erkennungsstelle in die *hinge*-Region des Proteins einzufügen, stellte sich im Fall der *G. max* 4CL1 als nicht sehr günstig heraus. Es traten Probleme bei der Expression der Variante N_{YRH hinge} auf und für diese Variante ließen sich auch nur schlechte Ausbeuten bei der Umsetzung mit Fluoreszenzmarkern erzielen. Zudem zeigte sich, dass die Aktivität des Vollängenkonstruktes YRH_{hinge} durch das Einfügen der Mutationen um etwa 88% im Vergleich zum WT abnahm. Die Variante YRHA_{hinge} zeigte schließlich überhaupt keine Aktivität mehr, was dem ursprünglichen Ziel der strukturellen Aufklärung des Enzymmechanismus abträglich ist. Weitere Arbeiten zur Protease

vermittelten Proteinligation sollten sich also auf die Varianten konzentrieren, welche die Erkennungssequenz in einem dem Lösungsmittel exponierten *loop* tragen. Das Vollängenkonstrukt YRH_{loop} zeigt eine im Vergleich zum WT etwas geringere Aktivität von etwa 60%, jedoch ist diese fünffach höher als die der YRH_{hinge} Variante. Zudem ist anzunehmen, dass es keine sterische Behinderung der Trypsin-Variante geben wird, da die der Erkennungssequenz nachfolgende Aminosäure ein Serin (S491) und damit eine kleine Aminosäure ist. Eine Fusion der Variante C_{YRH loop} mit dem SUMO Protein könnte bei den bei der Expression auftretenden Problemen eventuell helfen. Das SUMO Protein ist ein etwa 100 Aminosäuren großes Protein, welches an der Regulation zellulärer Prozesse in Eukaryonten beteiligt ist [Müller *et al.*, 2001]. Das Protein faltet schnell in seine native Form und kann dadurch Fusionsproteine als eine Art Chaperon vor dem Abbau durch Proteasen schützen [Butt *et al.*, 2005]. Sollte sich also die Variante C_{YRH loop} exprimieren und reinigen lassen, sind wahrscheinlich alle Voraussetzungen für eine erfolgreiche Religation der beiden Varianten N_{YRH loop} und C_{YRH loop} miteinander geschaffen.

Nach Beendigung der praktischen Arbeiten wurde die Kristallstruktur einer verwandten 4CL1 aus *Populus tomentosa* veröffentlicht [Hu *et al.*, 2010]. Die 4CL1 aus *Populus tomentosa* (*P. tom* 4CL1) besitzt 536 Aminosäuren (Abb. 2-28) und zeigt gegenüber der Proteinsequenz von Sojabohnen 4CL1 (*G. max* 4CL1, 546 As) eine Sequenzidentität von 68 %. Die Proteinsequenz von *G. max* 4CL1 ist um 10 Aminosäuren länger als die der *P. tom* 4CL1, was vor allem an zwei Stellen in der Sequenz zeigt. So besitzt die *G. max* 4CL1 einige zusätzliche Aminosäuren in der N-terminalen Domäne und vier zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus. Wie im Sequenzvergleich zu sehen ist, ist die Aminosäuresequenz DRL in der *hinge* Region bei beiden Enzymen konserviert (Abb. 2-28, rote Markierung), während die Aminosäuren SNG der *G. max* 4CL1 in *Populus tomentosa* der Sequenz SEK entsprechen (Abb. 2-28, blaue Markierung). Durch die unterschiedliche Anzahl von Aminosäuren entspricht die Sequenz 436DRL438 aus *G. max* 4CL1 der Sequenz 431DRL433 und die Sequenz 488SNG490 entspricht den Aminosäuren 483SEK485 in *Populus tomentosa*.

4CL1_populus	MNPQ-EEFIFRSKLPDIYIPKLNPLHSYVLENLSNHSSKPCLINGANGDVYTYADVELTA	59
4CL1_soybean	MAPSPQEIIFRSPLDIPPIPHLPLYSYCFQNLSQLFHDRPCLIDGDTGETLTYADVDLAA	60
	* * :*:**** ** * :***:* :*:***: :****:* * : *****:* *	
4CL1_populus	RRVASGLNKIGIQGDVIMLFLPSSPEFVLAFLGASHRGAIITAANPFSTPAELAKHAKA	119
4CL1_soybean	RRIASGLHKIGIRQGDVIMLVLRNCPQFALAFLGATHRGAVVTTANPFYTPAELAKQATA	120
	:***:****:***** * *:* *****:****:;*:***** *****:* *	
4CL1_populus	SRAKLLITQACYEYKVKDFARES-DVKVMCVDS----APDGCLHFSELTQADENEAPQVD	174
4CL1_soybean	TKTRLVITQSAIVEKIKSFADSSSDVMVMCIDDDFSYENDGVLHFSTLSNADETEAPAVK	180
	:*:*:***: * **:* ** * ** **:* * ** **** *:*:*** ** *	
4CL1_populus	ISPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLITSVAQQVDGDNPNLYFHSEDVILCVLPMFH	234
4CL1_soybean	INPDELVALPFSSGTSGLPKGVMLSHKNLVTTIAQLVDGENPHQYTHSEDVLLCVLPMFH	240
	* **:*:****:****:*****:* ** *:*:* ** **:* * *****:*****	
4CL1_populus	IYALNSIMLCGLRVGAPILIMPKFEIGSLLGLIEKYKVSIAPVVPPVMMMSIAKSPDLDKH	294
4CL1_soybean	IYALNSIILCGIRSGAAVLILQKFEITTLLELIEKYKVTVASFVPPIVLALVKSGETHRY	300
	*****:***:* ** **:*: **** * ** *****:* * **::: ** : :	
4CL1_populus	DLSSLRMIKSGGAPLGKELEDTVRAKFPQARLGQGYGMTEAGPVLAMCLAFAKEPFDIKP	354
4CL1_soybean	DLSSIRAVVTGAAPLGGELOEAVKARLPHATFGQGYGMTEAGP-LAISMAFAKVPSKIKP	359
	****:* : * ** ** **::*:*:*: * :***** ** : **** * **	
4CL1_populus	GACGTVVRNAEMKIVDPETGASLPRNQPGEICIRGDQIMKGYLNDPEATSRTIDKEGWLH	414
4CL1_soybean	GACGTVVRNAEMKIVDTETGDSLPRNKHGEICIRGTVKVMKGYLNDPEATERTVDKEGWLH	419
	*****:***** ** *****: ***** :***** **:******	
4CL1_populus	TGDIGYIDDDDELFIVDRLKELIKYKGFQVAPAELEALLIAHPEISDAAVVGLKDEDAGE	474
4CL1_soybean	TGDIGFIDDDDELFIVDRLKELIKYKGFQVAPAELEALLIAHPNISDAAVVGMKDEAAGE	479
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*** **	
4CL1_populus	VPVAFVVRSEKIQATEDEIKQYISKQVIFYKRIKRVFFIEAIPKAPSGKILRKNLKEKL-	533
4CL1_soybean	IPVAFVVRSEKQAEDEIKKYISQQVVFYKRICRVFFTDVIPKAPSGKILRKNLKEKL-	539
	:*****:* * : *****:***:*:***** ** * :***** ** * ;*	
4CL1_populus	AGI----	536
4CL1_soybean	EGLVVAN	546
	*:	

Abb. 2-28: Alignment der Proteinsequenzen der 4CL1 von *Populus tomentosa* und Sojabohne. Die Proteinsequenzen der 4CL1 WT Varianten von *Populus tomentosa* und Sojabohne (*Glycine max*) wurden mit Hilfe des Programmes ClustalW [Thompson *et al.*, 1994; Larkin *et al.*, 2007] verglichen. Die Positionen der Mutationen der Varianten YRH_{hinge} (rot) und YRH_{loop} (blau) sind markiert. Ein Strich (-) symbolisiert eingefügte Lücken, ein * (Stern) identische Aminosäuren und ein : (Doppelpunkt) ähnliche Aminosäuren.

Die Struktur weist wie erwartet eine Unterteilung in zwei Domänen auf, wobei die N-terminale Domäne in *Populus tomentosa* bis zur Aminosäure 435 reicht und die Aminosäuren 436 bis 536 die C-terminale Domäne ausmachen (Abb. 2-29).

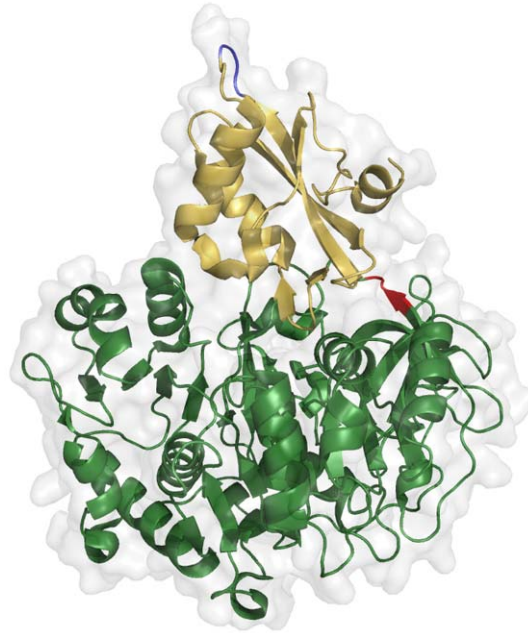


Abb. 2-29: Gesamtstruktur der 4CL1 von *Populus tomentosa*.

Darstellung der Struktur des 4CL1 Enzyms aus *Populus tomentosa*, pdb code: 3a9v [Hu *et al.*, 2010]. *P. tom* 4CL1 wird in der Cartoondarstellung gezeigt. Die N-terminale Domäne ist in grün, die C-terminale Domäne in gelb dargestellt. Zusätzlich sind die Mutationsregionen markiert, die *hinge* Region in rot und die *loop* Region in blau.

Von der *P. tom* 4CL1 konnte neben einer Apo-Struktur auch eine Struktur mit gebundenem AMP gelöst werden. Damit konnten Aminosäurereste identifiziert werden, die an der AMP-Bindung beteiligt sind. Das Adenin des AMP wird demzufolge von den Aminosäuren G306, S307, G329 und Y330 durch eine Kombination aus van – der – Waals - Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen koordiniert (Abb. 2-30a). Die Aminosäuren T333 und Q443 stabilisieren die Phosphatgruppe und die Aminosäurereste R432, K434 und K438 gehen Wasserstoffbrücken mit den Sauerstoffatomen der Ribose ein [Hu *et al.*, 2010].

In der Variante YRH_{hinge} sind die Aminosäuren DRL zur YRH mutiert (Abb. 2-30b), und obwohl das wichtige Arginin432 noch vorhanden ist, zeigt die Variante eine wesentlich schlechtere Aktivität als der WT. Eventuell führen die recht großen Aminosäuren Tyrosin und Histidin zu strukturellen Änderungen in der Nähe des katalytischen Zentrums. Die nicht mehr vorhandene Aktivität der Variante YRHA_{hinge} lässt sich nun ebenfalls erklären. Durch die Mutation des an der AMP Bindung beteiligten Lysins zu Alanin kann die Wasserstoffbrücke zwischen K434 und der O3' Gruppe des AMPs nicht mehr ausgebildet werden. In Kombination mit den schon für die Variante YRH_{hinge} auftretenden Problemen, hat dies anscheinend den vollständigen Verlust der Aktivität zur Folge.

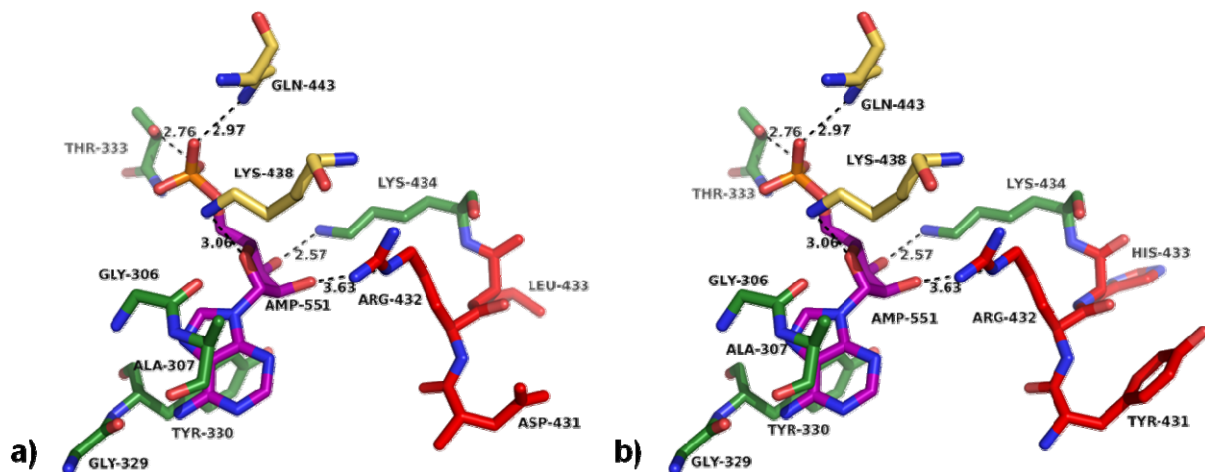


Abb. 2-30: AMP-Bindestelle der 4CL1 aus *Populus tomentosa*.

Dargestellt sind die an der AMP Bindung beteiligten Aminosäuren, sowie die Aminosäuren D431 und L433 von *P. tom* 4CL1, pdb code: 3a9v [Hu *et al.*, 2010]. Die C-Atome der Aminosäuren aus der N-terminalen Domäne sind dunkelgrün gefärbt, die aus der C-terminalen Domäne gelb und die der Aminosäuren 431-433 rot gefärbt. Die C-Atome des Substratintermediats AMP sind violett. Die Atome N, O, S und P sind in der Abbildung in blau, rot, gelb und orange dargestellt. a) Aminosäuresequenz von *P. tom* 4CL1, b) Modell der Erkennungssequenz Tyr-Arg-His in der *hinge* Region von *P. tom* 4CL1 erstellt mit Pymol [Delano *et al.*, 2005].

Ein Vergleich den Proteinsequenzen verwandter 4CLs mit der Sequenz von *G. max.* 4CL1 (Abb. 2-31) zeigt zudem, dass die *hinge* Region in allen untersuchten 4CLs fast vollständig konserviert ist. Alle 4CLs haben an der Position 439 von *G. max.* 4CL1 ebenfalls ein Lysin, was die Vermutung bestätigt, dass das Lysin an der Koordination des AMPs während der Enzymreaktion beteiligt ist.

Außerdem wurde die Sequenz von *G. max.* 4CL1 mit den Sequenzen von Mitgliedern der Klasse I der adenylate-bildenden Enzymfamilie, deren Kristallstruktur bereits bekannt ist, verglichen (Abb. 2-32). Dabei fiel auf, dass das Lysin 439 von *G. max.* 4CL1 nicht bei allen Mitgliedern konserviert ist. So besitzen die 4CLs und die Luciferasen das Lysin an dieser Position, ebenso wie einige Acyl-Coenzym A Ligasen und auch einige NRPS (DhbE, EntE). Andere Enzyme wie z.B. die 4-Chlorobenzoyl Coenzyme A ligase (CBAL) und die NRPS DltA und PheA haben an dieser Position ein Aspartat. Das in der *hinge* Region gelegene Arginin 437 von *G. max.* 4CL1 ist jedoch bei allen untersuchten Enzymen konserviert.

4CL1_soybn	VMKGYLNDPEATERTVDKEGWLHTGDIGFIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	456		
4CL2_rubid	IMKGYLNDPEATENTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	456		
4CL1_leule	VMKGYLNDPEATKTTIDEEGWLHTGDIGHVDDDDDEV	FVDRLKEIIKYKGFQVAPAELEA	454		
4CL2_sorau	IMKGYLNDPEATERTVDKQGWLHTGDIGYIDGDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	459		
4CL5_popto	IMKGYLNDPEATERTIDNDGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	456		
4CL1_poptr	IMKGYLNDPEATERTVDNDGWLHTGDIGYIDGDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	456		
4CL1_pophy	IMKGYLNDPEATERTVDNDGWLHTGDIGYIDGDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	456		
CoAL_ricco	IMKGYLNDPEATERTIDKEGWLHTGDVGYIDGDDDELFI	VDRLKELIKYNGFQVAPAELEA	469		
4CL2_pophy	IMKGYLNDPEATERTIDKDGWLHTGDIGYIDE-DELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	455		
4CL1_corca	IMKGYLNDPEATARTIDKDGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	458		
4CL4_popto	IMKGYLNDPEATERTIDKDGWLHTGDIGYIDE-DELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELES	455		
4CL1_cinos	IMKGYLNDPEATKMTIDKEGWLHTGDIGFVDDDDDEI	FVDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	451		
4CL1_eucca	IMKGYLNDPEATANTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	456		
4CL3_poptr	IMKGYLNDPEATSRTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	455		
4CL_popde	IMKGYLNDPEATSRTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	450		
4CL_eucgl	IMKGYLNDPEATANTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	456		
4CL_popto	IMKGYLNDPEATSRTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	451		
4CL3_popni	IMKGYLNDPEATSRTIDKQGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	455		
4CL_hibca	IMKGYLNDPEATKRTIDKEGWLHTGDIGYIDEDNELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	452		
4CL_poptrm	IMKGYLNDPEATSRTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPTELEA	450		
4CL2_tobac	IMKGYLNDPEATARTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	454		
4CL_vanpl	IMKGYLNDPEATARTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	463		
4CL_paufo	IMKGYLNDLESTEGTIDKDGWLHTGDIGFIDTDELFI	VDRLKEIIKYKGFQVAPAELEA	455		
4CL1_tobac	IMKGYLNDPEATTRTIDKEGWLHTGDIGFIDEDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAEIEA	459		
4CL_amofr	IMKGYLNDQEATQRTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	451		
4CL2_soltu	IMKGYLNDPEATARTIEKEGWLHTGDIGFIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	457		
4CL3_popto	IMKGYLNDPEATSRTIDNDGWLHTGDIGFIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	455		
4CL2_poptr	IMKGYLNDPEATSRTIDNDGWLHTGDIGFIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	455		
4CL_gynbi	IMKGYLNDPESTKNTIDADGWLHTGDIGLIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	454		
4CL_pethy	IMKGYLNDPAATTRTIDKEGWLHTGDIGYIDNDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	456		
4CL1_soltu	IMKGYLNDPEATARTIEKEGWLHTGDIGFIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	457		
4CL1_peter	IMKGYLNDPESTRTTIDEEGWLHTGDIGFIDDDDELFI	VDRLKEIIKYKGFQVAPAELEA	455		
4CL_soltu	IMKGYLNDPEATARTIEEGWLHTGDIGFIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	457		
4CL2_capan	IMKGYLNDLESTTRTIDKEGWLHTGDMGFIDNDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	454		
4CL2_rutgr	IMKGYLNDPEATNRTIDKDGWLHTGDVGYIDDDEELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	469		
4CL_tobac	IMKGYLNDPEATARTIDKEGWLYTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	454		
4CL2_salmi	IMKGYLNDPESTKNTIDEDGWLHTGDIGFIDADDELFI	VDRLKEIIKYKGFQVAPAEIEA	454		
4CL2_peter	IMKGYLNDPESTRTTIDEEGWLHTGDIGFIDDDDELFI	VDRLKEIIKYKGFQVAPAELEA	455		
4CL1_araly	IMKGYLNNPAATAETIDKDGWLHTGDIGLIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	471		
4CL_betlu	IMKGYINDPEATASTIDKEGWLHTGDIGLIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	454		
4CL_betpl	IMKGYINDPEATASTIDKEGWLHTGDIGLIDNDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	454		
4CL1_arath	IMKGYLNNPAATAETIDKDGWLHTGDIGLIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	475		
4CL1_melof	IMKGYLNDLESTKRTIDHDGWLHTGDIGFIDADDELFI	VDRLKEIIKYKGFQVAPAEIEA	454		
4CL2_arath	IMKGYLNDPLATASTIDKDGWLHTGDVGFIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELES	468		
4CL_galor	IMKGYLNDPEEATERTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	461		
4CL2_scuba	IMKGYLNDPESTARTIDKEGWLHTGDIGFIDDDDELFI	VDRLKEIIKYKGFQVAPAEIEA	458		
4CL1_scuba	IMKGYLNDPESTARTIAKEGWLHTGDIGFIDDDDELFI	VDRLKEIIKYKGFQVAPAEIEA	458		
4CL1_pinma	IMKGYINDPESTAATIDEEGWLHTGDVGYIDDDEEII	FIVDRVKEIIKYKGFQVAPAELEA	454		
4CL_pinta	IMKGYINDPESTAATIDEEGWLHTGDVEYIDDDEEII	FIVDRVKEIIKYKGFQVAPAELEA	454		
4CL_pinra	IMKGYINDPESTAATIDEEGWLHTGDVGYIDDDEEII	FIVDRVKEIIKYKGFQVAPAELEA	454		
	:****:*:	:* *:	:***:***:	:*	:**:*:**:*:**:*:**:*:**:*:**:

Abb. 2-31: Ausschnitt aus dem Sequenzalignment von sequentiell verwandten 4CLs.

Die Proteinsequenzen wurden mit Hilfe des Programmes ClustalO [Sievers *et al.*, 2011] verglichen. Die Position der Aminosäuren der *hinge* Region von 4CL1 *G. max.* Asp436, Arg437 und Leu438 sind in grün markiert, die Position des Arg439 in hellblau. Ein * (Stern) bedeutet eine vollständig konservierte Aminosäure, ein : (Doppelpunkt) zeigt die starke Konservierung von Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften an und ein . (Punkt) stellt die schwache Konservierung von ähnlichen Aminosäuren dar. Striche (-) bedeuten Lücken, die zu einem besseren Sequenzalignment führen. Für das vollständige Alignment inklusive der Erklärung der Abkürzungen der verwendeten Enzyme siehe Anhang Abb. A-1.

4CL1_soybn	--VDKEGWLHTGDIGFIDDDDELFIVDRL--KELIKYKGFQVAPAELEALLIAHPNISDA	467
4CL1_popto	--IDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFIVDRL--KELIKYKGFQVAPAELEALLIAHPNISDA	462
Luci_luccr	--IDEEGWLHTGDIGYIDDEEKHFFIVDRL--KSLIKYKGYQVPPAELESVLLQHPISFDA	469
Luci_phopy	--IDKDGWLHSGDIAYWDEDEHFFIVDRL--KSLIKYKGYQVAPAELESILLQHPNIFDA	467
Luci_lamtu	--IDKDGWLHSGDIAYYDKDGHFFIVDRL--KSLIKYKGYQVPPAELESILLQHPFIFDA	467
LCFACS_arefu	--EKGRKFFRTGDVGFIDEEGFLHFQDRV--KEVIKYGTYIAPFELEALLMKHEAVMDV	465
FACS_myctu	--F-DNGWFRTGDIGEIDDEGYLYIKDRL--KDMII SGGENVYPAEIESVIIIGVFGVSEV	427
MaCoA_rhopa	--FRDDGFFITGDLGKIDERGYVHILGRG--KDLVITGGFNVYPKEIESEIDAMPGVVES	427
LCFACS_rhopa	--F-RNGWHHTGDMGRFDADGYLFYAGRAPEKELIKTGGENVYPAEVEGALKQHPAIADA	429
LCFACS_theth	--LTPDGGFFRTGDIADVDEEGYVEIKDRL--KDLIKSGGEWISSVDLENALMGHPKVEA	463
DhbE_bacsu	--FTEDGPFYRTGDIVRLTRDGYIVVEGRA--KDQINRGGEKVAAEEVENHLLAHPAVHDA	458
EntE_ecoli	--FDANGFYCSGDLISIDPEGYITVQGRE--KDQINRGGEKIAAEEIENLLLRHPAVIYA	460
BeCoA_burxe	--F-LGEWIRSGDKYCRLENGCYVYAGRS--DDMLKVSQQYVSPVEVEMVLVQHDVAVLEA	457
MenE_staa	--F-ENGYFNTGDIAEIDHEGYVMIYDR--KDLII SGGENIYPYQIETVAKQFPFGISDA	424
AMPbp_metac	--W-HDGYHTGDMAMWDEDGYLWFVGRG--DDI IKTSGYKVGPFVEVESALIQHPAVLEC	483
ACS_salty	----FKNMYFSGDGARDEDGYIWTGRV--DDVNVSGHRLGTAETIESALVAHPKIAEA	545
FACS_strco	--FTEDGFFRTGDMAVRDFDGYVRIVGRK--ATDLIKSGGYKIGAGETIENALLEHPEVREA	414
CBAL_alcsp	--L-QDGWYRTSDVAVWTFEGTVRILGRV--DDMII SGGENIHPSEIERTVLGTAPGVAEV	427
ACS_yeast	----YPGYYFTGDGAAKDKDGYIWIILGRV--DDVNVSGHRLSTAETIEAATIEDPVAEC	604
DltA_bacce	--IDGERAYKTGDAGYV-ENGLLFYNGRL--DFQIKLHGYRMELEEIEHHLRACSYVEGA	427
DltA_strp1	--FKGQPAYHTGDIGSLTEDNILLYGGRL--DFQIKYAGYRIELEDVVSQQLNQSPMVASA	430
DltA_strp6	--FKGQPAYHTGDIGSLTEDNILLYGGRL--DFQIKYAGYRIELEDVVSQQLNQSPMVASA	430
PheA_anemi	PFVPGKLYKTGDQARWLSGDNIEYLGRI--DNQVKIRGHRVELEEVESTILLKHYISET	458
DltA_bacsu	--HEGQWAYRTGDAGFI-QDGGQIFCQGRV--DFQIKLHGYRMELEEIEFHVRQSQYVRSR	426
	:. * . * : * : :. :	

Abb. 2-32: Ausschnitt aus dem Sequenzalignment verwandter adeylat-bildender Enzyme mit bekannter Struktur.

Die Proteinsequenzen wurden mit Hilfe des Programmes ClustalO [Sievers *et al.*, 2011] verglichen. Das konservierte Arginin in der *hinge* Region, 4CL1 *G. max*. Asp436 ist in grün markiert, die Position des Arg439 in hellblau. Ein * (Stern) bedeutet eine vollständig konservierte Aminosäure, ein : (Doppelpunkt) zeigt die starke Konservierung von Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften an und ein . (Punkt) stellt die schwache Konservierung von ähnlichen Aminosäuren dar. Striche (-) bedeuten Lücken, die zu einem besseren Sequenzalignment führen. Für das vollständige Alignment inklusive der Erklärung der Abkürzungen der verwendeten Enzyme siehe Anhang Abb. A-2.

Anhand der Struktur ist auch zu erkennen, dass sich die Position der Trypsin-Erkennungssequenz der *G. max* 4CL1 Variante YRH_{loop} tatsächlich in einem *loop* befindet (Abb. 2-29 und 2-33a). Die Aminosäuren Ser483, Glu484 und Lys485 der *P. tom* Struktur sind, wie zuvor angenommen, dem Medium zugewendet und gut erreichbar (Abb. 2-33a). Für die Varianten *G. max* 4CL1 N_{YRH loop} und C_{YRH loop} sollten sich demzufolge keine Probleme bezüglich der Erreichbarkeit der Trypsin-Erkennungssequenz ergeben (Abb.2-33b).

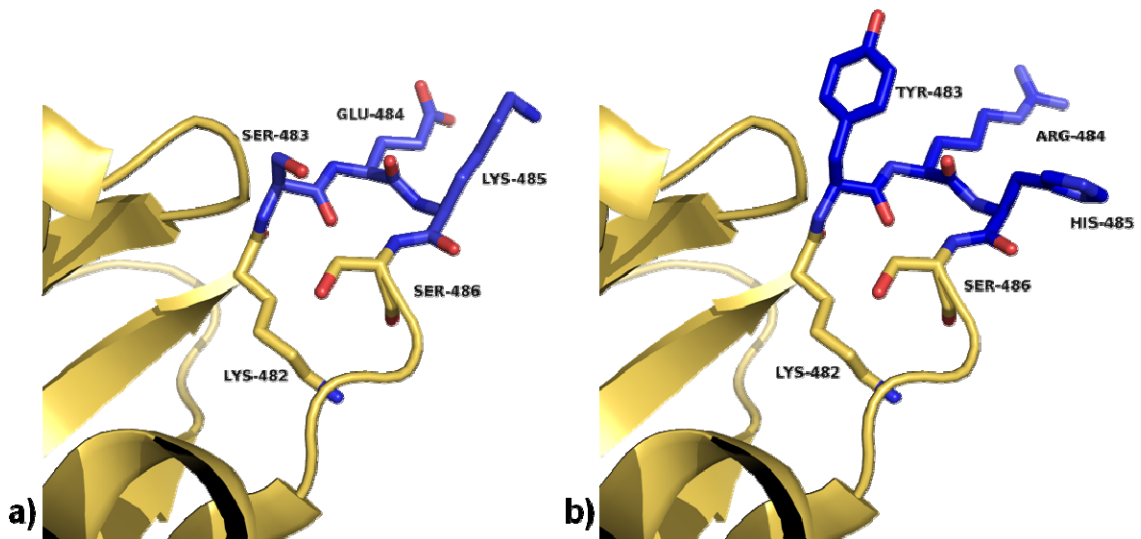


Abb. 2-33: Aminosäuren 480-492 der *P. tom* 4CL1 Struktur

Darstellung der Struktur des 4CL1 Enzyms aus *Populus tomentosa*, pdb code: 3a9v[Hu *et al.*, 2010]. *Populus* 4CL1 wird gelb in der Cartoondarstellung angezeigt. Zusätzlich sind die Aminosäuren 482-486 in Stickdarstellung dargestellt. Die Aminosäuren 483 – 485 sind blau gefärbt. Die Stickstoff- und Sauerstoffatome sind in der Abbildung in blau und rot dargestellt. a) Aminosäuresequenz 483SEK485 von *P. tom* 4CL1, b) Modell der Erkennungssequenz Tyr-Arg-His in der *loop* Region von *P. tom* 4CL1 erstellt mit Pymol [Delano *et al.*, 2005].

3 Aminotransferase LivB

3.1 Einleitung

3.1.1 Aminoglykosid-Antibiotika (AGA)

Aminoglykosid-Antibiotika (AGA), welche vor allem von Vertretern der Bakterien der Ordnung *Actinomycetales* produziert werden, gehören zur Gruppe der Oligosaccharid-Antibiotika. Die meisten bisher entdeckten Aminoglykosid-Antibiotika wurden in den Gattungen *Streptomyces* und *Micromonospora* gefunden. Aminoglykosid-Antibiotika wirken sowohl gegen gramnegative Bakterien wie *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.* und *Pseudomonas spp.*, als auch gegen einige grampositive Bakterien, wie z.B. *Staphylococcus aureus* [Vakulenko *et al.*, 2003].

Die Gruppe um Selman Waksman entdeckte 1943 das erste Aminoglykosid-Antibiotikum Streptomycin im Stamm *Streptomyces griseus* [Schatz *et al.*, 1944b]. Streptomycin war damit nicht nur das erste aus Bakterien isolierte Antibiotikum, sondern zudem auch das erste Antibiotikum, welches eine Wirkung gegen *Mycobacterium tuberculosis*, den Erreger der Tuberkulose, zeigte [Schatz *et al.*, 1944a]. Der Entdeckung von Streptomycin folgte die Erforschung weiterer Aminoglykosid-Antibiotika wie z.B. Neomycin [Waksman *et al.*, 1949], Kanamycin B [Umezawa *et al.*, 1957], Gentamycin [Black *et al.*, 1963], Tobramycin [Higgins *et al.*, 1967] oder Lividomycin [Oda *et al.*, 1971] und die Entwicklung halbsynthetischer Aminoglykosid-Antibiotika wie z.B. das Kanamycin-Derivat Arbekacin [Kondo *et al.*, 1973a; Kondo *et al.*, 1973b] oder das Gentamycin-Derivat Isepamicin [Neu *et al.*, 1978]. Da diese Antibiotika geringere Nebenwirkungen und auch eine bessere Wirksamkeit zeigen, wurde Streptomycin nur noch selten verwendet [Vakulenko *et al.*, 2003]. Heute wird es vor allem in einer Kombinationschemotherapie gegen arzneimittelresistente Tuberkulosestämmen eingesetzt [Musser, 1995; Gillespie, 2002].

3.1.1.1 Aufbau und Klassifizierung von Aminoglykosid-Antibiotika

Aminoglykosid-Antibiotika bestehen aus einem Zuckeranteil (Glycon) und einem Nichtzuckeranteil (Aglycon). Die Antibiotika lassen sich anhand ihres Aglycons in verschiedene Klassen unterscheiden [Piepersberg *et al.*, 2007]. Die meisten Antibiotika gehören entweder zur Klasse der Streptomycin verwandten Aminoglykosid-Antibiotika oder der auf Paromamin basierenden Aminoglykosid-Antibiotika.

Bei den Streptomycin verwandten Aminoglykosid-Antibiotika ist das Aglycon vollsubstituiert, d.h. jeder Kohlenstoff besitzt eine Hydroxygruppe oder einen anderen Substituenten. Zu dieser Gruppe zählen die Streptomycine (STRs) (Abb. 3-1), die Spectinomycine (SPCs) und die Kasugamycine (KASs). Den Mitgliedern dieser Klasse ist das Aglycon Streptamin gemein.

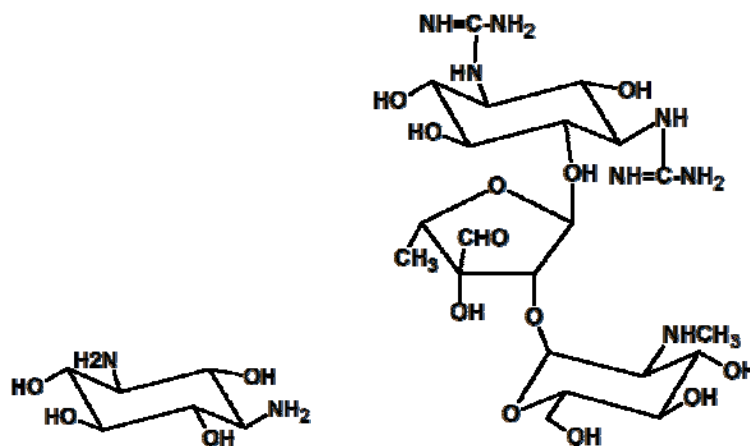


Abb. 3-1: Chemische Struktur von Streptamin (links) und Streptomycin (rechts).

Die Klasse der auf Paromamin basierenden Aminoglykosid-Antibiotika besitzt ein Aglycon, welches nicht vollständig substituiert ist. Dieses Aglycon ist 2-Deoxystreptamin (2-DOS), und alle Antibiotika dieser Klasse haben zudem das Intermediat Paromamin während der Synthese gemein (siehe Abb. 3-2). Die Klasse lässt sich anhand der Positionen der Zuckerringe in zwei Untergruppen unterteilen, zum einem die 4,5-disubstituierte und die 4,6-disubstituierte 2-DOS-Subgruppe (Abb. 3-3). Zu den 4,5-disubstituierten AGAs gehören die Neomycine (NEOs, z.B. Neomycin (NEO), Paromomycin (PAR), Lividomycin (LIV)), Ribostamycin (RIB) und Butirosine (BTRs) und zu den 4,6-disubstituierten AGAs zählen Gentamycin (GEN), die Kanamycine (KANs) und Tobramycin (TOB).

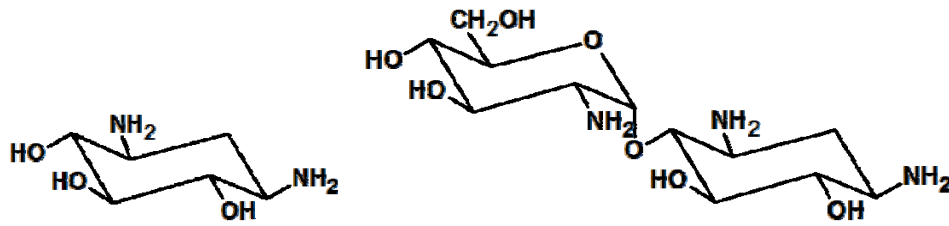


Abb. 3-2: Chemische Struktur von 2-Deoxystreptamin (2-DOS, links) und Paromamin (rechts).

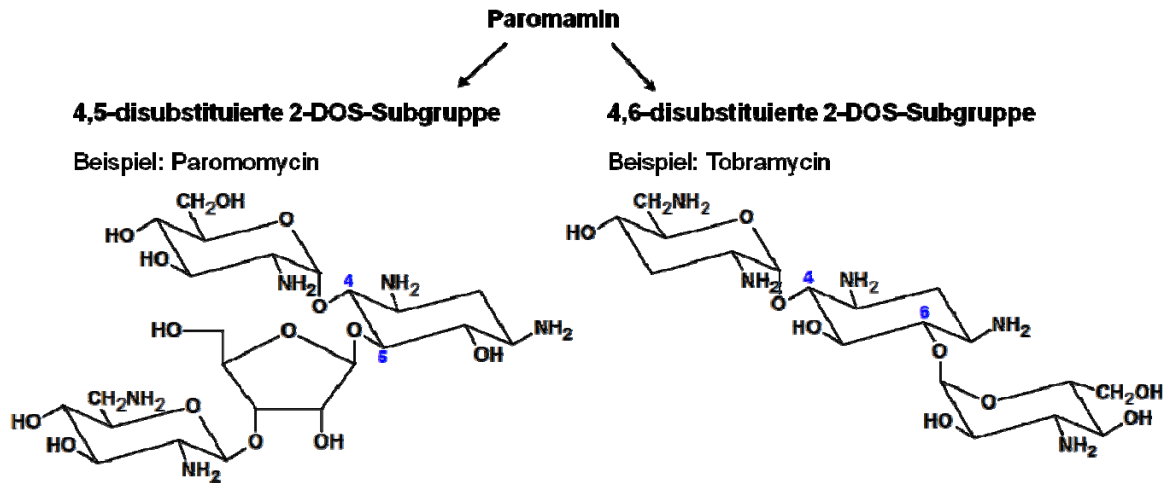


Abb. 3-3: Antibiotika der 2-DOS Klasse.

Außer diesen beiden Klassen gibt es noch weitere Klassen von Aminoglykosid-Antibiotika, wie die monosubstituierten 2-DOS AGAs (z.B. Apramycin, Hygromycin B) oder die Klasse der Fortimicinverwandten Pseudodisaccharide (z.B. Fortimicin, Istamycin).

Die Synthese der Antibiotika verläuft in Bakterien über Enzymgruppen, welche in Genclustern organisiert sind [Piepersberg *et al.*, 2007]. Das Ausgangssubstrat ist D-Glukose-6-Phosphat, welches zunächst zyklisiert wird und dann in mehreren Schritten zu einem Aglycon, z.B. Streptamin oder 2-Deoxystreptamin (2-DOS) umgewandelt wird. Anschließend erfolgt eine Glykosylierung, bei der eine Zuckereinheit auf das Aglycon übertragen wird. Durch weitere Modifizierungen und zusätzliche Glykosylierungen entsteht schließlich das entsprechende Endprodukt des Genclusters (Abb. 3-4).

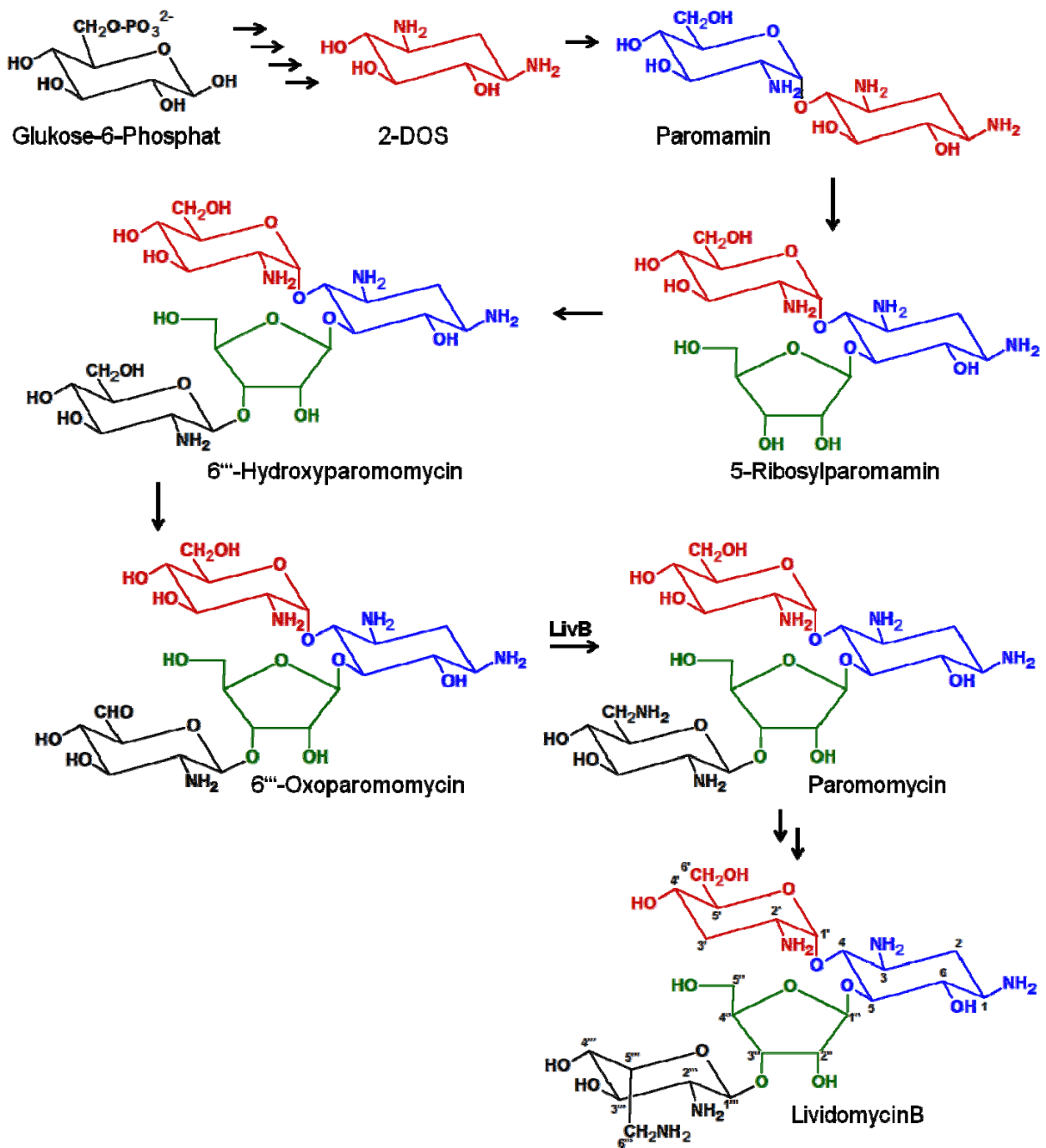


Abb. 3-4: Biosynthese von Aminoglykosid-Antibiotika am Beispiel von Lividomycin B.

Das Aglycon 2-Deoxystreptamin (2-DOS) ist in blau dargestellt, der erste Zuckerring in rot, der zweite in grün und der dritte in schwarz eingefärbt. Abbildung modifiziert nach Piepersberg *et al.*, 2007 [Piepersberg *et al.*, 2007].

3.1.1.2 Wirkungsweise von Aminoglykosid-Antibiotika und zunehmende Resistenz von Bakterien

Die Wirkungsweise von Aminoglykosid-Antibiotika beruht auf ihrer Bindung an die 30S Untereinheit des bakteriellen 70S Ribosoms [Moazed *et al.*, 1987] und der damit verursachten höheren Fehlerrate bei der Synthese von Proteinen [Magnet *et al.*, 2005; Pape *et al.*, 2000].

Im 70S Ribosom gibt es drei Bindestellen für t-RNAs: die A- (Aminoacyl), P- (Peptidyl-) und E- (Exit-) Bindestelle [Green *et al.*, 1997]. Die AGAs interagieren speziell mit der 16S-rRNA des Ribosoms, welche wichtig für die A-Bindestelle ist. Der genaue Bindungsmechanismus von Aminoglykosid-Antibiotika konnte durch zahlreiche NMR- und Röntgenkristallstrukturen aufgeklärt werden [Ban *et al.*, 2000; Ogle *et al.*, 2005; Vicens *et al.*, 2001; Brodersen *et al.*, 2000; Carter *et al.*, 2000; Lynch *et al.*, 2003; Wimberly *et al.*, 2000; Harms *et al.*, 2001; Schluezen *et al.*, 2000; Kondo *et al.*, 2007; Vicens *et al.*, 2002].

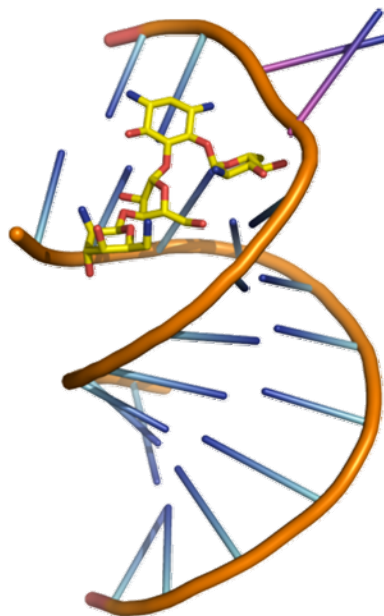


Abb. 3-5: *E. coli* 16S-rRNA mit Paromomycin

Ausschnitt der 16S rRNA von *E. coli* im Komplex mit dem Aminoglykosid-Antibiotika Paromomycin, pdb-code: 1jt7 [Vicens *et al.*, 2001]. Die rRNA ist in *cartoon*-Darstellung gezeigt, Paromomycin als gelbe *stick*-Darstellung.

Durch die Antibiotika wird der Zustand simuliert, welcher normalerweise bei Bindung einer komplementären Aminoacyl-tRNA auftritt (Abb. 3-5) [Ogle *et al.*, 2001; Ogle *et al.*, 2002; Carter *et al.*, 2000; Vicens *et al.*, 2001]. Durch dauerhafte Stabilisierung des „ON“ Zustand der A-Bindestelle kann das Ribosom nicht mehr zwischen komplementären und nicht komplementären Aminoacyl-tRNAs unterscheiden, was dazu führt, dass falsche Aminosäuren eingebaut werden und somit nichtfunktionelle oder fehlgefaltete Proteine produziert werden. Dies führt letztendlich zum Tod der Zelle.

Wie bei anderen Antibiotika-Klassen hat auch bei den AGAs die intensive medizinische Verwendung bei vielen Bakterienstämmen zu Resistenzentwicklungen geführt [European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2009; Vakulenko *et al.*, 2003]. Es gibt viele verschiedene Möglichkeiten, wie Bakterien die Wirkung von AGAs behindern können [Arya, 2007]. Zum einen können anaerobe und fakultativ anaerobe Bakterien, wie z.B. *Clostridium spp.*, durch ein niedriges Transmembranpotential die Aufnahme von AGAs verringern bzw. verhindern [Bryan *et al.*, 1979]. Eine weitere Methode ist die Entwicklung von Efflux-Systemen für ein schnelles Ausschleusen der AGAs aus der Zelle, wie es vor allem gramnegative Bakterien wie *E. coli* anwenden [Rosenberg *et al.*, 2000]. Es gibt auch Bakterienstämme, welche durch Mutationen in der 16S rRNA oder durch die Methylierung der rRNA eine Resistenz gegen AGAs erlangen [Prammananan *et al.*, 1998; Galimand *et al.*, 2003]. Am häufigsten treten jedoch resistente Bakterienstämme auf, welche AGA-modifizierende Enzyme besitzen und so die Antibiotika durch Modifikationen an Amino- oder Hydroxygruppen unwirksam machen können [Llano-Sotelo *et al.*, 2002].

3.1.2 Aminotransferasen

Aminotransferasen spielen bei der Synthese von Aminoglykosid Antibiotika in Bakterien eine wichtige Rolle. Dabei sind oft mehrere Aminotransferasen bei der Synthese eines Produktes beteiligt, wobei jede Aminotransferase an einer bestimmten Position eine Aminogruppe hinzufügt. Anhand dessen werden die Aminotransferasen in bestimmte Gruppen eingeteilt. Die Enzyme der S/S1-Gruppe

sind an zwei Transaminierungsreaktionen während der Produktion von 2-DOS beteiligt, sie sind bifunktionell und nutzen L-Glutamin als Aminodonor. Die S2 Gruppe katalysiert die Transaminierung von komplexeren Intermediaten, bestehend aus dem Aglycon und einem bis mehreren Zuckerringen. Diese Enzymgruppe ist monofunktionell und nutzt ebenfalls L-Glutamin als Donormolekül. Die dritte Gruppe, die B-Enzyme, sind wie die S/S1-Enzyme bifunktionell, verwenden aber L-Glutamat als Aminodonor. Diese Gruppe von Enzymen ist verantwortlich für die Modifikation von AGA-Intermediaten mit Aminogruppen am Kohlenstoff 6 des ersten (6') und dritten (6''') Zuckerrings [Piepersberg *et al.*, 2007; Clausnitzer *et al.*, 2011]. Das für die Reaktion benötigte Intermediat mit einer Aldehydgruppe an der zu modifizierenden Position wird zuvor von Oxidoreduktasen, den Q-Enzymen, produziert. Die Strukturen für zwei Aminotransferasen aus AGA produzierenden Genclustern konnten schon gelöst werden. Dabei handelt es sich zum einem um eine S1-Aminotransferase aus dem Butirosin-produzierenden Gencluster aus *Bacillus circulans*. Die Struktur von BtrR konnte sowohl im Komplex mit PLP als auch in seiner PMP gebundenen Form aufgeklärt werden [Popovic *et al.*, 2006]. Zum anderen konnte die Struktur eines S2-Enzyms, der Aminotransferase TobS2 aus dem Tobramycin produzierenden Gencluster von *Streptomyces tenebrarius*, gelöst werden [Hennig, 2009]. Eine Kristallstruktur einer Aminotransferase aus der Gruppe der B-Enzyme konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden.

Aminotransferasen (ATs) (EC 2.6.1), auch Transaminasen genannt, katalysieren die Übertragung von Aminogruppen von einem Donormolekül auf ein Akzeptormolekül (Abb 3-6). Sie gehören zu den Vitamin B₆-abhängigen Enzymen und besitzen Pyridoxal-5'-Phosphat als Kofaktor. Als Donor der Aminogruppe wird in den meisten Fällen eine Aminosäure genutzt, wie L-Glutamat, L-Glutamin, L-Aspartat oder L-Asparagin.

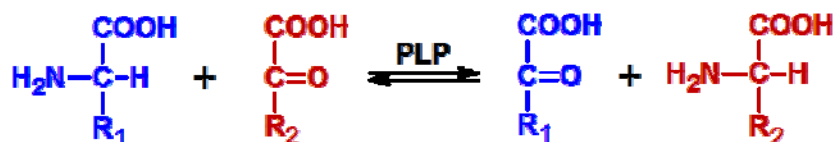


Abb. 3-6: Transaminierungsreaktion

In blau ist die Aminosäure 1 bzw. nach der Transaminierung die α -Ketosäure 1 dargestellt, in rot entsprechend Aminosäure 2 und α -Ketosäure 2. Abgewandelt nach Voet *et al.* 1995 [Voet *et al.*, 1995].

Neben der Aminoglykosid-Antibiotika Synthese, kommen Aminotransferasen auch im Aminosäurestoffwechsel vor.

3.1.2.1 Vitamin B6-abhängige Enzyme

Die Klasse der Vitamin B₆-abhängigen Enzyme, auch Pyridoxal-5'-Phosphat-abhängige Enzyme genannt, ist an einer Vielzahl von verschiedenen Reaktionen im Aminosäurestoffwechsel beteiligt. Zu dieser Enzymklasse gehören Aminotransferasen, Decarboxylasen, Racemasen, α -, β -, γ -Synthasen und β -, γ -Lyasen [Vacca *et al.*, 2008]. Alle diese Enzyme besitzen den Kofaktor Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP), welcher über eine Schiff'sche Base Bindung (internes Aldimin) an das Enzym gebunden ist. Die kovalente Bindung erfolgt über die ϵ -Aminogruppe eines sich im Aktiven Zentrums befindlichen Lysins. Die einzige bisher bekannte Ausnahme ist die GDP-4-Keto-6-Deoxy-D-Mannose-3-Dehydratase (CoID) [Cook *et al.*, 2006; Cook *et al.*, 2008], bei der ein Histidin im aktiven Zentrum vorliegt und der Kofaktor nicht kovalent gebunden wird.

Die Enzymklasse wurde zunächst in drei Familien - α , β und γ - unterteilt [Alexander *et al.*, 1994]. Die meisten Enzyme werden zur α -Familie gezählt, während sich in die β - und γ -Familie nur wenige Enzyme einordnen lassen. Da die α -Familie mit den Aminotransferasen die größte Gruppe darstellt, wurde die Gruppe nochmals in mehrere Untergruppen (I, II, III und IV) eingeteilt [Mehta *et al.*, 1993]. Durch eine Vielzahl gelöster Strukturen [Jansonius, 1998] wurde basierend auf Strukturvergleichen, Strukturvorhersagen und Sequenzvergleichen eine genauere Klassifizierung in sieben Faltungstypen vorgenommen (siehe Tab. 3-1) [Grishin *et al.*, 1995].

Tab. 3-1: Die sieben Faltungstypen der Vitamin B₆-abhängigen Enzymklasse nach [Grishin *et al.*, 1995].

Faltungstyp	Beispiele
I	Aminotransferasen Gruppe I, II, III , V u.a.
II	Tryptophan Synthase u.a.
III	Eukaryontische Ornithin Decarboxylase u.a.
IV	Aminotransferase Gruppe IV u.a.
V	Glycogen Phosphorylase
nicht klassifiziert	Succinyldiaminopimelat Aminotransferase
nicht klassifiziert	Valin-pyruvat Aminotransferase

Dabei vereint der Faltungstyp I fast alle Aminotransferasen, während die β -Familie jetzt dem Faltungstyp II entspricht. Der Faltungstyp I wurde von Käck *et al.* [Käck *et al.*, 1999] noch in sechs weitere Subklassen unterteilt.

3.1.2.2 Aminotransferase LivB

LivB ist eine Aminotransferase aus dem *liv*-Gencluster von *S. lividus* CBS 844.73 (Accession Code AJ748832) [Piepersberg *et al.*, 2007] (Abb. 3-7). Der Gencluster produziert das Aminoglykosid-Antibiotikum Lividomycin B [Oda *et al.*, 1971], das zur Gruppe der 4,5-disubstituierten 2-DOS Aminoglykosid-Antibiotika gehört. In Tests zeigte Lividomycin B antibakterielle Wirkung bei Tuberkulose [Shimizu, 1974; Tsukamura, 1972; Yamamoto *et al.*, 1973] sowie bei Infektionen der Harn- [Kumazawa *et al.*, 1973; Kurokawa *et al.*, 1972; Mita *et al.*, 1972; Tokito *et al.*, 1972] und Atemwege [Aoyagi *et al.*, 1975; Kondo *et al.*, 1975; Tsukamura, 1975]. Die Aminotransferase LivB gehört zu den B-Enzymen der AGA Aminotransferasen.



Abb. 3-7: *liv*-Gencluster.

Die Position der Aminotransferase LivB im Gencluster ist rot markiert. Abbildung aus Piepersberg *et al.*, 2007 [Piepersberg *et al.*, 2007].

LivB katalysiert die Transaminierung an der 6''' Position von 6'''-Oxoparomomycin zu Paromomycin unter Nutzung von L-Glutamat als Aminodonor (Abb. 3-8).

Paromomycin, welches selbst schon ein AGA ist, wird anschließend mit Hilfe weitere Enzyme des Genclusters zu Lividomycin B weiterverarbeitet (Abb. 3-4).

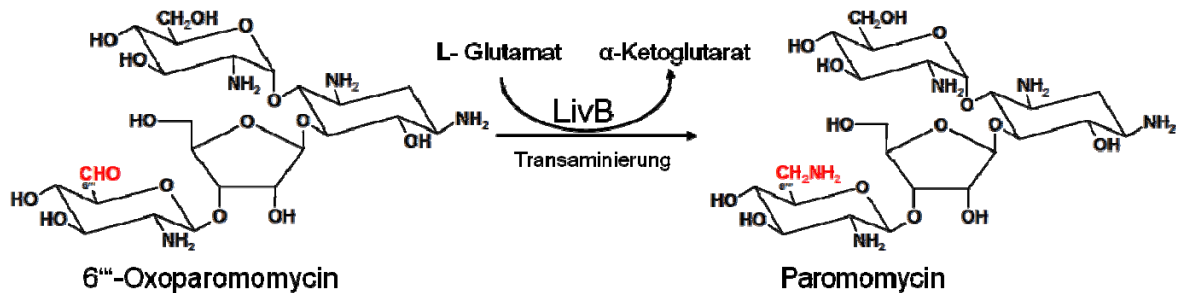


Abb. 3-8: Die Enzymreaktion von LivB.

Die 6''' Position, an der die Aminotransferase LivB angreift, ist rot markiert.

3.1.3 Zielsetzung

Ziel dieses Teils der Arbeit war die Kristallisation und Strukturaufklärung der Aminotransferase LivB sowie die Aufklärung des Mechanismus. Dafür sollten neben der Kristallstruktur von LivB, wenn möglich auch Kristallstrukturen von LivB im Komplex mit dem Kofaktor PLP und Reaktionssubstraten bzw. -produkten wie z.B. L-Glutamat produziert werden

Die Aminotransferase LivB lässt sich als His-tag Fusionsprotein löslich in *Streptomyces spp.* rekombinant exprimieren und eine erste Reinigungsstrategie über Ni²⁺-Affinitätschromatographie konnte bereits etabliert werden [Clausnitzer, 2010]. Außerdem wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. U. Wehmeier, Abteilung chemische Mikrobiologie, Universität Wuppertal, schon Untersuchungen zur Substratspezifität der Aminotransferase durchgeführt [Clausnitzer, 2010; Clausnitzer *et al.*, 2011]. Mit Hilfe der gelösten Strukturen sollte zudem versucht werden, die gefundenen Substratspezifitäten von D. Clausnitzer strukturell zu analysieren.

3.2. Ergebnisse Aminotransferase LivB

3.2.1 Expression und Reinigung

Die Kristallisation von LivB wurde als Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe von Dr. U. Wehmeier, Abteilung chemische Mikrobiologie der Universität Wuppertal, durchgeführt. Da die Expression und eine Reinigungsstrategie dort schon etabliert waren [Clausnitzer, 2010], wurde uns zunächst gereinigtes Protein für die Kristallisation zugesendet. Es stellte sich jedoch heraus, dass LivB im Lagerungspuffer nicht über einen längeren Zeitraum stabil war. Deshalb wurden für weitere Arbeiten Zellpellets von LivB-Expressionen versandt.

Zudem wurden uns die Plasmide für die Anzucht überlassen. Damit konnte die Expression von LivB in dem Zellstamm *Streptomyces lividans* TK24 in unserem Labor etabliert werden (siehe Abschnitt 4.2.2.2) (Abb. 3-9a). Die Expressionsrate und damit auch die Ausbeute war für LivB sehr unterschiedlich und von der Effizienz der Protoplastentransformation und dem Alter der Transformaten abhängig. Aus einer 50 ml Kultur von *S. lividans* TK24 konnten etwa 3 g Zellen gewonnen werden.

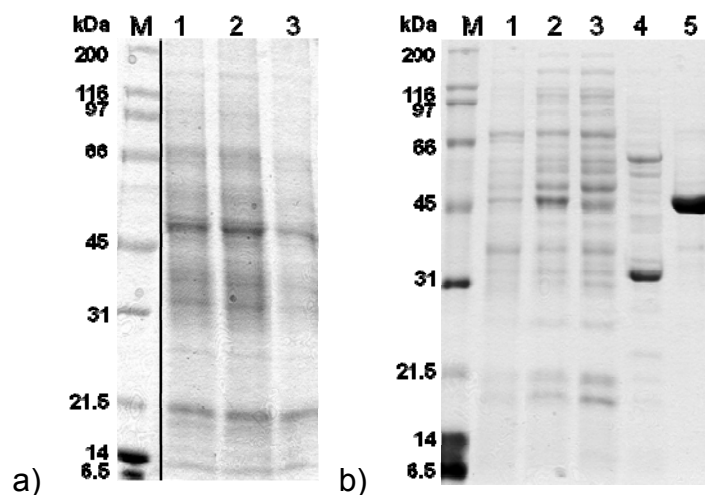


Abb. 3-9: SDS-PAGE der Expression und Reinigung von LivB.

a) Expression von LivB in *Streptomyces lividans* TK 64 Zellen, Spur 1-3 - Zellen von verschiedenen Kolonien der Protoplastentransformation nach 5d Expression, M - Marker, b) Analyse der Ni²⁺-Affinitätschromatographie von LivB, Spur 1 - löslicher Überstand nach Zellaufschluss, Spur 2+3 - Durchflussfraktionen, Spur 4 - Waschschrift (10 % B, 34 mM Imidazol), Spur 5 - Elutionsschritt (100 % B, 250 mM Imidazol), M - Marker.

Für die Ni²⁺-Affinitätsreinigung von LivB wurde das bestehende „Batch“-Protokoll für eine Säulenreinigung mittels Äkta abgewandelt und angepasst (siehe 4.2.2.6). Der Zellaufschluss wurde in Puffer A durchgeführt, welcher 10 mM Imidazol enthält, um eine Bindung von Fremdproteinen zu unterdrücken (siehe Abschnitt 4.2.2.6). Anschließend wurde das lösliche Protein durch Zentrifugation von den unlöslichen Zellbestandteilen abgetrennt. Nach dem Auftragen der Proteinlösung auf die 1 ml HisTrap™ HP Säule wurde diese mit einer Gradientenstufe von 10 % Puffer B gewaschen, um Verunreinigungen zu entfernen und das Zielprotein mit 100 % Puffer B eluiert.

In der SDS-PAGE Analyse der Reinigung ist in der ersten und zweiten Durchflussfraktion (Abb. 3-9b, Spur 2 + 3) eine schwache Bande auf der Höhe von LivB (N-His₁₀-LivB: 46 kDa) zu erkennen, beim anschließenden Waschen mit 34 mM Imidazol ist jedoch keine Bande zu sehen (Abb. 3-9b, Spur 4). Durch den zusätzlichen Waschschrift ließ sich ein Großteil der Verunreinigungen abtrennen, so dass die Elutionsfraktion nur sehr wenig Verunreinigungen neben dem gewünschten Zielprotein enthielt (Spur 5). Die Bande auf Höhe von LivB in den Durchflussfraktionen kann auf ein Überladen der Säulenkapazität hinweisen, da die Bande jedoch nicht sehr stark ausgeprägt ist, kann der Anteil an verlorengegangenen Protein als gering betrachtet und vernachlässigt werden. LivB war im Reinigungspuffer trotz der enthaltenen 10 % v/v Glycerin nicht sehr stabil und begann oft schon kurz nach der Reinigung auszufallen. Die Proteinlösung wurde deshalb sofort nach der Ni²⁺-Affinitätschromatographie konzentriert und für die Kristallisationsansätze vorbereitet. Bei der Konzentrierung konnte beobachtet werden, dass die Proteinlösung mit zunehmender Konzentration eine rosa Färbung annahm.

3.2.2 Kristallisation

Für die Kristallisation im 96-well Ansatz wurde die Proteinlösung konzentriert und für 30 min bei 4 °C und 22000 g zentrifugiert, um Aggregate abzutrennen (siehe 4.2.2.14). LivB befand sich im Puffer B der Ni²⁺-Affinitätsreinigung und hatte eine Konzentration von ~8 mg/ml. Es wurden Kristallisationsplatten mit allen acht Kristallisationskits (siehe Abschnitt 4.1.4), bei insgesamt 768 verschiedenen

Pufferbedingungen, angesetzt. Nach einigen Wochen konnten unter mehreren Pufferbedingungen Kristalle gefunden werden, wobei es sich in den meisten Fällen um Nadeln und Nadelbüschel handelte. In einigen Pufferbedingungen zeigten sich jedoch auch kleine Einzelkristalle (Abb. 3-10a). Bei einigen handelte es sich um Salzkristalle, andere waren eventuell zu klein um bei der Aufnahme von Testbildern am Generator ein Streubild zu ergeben. Unter drei Pufferbedingungen wurden Proteinkristalle erhalten, die schwach streuten:

- I JCSG++ D10: 0,1 M MES; 0,2 M CaAcetat; 40 % w/v PEG300; pH 6,5
- II HF G3: 0,1 M NaCitrat; 20 % w/v PEG4000; pH 8,8
- III HR B8: 0,2 M NaAcetat; 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 25 % w/v PEG4000; pH 4,6

Durch *microseeding* und *streakseeding* Versuche konnte eine erfolgreiche Reproduktion der Kristalle im 24-well Maßstab für Bedingung I erreicht werden. Die Proteinkristalle wuchsen als kleine Stäbchen bzw. Rhomboeder. Durch Variation der Proteinkonzentration und des pH-Wertes gelang es schließlich, größere Kristalle von LivB zu produzieren (Abb. 3-10b+c).

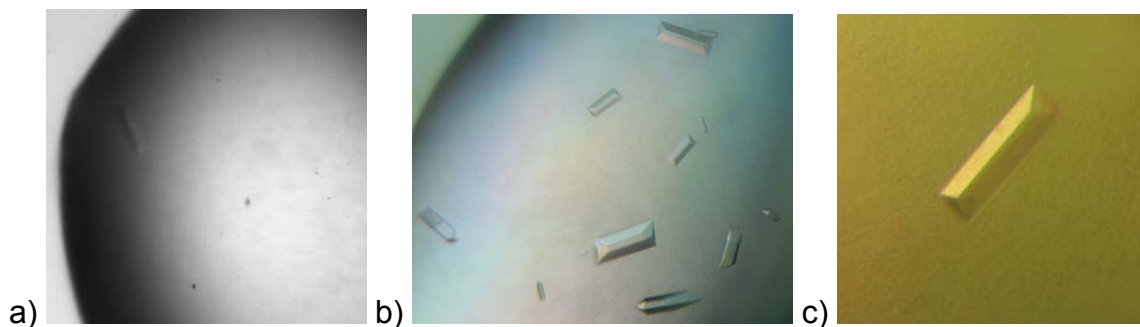


Abb. 3-10: Proteinkristalle von LivB.

a) Kristall von 96-well Kristallisationsansatz b) + c) Kristalle von 24-well Kristallisationsansätzen.

Die größten Proteinkristalle mit $\sim 0,1 \mu\text{m}$ Seitenlänge wuchsen nach 2 Tagen bei 20°C bei einer Proteinkonzentration von 5 mg/ml in $0,1 \text{ M MES}$; $0,2 \text{ M CaAcetat}$; 40 \% w/v PEG300 ; $\text{pH } 6,2$.

3.2.3 Datensammlung, Strukturlösung und Refinement

Es wurden von LivB verschiedene Datensätze aufgenommen (siehe Tab. 3-2 und Abschnitt 4.2.2.16). Die Datenaufnahme erfolgte hierbei zunächst am Röntgendrehanodengenerator der Arbeitsgruppe und dann auch am Synchrotron BESSY-2 an der *beamline* 14.2 in Berlin.

Die mit der Kupferanode ($\lambda = 1,5418\text{\AA}$) gemessenen Kristalle gehören alle zur Raumgruppe P212121 und streuten bis zu einer maximalen Auflösung von etwa 2,1 \AA . Zunächst wurde versucht, die Struktur von LivB mittels der Methode des molekularen Ersatzes (*molecular replacement*, MR) zu lösen (siehe 4.2.2.17). Dazu wurde eine BLAST Suche [Altschul et al., 1990] mit der Aminosäuresequenz von LivB gegen die *Protein Data Bank* (PDB) durchgeführt. Aus den Suchergebnissen wurden die Strukturen der Glutamat-1-semialdehyd 2,1-aminomutase (GSAM) (pdb-code: 2hoy [Stetefeld et al., 2006]) aus *Synechococcus elongatus*, der Acetylnithine Aminotransferase (ACOAT) (pdb-code: 1vef) aus *Thermus thermophilus* und der 4-Aminobutyrat Aminotransferase (GABA AT) (pdb-code: 2szs [Liu et al., 2005]) aus *Escherichia coli* als Modelle für das MR ausgewählt. Es wurden PHASER Läufe [McCoy et al., 2007] mit den einzelnen Modellen, mit allen drei Modellen zusammen und auch mit einem verkürzten Modell, welches nur Bereiche enthielt, die zehn überlagerte Strukturen gemeinsam hatten, durchgeführt. Trotz mehrerer Versuche mit unterschiedlichen Modellen war die Strukturlösung mittels MR für den LivB-Apo-Datensatz nicht erfolgreich.

Mit den Kristallen wurden nun *soaking*-Experimente durchgeführt (siehe 4.2.2.15), um die Phasen experimentell zu bestimmen. Dabei zeigte sich, dass bei *soaking* mit den Schweratomderivaten Kaliumtetrachloroplatinat (K_2PtCl_4) und Quecksilberchlorid (HgCl_2) die LivB Kristalle anfangen, sich leicht aufzulösen, was sich dann auch in einer schlechteren Auflösung widerspiegelte. Bei Kaliumiodid (KI) trat dieser Effekt nicht auf. Es wurde in diesem Fall auch keine Abhängigkeit von der Inkubationszeit beobachtet. Bei Inkubation mit der *magic triangle* Verbindung (I3C, 5-Amino-2,4,6-triiod-Isophthalsäure, Abb. 3-11a) zeigten die Kristalle keine sichtbaren

Veränderungen, es konnte jedoch festgestellt werden, dass durch eine kurze Inkubationszeit (30 s) bei einer niedrigen Konzentration von 50 mM die beste Auflösung erzielt werden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der vier besten Datensätze dargestellt und diskutiert. Die Statistik der Datensammlung ist in Tabelle 3-2 dargestellt.

Tab. 3-2: Statistik der LivB-Datensätze

In Klammern sind die Werte der äußersten Auflösungsschale angegeben.

LivB Datensatz	LivB-I3C	LivB-apo	LivB-PLP	LivB-PLP-Paromomycin
Röntgenquelle	Kupferanode	BESSY BL14.2	BESSY BL14.2	Kupferanode
Wellenlänge (Å)	1.5418	0.9184	0.9184	1.5418
Auflösung (Å)	30 – 2.3 (2.38 – 2.3)	33.71 – 1.49 (1.53 -1.49)	33.47 – 1.93 (1.98 – 1.93)	19.75 – 2.1 (2.2 – 2.1)
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Einheitszelle				
a, b, c (Å)	81.5, 82.5, 119.4	81.7, 82.9, 119.5	79.7, 81.1, 118.6	81.2, 82.4, 119.2
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
R _{rim} (= R _{meas})	0.12 (0.47)	0.07 (0.73)	0.10 (0.57)	0.13 (0.64)
R _{ano}	0.06 (0.15)	-	-	-
R _{ano} /R _{pim}	2.4 (1.7)	-	-	-
I / σI	18.0 (6.8)	15.5 (2.0)	11.8 (2.7)	12.3 (2.9)
Vollständigkeit (%)	99.9 (100.0)	99.6 (96.9)	99.4 (98.5)	99.5 (99.6)
Redundanz	14.9 (14.5)	4.3 (3.3)	3.9 (3.5)	4.6 (3.9)

Die Strukturlösung erfolgte schließlich mit der Methode *single wavelength anomalous dispersion* (SAD) (siehe 4.2.2.17). Es wurde ein Datensatz von einem mit I3C inkubierten Kristall (LivB-I3C) mit einer Kupferanode ($\lambda = 1,5418\text{\AA}$) aufgenommen [Beck *et al.*, 2009; Beck *et al.*, 2008a], in der initialen anomalen Dichte konnten die Iodatome von zwei I3C Molekülen als regelmässige Dreiecke gefunden werden (Abb. 3-11b). Mit Hilfe der anomalen Phasen und dem Programm SHELX C/D [Sheldrick, 2008] konnte aus dem LivB-I3C Datensatzes eine erste Anfangselektronendichte berechnet werden. Anschließend erfolgten abwechselnd Prozesse von Dichtemodifikation und Hauptkettenfindung mit dem Programm SHELX E [Sheldrick, 2010], bis eine gut definierte Polyalaninkette identifiziert wurde. Diese enthielt schon etwa 75 % des Proteins und bestand aus 39 Fragmenten. Mit Hilfe des am BESSY gemessenen LivB-Apo Datensatzes und der Aminosäuresequenz von LivB konnte aus dieser Polyalaninkette im Programm ARP/wARP [Langer *et al.*, 2008] ein erstes Proteinmodell erstellt werden. Dieses Modell bestand aus 14 Fragmenten und

beinhaltete schon etwa 90 % des Proteins. Anschließend wurde das Modell noch manuell mit den Programmen COOT [Emsley *et al.*, 2004] und Refmac5 [Murshudov *et al.*, 1999] des CCP4 Programmpaketes erweitert und verfeinert. In der asymmetrischen Einheit des Kristalls wurden zwei Monomere von LivB gefunden, die ein Homodimer bilden.

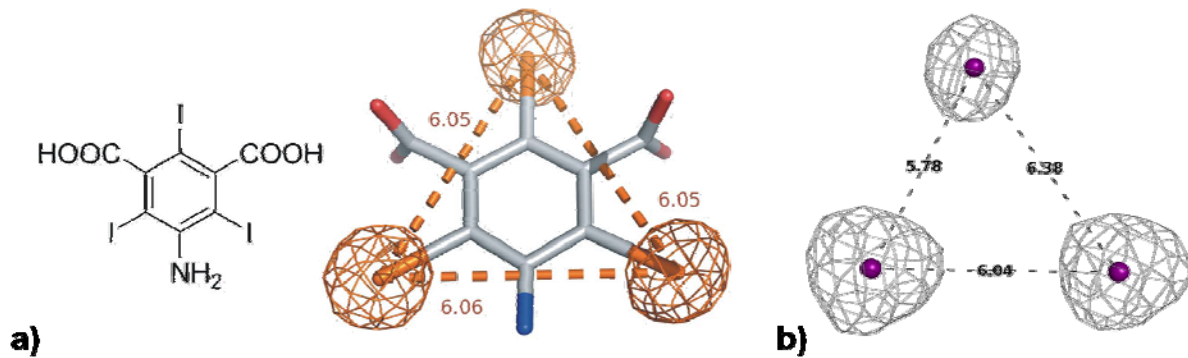


Abb. 3-11: Iodatome eines I3C Moleküls in der initialen Elektronendichte.

a) Strukturformel und anomale Dichte eines I3C Moleküls aus [Beck *et al.*, 2008a] b) Iodatome eines I3C Moleküles in der initialen anomalen Elektronendichte des LivB-I3C Datensatzes (Kontourlevel = 5σ).

Für Kristallstrukturen im Komplex mit dem Kofaktor PLP, dem Aminodonor bzw. dem Produkt von LivB, wurde ein *Ligandensoaking* durchgeführt (siehe Abschnitt 4.2.2.15). Das *soaking* gestaltete sich schwierig, da die Substanzen sich nur in niedrigen Konzentrationen im Kristallisationspuffer lösen ließen. Es wurden verschiedene Kombinationen von Liganden für das Soaken verwendet (Tab. 3-3):

Tab. 3-3: verwendete Liganden und ihre Konzentration und Einwirkzeit

Liganden	Konzentration	Einwirkzeit
PLP	25 mM	30min – 4d
L-Glutamat	50 mM	1h – 6d
L-Glutamin	50 mM	1h – 4d
PLP + L-Glutamat	12,5 mM/25 mM	30min – 4d
PLP + L-Glutamin	12,5 mM/25 mM	30min – 5d
PLP + Paromomycin	12,5 mM/25 mM	30min – 5d
PLP + L-Glutamat + Paromomycin	8,3 mM/16,7 mM/8,3 mM	30min – 7d
PLP + L-Glutamin + Paromomycin	8,3 mM/16,7 mM/8,3 mM	30min – 7d

Bei der Inkubation mit PLP konnte in Kristallen, welche über einen längeren Zeitraum inkubiert wurden, die beste Bindung erreicht werden. Zudem zeigten die Kristalle nach der Inkubation eine leichte Gelbfärbung. Das Produkt Paromomycin konnte nur

in Kombination mit dem Kofaktor PLP in den Kristallen gefunden werden, auch hier ergaben längere Inkubationszeiten eine bessere Bindung. Der Aminodonor L-Glutamat bzw. das Analogon L-Glutamin konnte in keinem Kristall, weder bei Inkubation allein oder in Kombination mit den anderen Liganden nachgewiesen werden.

Die Strukturen LivB-PLP und LivB-PLP-Paromomycin konnten mit LivB-Apo als Modell durch MR gelöst werden. Die Statistiken der Datensätze nach endgültiger Verfeinerung sowie die Ergebnisse der Ramachandran-Analyse sind in den Tabellen 3-4 und 3-5 dargestellt.

Tab. 3-4: Refinementstatistik der LivB-Datensätze

LivB Datensatz	LivB-I3C	LivB-apo	LivB-PLP	LivB-PLP-Paromomycin
Anzahl der Reflexe (Gesamt/Testset)	49797/2525	132133/6607	58130/2905	48060/2531
Anzahl der Atome				
Gesamt	6921	7283	6909	6667
Protein	6248	6539	6313	6202
LivB (Monomer A / B)	3124/3124	3297/3242	3144/3169	3101/3101
PLP (Monomer A / B)	-	-	15/15	15/15
Paromomycin (Monomer A / B)	-	-	-	42/42
I3C (Monomer A / B)	48/32	-	-	-
Imidazol	-	10	-	-
Ca	2	2	3	1
Ethylenglykol	-	4	-	-
Cl	-	1	-	-
Wasser	591	727	563	350
Durchschnittlicher B-Faktor (Å ²)	21,84	12,61	20,57	22,33
R _{work} /R _{free}	19,79 / 25,52	14,61 / 18,40	17,47 / 22,71	19,55 / 25,11
Abweichung vom Standard				
rmsd Bindungslängen (Å)	0,007	0,006	0,007	0,007
rmsd Bindungswinkel (°)	1,088	1,046	1,092	1,114

Tab. 3-5: Statistik der Ramachandran-Analyse der LivB Datensätze

Die Analyse der Datensätze erfolgte mit PROCHECK [Laskowski *et al.*, 1993]. In Klammern sind die Prozente an der Gesamtstruktur angegeben.

Datensatz	Anzahl der Aminosäuren in den bevorzugten Regionen	Anzahl der Aminosäuren in erlaubten Regionen	Anzahl der Aminosäuren in verbotenen Regionen
LivB-Apo	803 (98,6)	9	2
LivB-I3C	801 (98,1)	12	1
LivB-PLP	794 (97,5)	17	3
LivB-PLP-Paromomycin	794 (97,5)	17	3

Die Qualität von Kristallstrukturen lässt sich mit Hilfe bestimmter Kriterien - R_{work} , R_{free} und ihrer Differenz ($\Delta_{R_{\text{work}}-R_{\text{free}}} < 5\%$), dem durchschnittlichen Gesamt-B-Faktor und dem Ramachandran-Plot - beurteilen. Für die vier vorliegenden Datensätze von LivB-Apo, LivB-I3C, LivB-PLP und LivB-PLP-Paromomycin lässt sich feststellen, dass sie zu guten R-Werten verfeinert werden konnten. Die B-Faktoren liegen für alle Datensätze in dem der Auflösung entsprechenden Bereich. Auch der Ramachandran-Plot zeigt für die Strukturen nur einige wenige Aminosäuren in noch erlaubten Regionen und nur maximal drei Aminosäuren in verbotenen Regionen an. Das heißt, in jedem Datensatz liegen mindestens 97,5% der Diederwinkel in den bevorzugten Winkelregionen, was die gute Qualität der Datensätze belegt (Tab. 3-5). So liegt die Aminosäure Ala230 - bei den drei Datensätzen LivB-Apo, LivB-PLP und LivB-PLP-Paromomycin in beiden Monomeren und beim Datensatz LivB-I3C nur im Monomer A - in den verbotenen Regionen des Ramachandran Plots, ist aber durch die Elektronendichte klar definiert (Abb. 3-12).

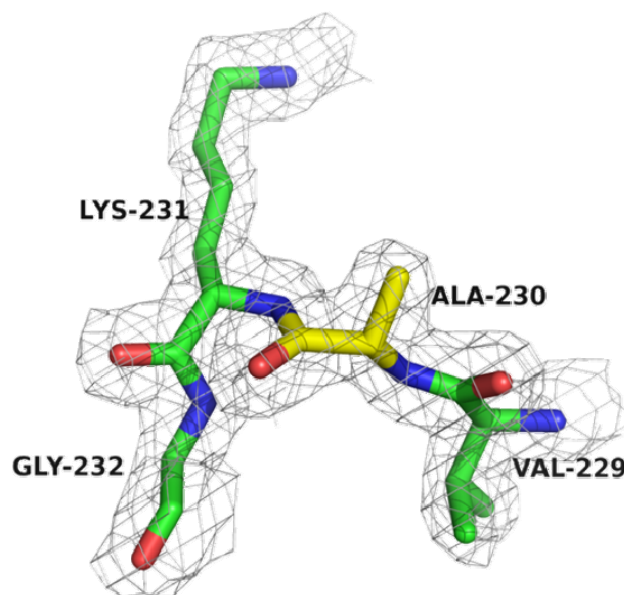


Abb. 3-12: Elektronendichte des Alanin 230.

Dargestellt sind die Aminosäuren 229 bis 232 des Monomers A des LivB-PLP Datensatzes mit ihrer Elektronendichte ($2f_o - f_c$, Kontourlevel = 1σ). Die Kohlenstoffatome des Alanins sind gelb, die der übrigen Aminosäuren grün gefärbt. Stickstoff- und Sauerstoffatome sind blau bzw. rot dargestellt.

3.2.4 Die Kristallstruktur von LivB

Im folgenden Abschnitt sollen die Strukturen der Datensätze LivB-Apo, LivB-PLP und LivB-PLP-Paromomycin ausführlich beschrieben werden. In Abbildung 3-13 ist die Nummerierung des Kofaktors PLP und des Produkts Paromomycin, wie sie im weiteren Verlauf der Arbeit benutzt werden, dargestellt (Abb. 3-13).

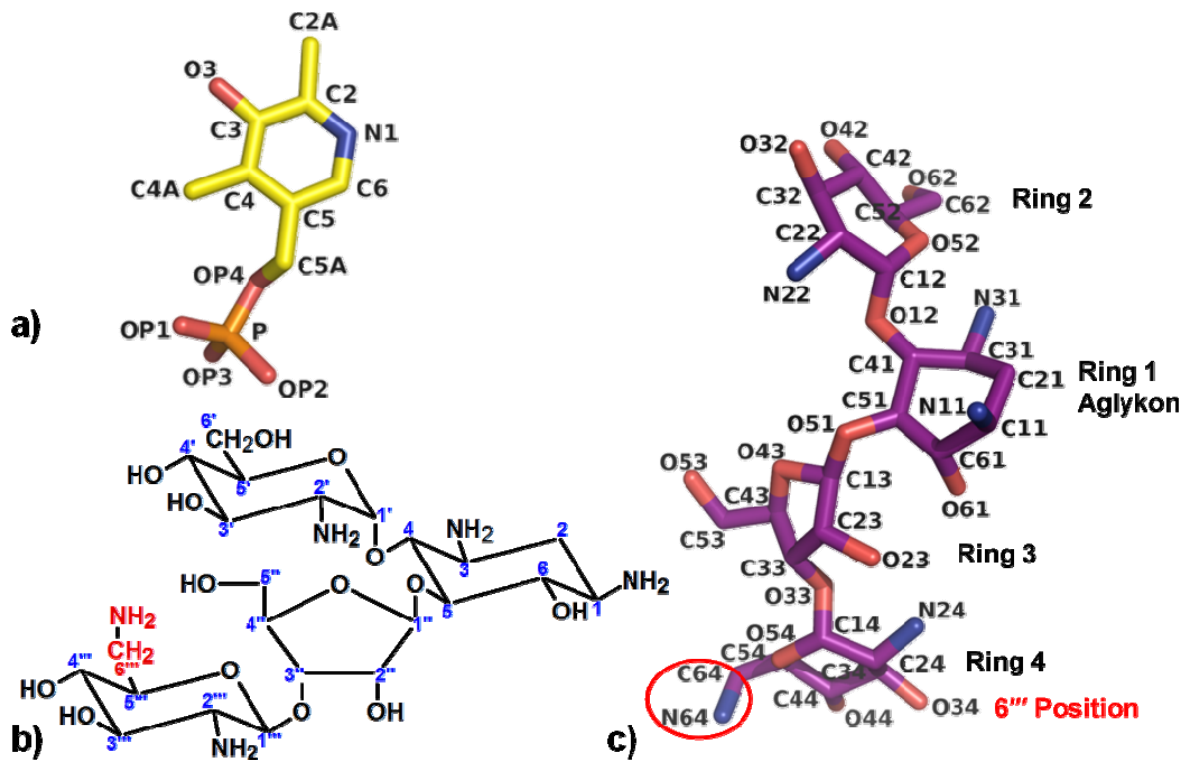


Abb. 3-13: Nummerierung von PLP und Paromomycin.

a) Die Struktur von PLP aus dem LivB-PLP Datensatz ist entsprechend der Atome eingefärbt: C - gelb, O - rot, N - blau und P - orange. b) Chemische Darstellung von Paromomycin, die Kohlenstoffatome der Ringe 2 - 4 sind entsprechend mit Strichen (Ring 2 = ', Ring 3 = '' und Ring 4 = ''') nummeriert. In rot ist die 6''' Position mit der transferierten Aminogruppe markiert. c) Dargestellt ist die Struktur von Paromomycin aus dem LivB-PLP-Paromomycin Datensatz entsprechend der Atome: C - magenta, O - rot und N - blau.

Für den LivB-Apo Datensatz konnten im Monomer A und B jeweils die Aminosäuren von 6 bis 414 eindeutig durch die ermittelte Elektronendichte beschrieben werden. Zudem konnten in der Kristallstruktur zwei Imidazolmoleküle, ein Ethylenglykolmolekül, zwei Calciumionen und ein Chloridion gefunden werden (Tab. 3-4 und Abb. 3-15). Die Monomere A und B haben zueinander einen *rmsd*-

Wert von 0,200 Å (Tab. 3-6). Im LivB-I3C Datensatz sind die Monomere A und B mit den Aminosäuren 6-414 durch die Elektronendichte klar definiert. Außerdem wurden noch fünf I3C-Moleküle und zwei Calciumatome in der Kristallstruktur gefunden (Tab. 3-4). Bei der Überlagerung des Monomers A auf Monomer B betrug der *rmsd*-Wert 0,241 Å (Tab. 3-6). Der Vergleich der Gesamtstruktur mit der Gesamtstruktur von LivB-Apo ergab einen *rmsd*-Wert von 0,203 Å (Tab. 3-7). Beim LivB-PLP Datensatz waren neben den Aminosäuren 6-414 der Monomere A und B auch zwei PLP-Moleküle sowie drei Calciumatome durch die Elektronendichte definiert. Der *rmsd*-Wert der Überlagerung der Monomere beträgt 0,310 Å (Tab. 3-6). Bei einem Vergleich der Gesamtstrukturen von LivB-PLP mit LivB-Apo ergab sich ein *rmsd*-Wert von 0,303 Å und für den Vergleich von LivB-PLP mit LivB-I3C der Wert 0,250 Å (Tab. 3-7). Wie in den anderen Datensätzen wurden auch für den Datensatz LivB-PLP-Paromomycin die Aminosäuren 6-414 der Monomere A und B eindeutig durch die Elektronendichte beschrieben. Weiterhin wurden in diesem Datensatz zwei kovalent mit den PLP-Molekülen verknüpfte Paromomycin-Moleküle (externe Aldimine) und ein Calciumatom gefunden. Für den Vergleich der Monomere A und B von LivB-PLP-Paromomycin ergab sich ein *rmsd*-Wert von 0,258 Å (Tab. 3-6). Die Überlagerungen der Gesamtstruktur des Datensatzes mit den Strukturen von LivB-Apo, LivB-I3C und LivB-PLP ergeben entsprechend die Werte 0,244 Å, 0,192 Å und 0,238 Å (Tab. 3-7). Zusammenfassend lässt sich zeigen, dass die *rmsd*-Werte aller LivB-Datensätze zwischen 0,192 Å und 0,303 Å schwanken (Tab. 3-7). Dies zeigt, dass nur sehr geringfügige Änderungen zwischen den einzelnen Datensätzen bestehen. Für den Vergleich der Monomere zueinander konnten *rmsd*-Werte zwischen 0,187 Å und 0,314 Å gefunden werden (Tab. 3-6).

Tab. 3-6: *rmsd*-Werte der einzelnen Monomere zueinander

Die Analyse der Datensätze erfolgte mit Pymol [Delano *et al.*, 2005]. Die *rmsd*-Werte sind in Å angegeben.

	Apo A	Apo B	I3C A	I3C B	PLP A	PLP B	PLP-Parom. A	PLP-Parom. B
Apo A	-	0,200	0,260	0,187	0,269	0,294	0,206	0,278
Apo B	0,200	-	0,278	0,172	0,314	0,227	0,265	0,208
I3C A	0,260	0,278	-	0,241	0,254	0,293	0,187	0,288
I3C B	0,187	0,172	0,241	-	0,314	0,208	0,253	0,186
PLP A	0,269	0,314	0,254	0,314	-	0,310	0,255	0,316
PLP B	0,294	0,227	0,293	0,208	0,310	-	0,255	0,205
PLP-Parom. A	0,206	0,265	0,187	0,253	0,255	0,255	-	0,258
PLP-Parom. B	0,278	0,208	0,288	0,186	0,316	0,205	0,258	-

Tab. 3-7: *rmsd*-Werte der Datensätze

Die Analyse der Datensätze erfolgte mit Pymol [Delano *et al.*, 2005].

	LivB-Apo	LivB-I3C	LivB-PLP	LivB-PLP-Paromomycin
LivB-Apo	-	0,203Å	0,303Å	0,244Å
LivB-I3C	0,203Å	-	0,250Å	0,192Å
LivB-PLP	0,303Å	0,250Å	-	0,238Å
LivB-PLP-Paromomycin	0,244Å	0,192Å	0,238Å	-

3.2.4.1 LivB-Apo Struktur und LivB-I3C Struktur

Wie in Abschnitt 3.2.4 schon erwähnt, konnten in jedem Datensatz zwei Monomere, die ein Homodimer bilden, gefunden werden. Die Monomere zeigen dabei die typische Unterteilung der Aminotransferasen in drei Domänen, eine N-terminale Domäne (blau), eine Kofaktor-bindende Domäne (gelb) und eine C-terminale Domäne (rot) (Abb. 3-14).

Die N-terminale Domäne von LivB beginnt mit einem unstrukturierten *loop*-Bereich, gefolgt von einem kleinen dreisträngigen β -Faltblatt, bestehend aus den β -Strängen $\beta 1 \uparrow$, $\beta 2 \downarrow$ und $\beta 3 \uparrow$, und endet dann nach einem weiterem *loop* in einer α -Helix ($\alpha 1$). Die Kofaktor-bindende Domäne ist größer und besteht aus einem siebensträngigen β -Faltblatt und fünf flankierenden Helices ($\alpha 2$ - $\alpha 6$), welche über *turn*- und *loop*-Bereiche miteinander verbunden sind. Das β -Faltblatt hat die Anordnung $\beta 4 \uparrow$, $\beta 10 \downarrow$,

$\beta 9 \uparrow$, $\beta 8 \uparrow$, $\beta 7 \uparrow$, $\beta 5 \uparrow$ und $\beta 6 \uparrow$. Die Faltung entspricht einem 3-Layer($\alpha\beta\alpha$) Sandwich, genauer dem Faltungstyp *Type I PLP-dependent aspartate aminotransferase-like (Major domain)* (CATH Code: 3.40.640.10 [Cuff *et al.*, 2011]). An die Kofaktor-bindende Domäne schließt sich die C-terminale Domäne an, welche aus fünf α -Helices ($\alpha 7$ - $\alpha 11$) und einem dreisträngigen β -Faltblatt ($\beta 11$ - $\beta 13$) besteht. An die erste α -Helix $\alpha 7$ schließen sich direkt die ersten zwei β -Stränge $\beta 11 \uparrow$, $\beta 12 \downarrow$ des β -Faltblattes an, dann folgt die α -Helix $\alpha 8$ und nach einem kurzen loop der dritte β -Strang $\beta 13 \uparrow$ an. Den Abschluss der Domäne bilden die drei α -Helices $\alpha 9$, $\alpha 10$ und $\alpha 11$, die über loop-Bereiche miteinander verbunden sind. Die Faltung der Domäne entspricht dabei einem *Alpha-Beta Complex*, (CATH Code: 3.90.1150.10 [Cuff *et al.*, 2011])

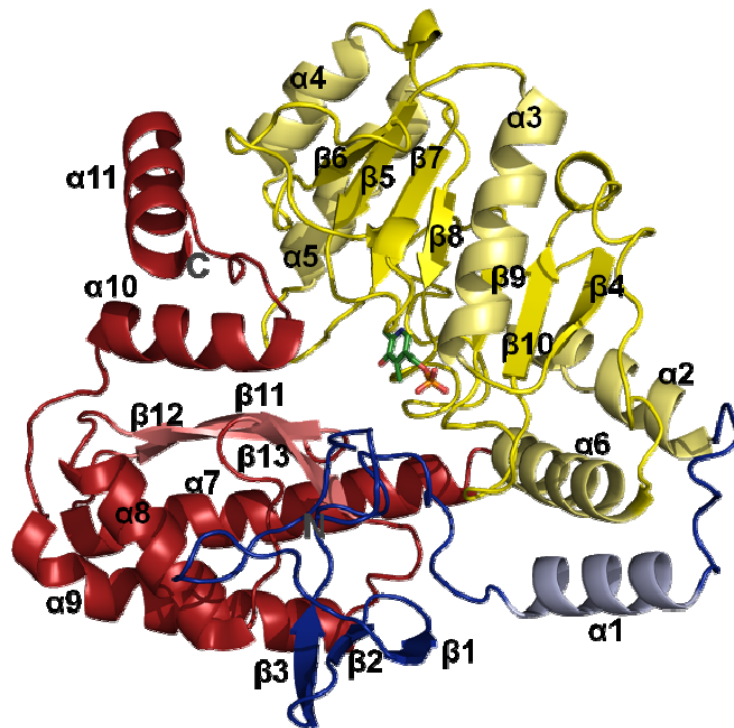


Abb. 3-14: Struktur eines Monomers von LivB-Apo.

Das Monomer A der LivB-Apo Struktur ist in der Cartoon-Darstellung gezeigt, die N-terminale Domäne ist blau, die große Kofaktor-bindende Domäne gelb und die C-terminale Domäne rot gefärbt. Im aktiven Zentrum ist der Kofaktor PLP aus der LivB-PLP Struktur (*stick*-Darstellung, Kohlenstoffatome grün, Sauerstoffatome rot, Stickstoffatome blau, Phosphoratome orange) gezeigt.

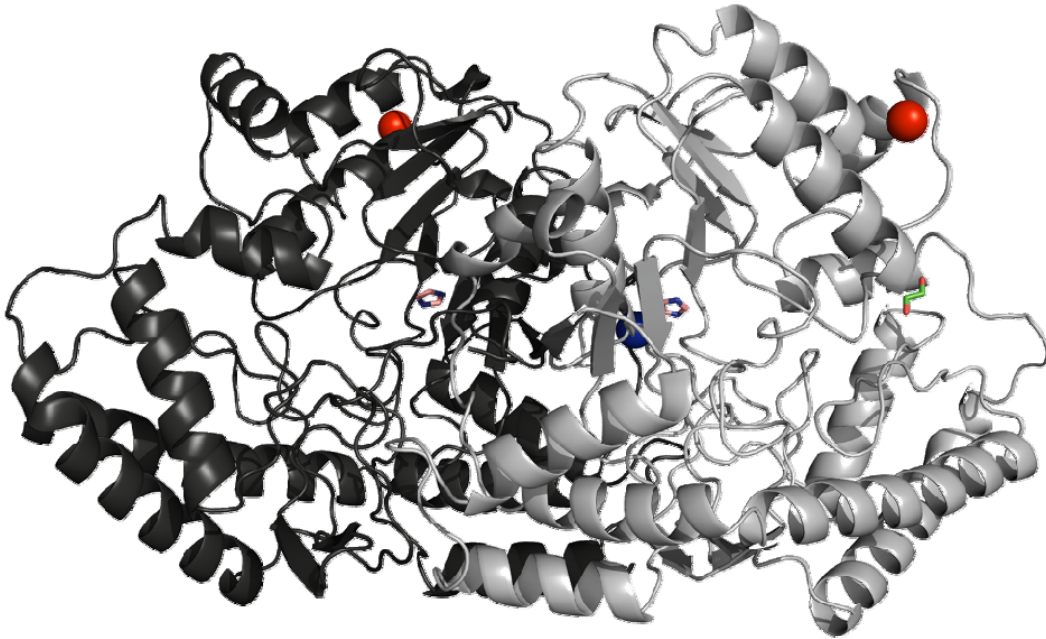


Abb. 3-15: LivB-Apo Dimerstruktur.

LivB-Apo Struktur (Cartoon-Darstellung, Monomer A dunkelgrau, Monomer B hellgrau), im Bereich des aktiven Zentrums der Monomere befindet sich jeweils ein Imidazolmolekül (*stick*-Darstellung, Kohlenstoff rosa gefärbt, Stickstoff blau). In *stick*-Darstellung ist ein Ethylenglykollmolekül (Kohlenstoff grün gefärbt, Sauerstoff rot) gezeigt und als Kugeln sind zwei Calciumionen (rot) und ein Chloridion (blau) dargestellt.

Die Analyse des Dimers (Abb. 3-15) mit dem PISA Server (http://www.ebi.ac.uk/pdbe/prot_int/pistart.html) [Krissinel *et al.*, 2007] ergab eine Kontaktfläche von $3345,2\text{\AA}^2$, welche durch Wasserstoff- und Salzbrücken zwischen den beiden Monomeren stabilisiert wird. Die Position der Imidazolmoleküle liegt dabei im Bereich des vermuteten aktiven Zentrums der Monomere von LivB (siehe Abb. 3-15).

Die Faltung von LivB-I3C entspricht der der LivB-Apo Struktur und ein Vergleich des vermuteten aktiven Zentrums von LivB-Apo mit LivB-I3C zeigte, dass sich sowohl die Imidazolmoleküle, als auch die in der LivB-I3C-Struktur gebundenen I3C-Moleküle in etwa der gleichen Position befinden (Abb. 3-16a und b).

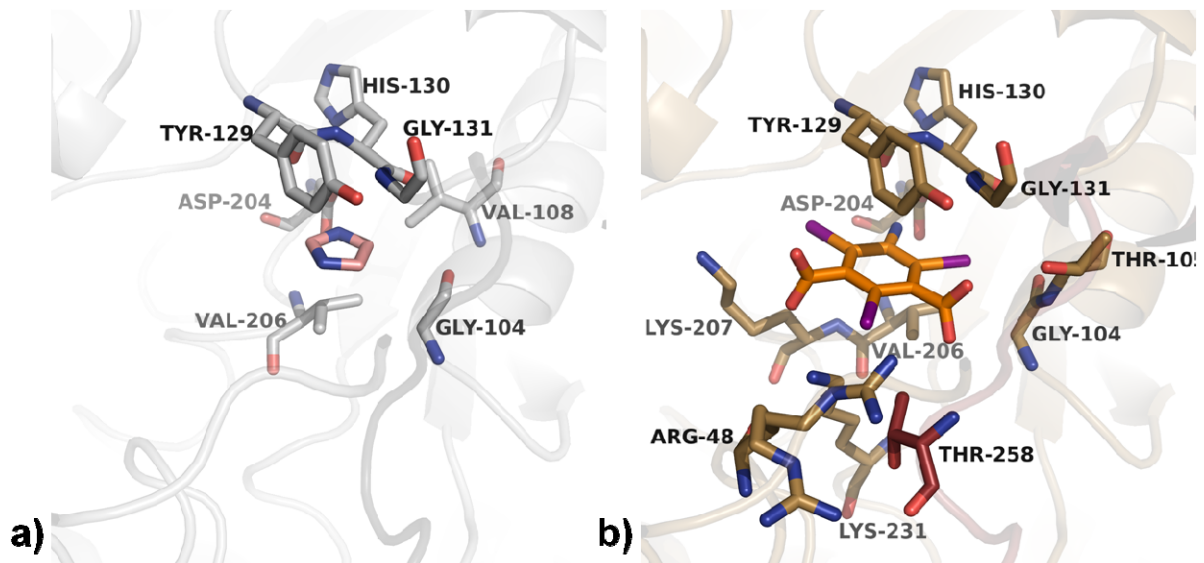


Abb. 3-16: Darstellung des vermuteten aktiven Zentrums von LivB-Apo und LivB-I3C.

Es sind die Aminosäuren im 4 Å Radius um das Imidazol- bzw. das I3C-Molekül in *stick*-Darstellung gezeigt. LivB-Apo ist wie in Abb. 3-15 eingefärbt, das LivB-I3C Monomer A in braun, das Monomer B sandfarben. Die Stickstoffatome sind blau, Sauerstoffatome rot und Iodatome violett gefärbt. Die Sekundärstruktur ist transparent als *Cartoon* dargestellt. a) aktives Zentrum des LivB-Apo Monomers B mit Imidazol (rosa) b) aktives Zentrum des LivB-I3C Monomers B mit I3C-Molekül (orange).

3.2.4.2 LivB-PLP Struktur

In der Kristallstruktur von LivB-PLP befinden sich zwei Pyridoxal-5'-Phosphat-Moleküle (PLP) an der gleichen Position (Abb. 3-17b), wo sich bei LivB-Apo die beiden Imidazol Moleküle befinden. Es handelt sich dabei tatsächlich um die aktiven Zentren des LivB Dimers. Beide PLP-Moleküle sind kovalent an das Lysin 231 gebunden, was durch die Elektronendichte eindeutig gezeigt wird (Abb. 3-17a). Diese kovalente Verbindung des PLP mit einem Lysin im aktiven Zentrum wird als internes Aldimin bezeichnet. Die weitere Koordination erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen, van der Waals Bindungen und Salzbrücken von Aminosäuren aus beiden Monomeren (Abb.3-17b). Die Phosphatgruppe des PLPs wird dabei durch die Aminosäuren Glycin104, Threonin105 aus dem einen Monomer sowie dem Threonin258 aus dem anderen Monomer gebunden. Die Aminosäure Tyrosin129 geht über ein Wassermolekül ebenfalls eine Bindung zur Phosphatgruppe ein. Der Stickstoff N1 des PLPs wird durch den Hauptkettensauerstoff des Tyrosin129 und durch die Seitenkettensauerstoffe des

Aspartat204 koordiniert. Das Lysin207 bildet über ein Wassermolekül eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Sauerstoff O3 der Kofaktors.

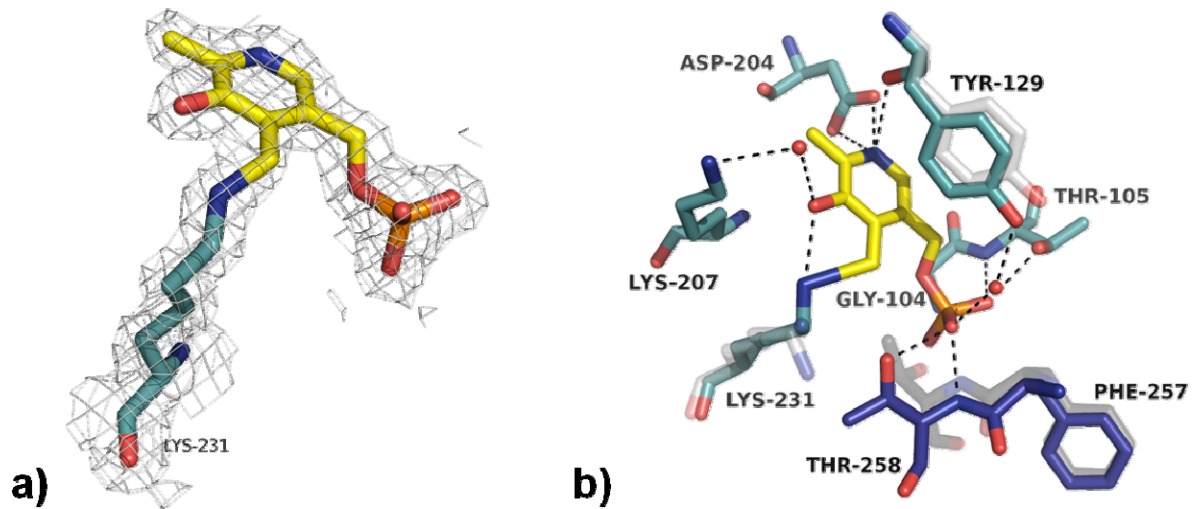


Abb. 3-17: Koordination des Kofaktors PLP im aktiven Zentrum von LivB.

Darstellung des aktiven Zentrums von LivB-PLP. a) Vom internen Aldimin, aus PLP und der Aminosäure Lysin231, ist die Elektronendichte (2foc konturiert bei 1σ) gezeigt. b) Darstellung der an der Bindung des PLP beteiligten Aminosäurereste und Wassermoleküle. Das Monomer A von LivB-PLP ist in dunkelblau, Monomer B in hellblau dargestellt. Als transparente *sticks* sind die Aminosäuren 105 und 129 aus Monomer B und 258 aus Monomer A von LivB-Apo gezeigt, welche bei Bindung des Kofaktor PLP die größten Veränderungen. Die Farbgebung von LivB-Apo entspricht Abb. 3-15.

Beim genauen Vergleich des aktiven Zentrums der LivB-Apo Struktur mit dem der LivB-PLP Struktur konnten leichte Positionsänderungen einiger Aminosäuren festgestellt werden (Abb. 3-17b). Die größten Unterschiede sind bei dem Threonin258 aus dem zweiten Monomer zu sehen, der Seitenkettensauerstoff bewegt sich bei Bindung des PLPs um etwa 4 Å, um für die Phosphatgruppe Platz zu schaffen. Außerdem rückt das Tyrosin129 bei Bindung des Kofaktors näher an diesen heran, um eine Wechselwirkung zu ermöglichen und das N ζ des Lysins dreht sich um fast 180°, um die Schiff'sche Base Bindung mit dem C4A Atom des PLPs einzugehen.

3.2.4.3 LivB-PLP-Paromomycin Struktur

Im aktiven Zentrum des LivB-PLP-Paromomycin Datensatzes konnten zwei Paromomycin-Moleküle festgestellt werden, die kovalent mit dem Kofaktor PLP verknüpft sind und das sogenannte externe Aldimin bilden (Abb. 3-18). Es konnte

jedoch nicht für das gesamte Paromomycinmolekül Elektronendichte gefunden werden. So ist in Monomer A nur das PLP und der Ring 4 sowie ein Teil des Ringes 3 durch die Elektronendichte definiert (Abb. 3-18a). Im Monomer B dagegen sind, neben dem PLP, die Ringe 3 und 4 sowie ein Teil des Rings 1 in der Elektronendichte sichtbar (Abb. 3-18b). Die vorhandene Elektronendichte lässt für die Ringe 1 und 2 des Paromomycins in Monomer A und B eine leicht unterschiedliche Anordnung zu (Abb. 3-18). Die kovalente Bindung an das PLP ist jedoch bei beiden Molekülen gut definiert. Die verhältnismäßig schlechte Sichtbarkeit der Paromomycinmoleküle in der Elektronendichte lässt sich durch die Position im Protein erklären. Bei Betrachtung der Oberfläche von LivB zeigt sich, dass nicht das gesamte Paromomycin in die Aushöhlung des aktiven Zentrums passt (Abb. 3-19). Die Ringe 1 und 2 ragen aus dem Enzym heraus und sind nicht durch Wechselwirkungen fixiert, sondern für das Lösungsmittel zugänglich.

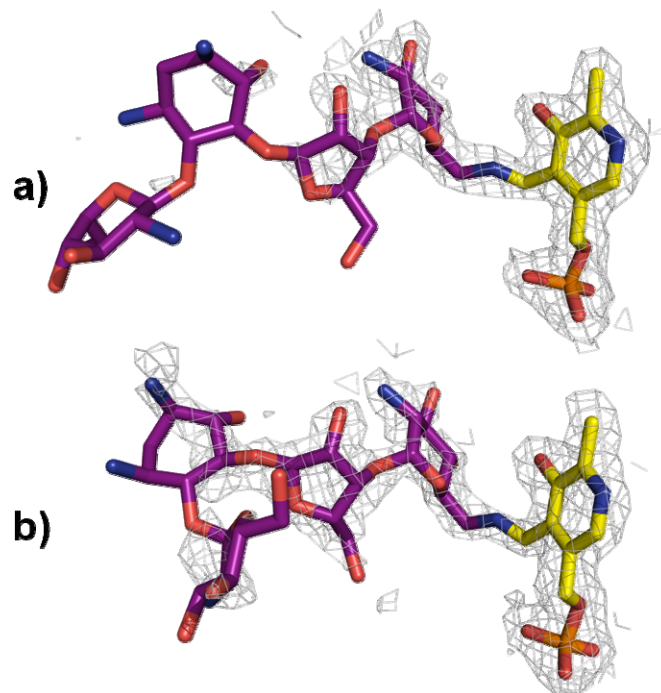


Abb. 3-18: Elektronendichte des externen Aldimins.

Darstellung des externen Aldimins von LivB-PLP-Paromomycin, die Elektronendichte (2f_oc konturiert bei 1 σ) ist als graues Netz angezeigt. Die Kohlenstoffatome des Paromomycins sind violett gefärbt, die des PLPs gelb. Sauerstoffatome in rot, Stickstoffatome in blau sowie Phosphoratome in orange. a) externes Aldimin aus dem Monomer A und b) externes Aldimin aus dem Monomer B des Datensatzes.

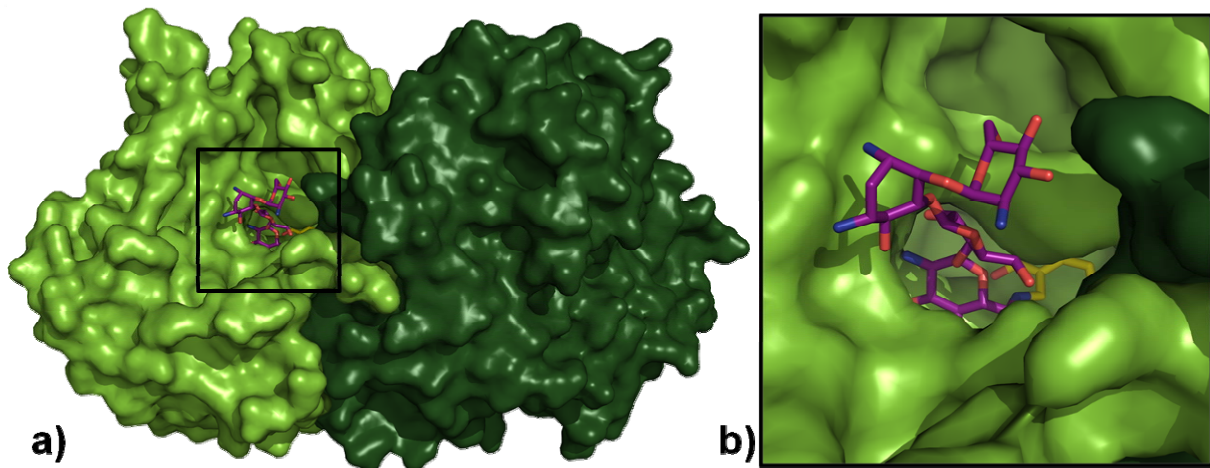


Abb. 3-19: Oberflächendarstellung der LivB-PLP-Paromomycin Struktur.

Von der LivB-PLP-Paromomycin Struktur ist die Oberfläche dargestellt. Das externe Aldimin ist in *stick*-Form gezeigt, Farbgebung wie in Abb. 3-18. Das Monomer A ist dunkelgrün gefärbt und das Monomer B hellgrün. a) Gesamtansicht der Oberfläche, b) Blick auf das gebundene Paromomycin im aktiven Zentrum von Monomer B.

Ein Blick auf die Bindung von Paromomycin in beiden Monomeren bestätigt, dass es fast ausschließlich durch Wechselwirkungen der beiden Ringe 3 und 4 mit den Aminosäuren des Enzyms im aktiven Zentrum gebunden ist. Bis auf die fehlende kovalente Bindung zum Lysin 231 hat sich an der Anordnung des PLPs im aktiven Zentrum im Vergleich zur Struktur von LivB-PLP nichts geändert. Auch die Koordinierung des Paromomycinteils des externen Aldimins unterscheidet sich zwischen den beiden Monomeren kaum.

Die Bindung von Paromomycin im Monomer A erfolgt über Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Tyrosin129, Lysin207, Lysin231, Aspartat344, Asparagin345, Asparagin391, Valin392 und Aspartat394 aus dem Monomer A (Abb. 3-20a). Dabei stabilisiert das N ζ des Lysins231 die Schiff'sche Base Bindung zwischen PLP und Paromomycin. Die Bindung des Rings 4 erfolgt über die Wasserstoffbrücken von O34 zu N ζ von Lysin207 und O δ 1 von Aspartat344 sowie von O44 über ein Wassermolekül zum N δ 2 von Asparagin345. Zudem bildet N24 Bindungen zu den O δ 2 von Aspartat344 und dem Hauptkettensauerstoff von Valin392 aus. Ring 3 wird durch Wasserstoffbrücken von O23 mit dem Hauptkettensauerstoff von Asparagin391 und den O δ 1/ δ 2 von Aspartat394, sowie durch eine *stacking* Interaktion mit Tyrosin129 in Position gehalten.

Im Monomer B wird das Paromomycin über Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken zu den Aminosäuren Threonin13, Tyrosin129, Lysin207, Lysin231, Asparagin391, Valin392 und Aspartat394 aus dem Monomer B und der Aminosäure

Glutamat254 aus dem Monomer A im aktiven Zentrum gehalten (Abb. 3-20b). Die Bindung ist dabei wie im Monomer A, nur dass der Ribosering 3 zusätzlich durch eine Wechselwirkung von O53 des Paromomycins mit dem Seitenkettensauerstoff des Threonin13 koordiniert wird.

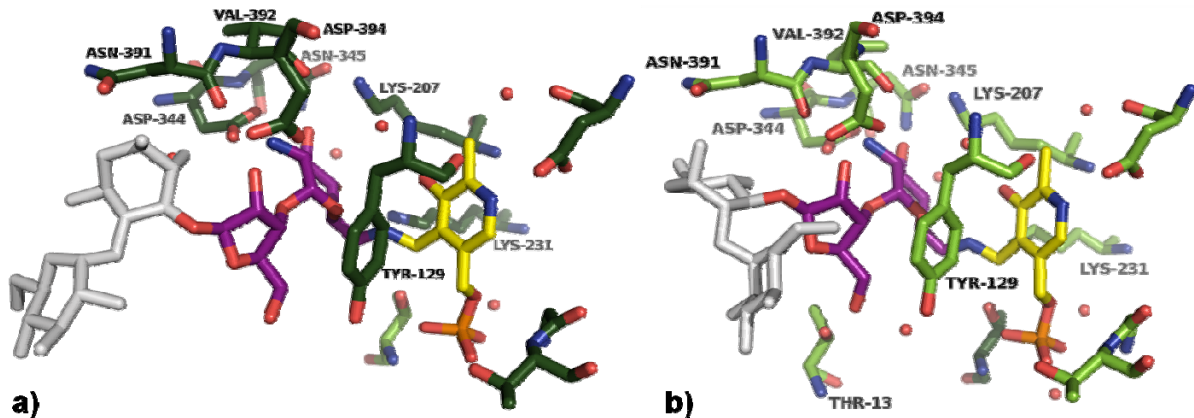


Abb. 3-20: Vergleich des aktiven Zentrums von LivB-PLP-Paromomycin in den beiden Monomeren.

Es ist das aktive Zentrum in einem Bereich von 3,5 Å um das externe Aldimin dargestellt. Die Farbgebung ist wie in Abb. 3-19 dargestellt. Der Teil des Paromomycinmoleküls, für den keine Elektronendichte gefunden wurde, ist weiß eingefärbt. Für die Koordinierung wichtige Aminosäuren sind gekennzeichnet. a) Monomer A des LivB-PLP-Paromomycin Datensatzes, b) Monomer B.

Mit der Struktur von LivB mit dem externen Aldimin können die von D. Clausnitzer gefundenen Ergebnisse der Aktivitätstests strukturell bestätigt werden [Clausnitzer, 2010; Clausnitzer *et al.*, 2011]. So stimmt die Aussage, dass LivB auch das Substrat von NeoB 6'''-Oxoneomycin C als Reaktionssubstrat verwenden kann. 6'''-Oxoneomycin C unterscheidet sich von 6'''-Oxoparomomycin nur durch eine zusätzliche Aminogruppe an Position sechs des ersten Zuckerringes (Abb. 3-21). Da aber in LivB nur die Zuckerringe drei und vier gut koordiniert sind, ist anzunehmen, dass die zusätzliche Aminogruppe auf die Reaktion keinen Einfluss hat.

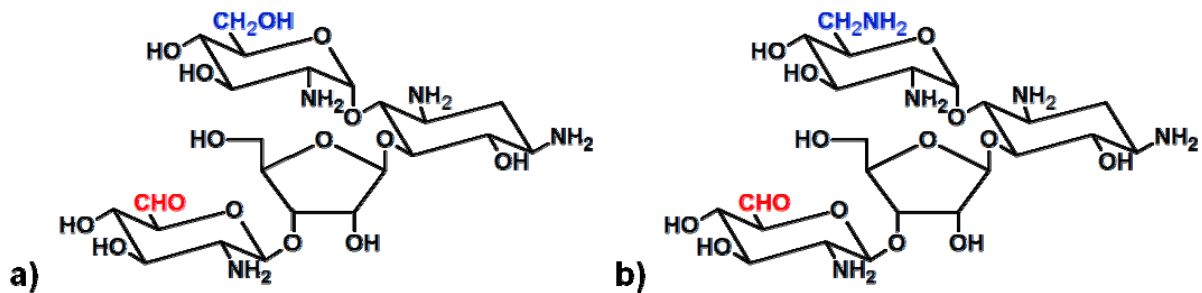


Abb. 3-21: Chemische Struktur der Substrate von LivB und NeoB.

Es sind die Strukturen von 6'''-Oxoparamomycin, dem Substrat von LivB, und 6'''-Oxoneomycin C, dem Substrat von NeoB, dargestellt. In blau ist der Unterschied zwischen beiden Strukturen gezeigt, in rot die 6'''-Position, an der die Aminogruppe eingefügt wird. a) 6'''-Oxoparamomycin, b) 6'''-Oxoneomycin C.

3.2.5 Diskussion der LivB Strukturen

Im folgenden Abschnitt werden die gelösten Strukturen mit den Kristallstrukturen von verwandten Enzymen verglichen. Dafür wurde zunächst eine DALI-Suche [Holm *et al.*, 2008; Holm *et al.*, 2010] mit dem Monomer B des LivB-PLP-Paramomycin Datensatzes gegen die *Protein Data Bank* (PDB) durchgeführt. Es wurde das Monomer B dieses Datensatzes verwendet, da hier die Elektronendichte für das Paramomycin besser definiert war als in Monomer A, siehe Abb. 3-18. Die Suche ergab 932 Ergebnisse, wobei bei Dimeren oder höheren Oligomeren jedes Monomer einzeln angegeben wird, außerdem wiederholen sich viele Proteine, da diese in mehreren pdb-Dateien mit z.B. unterschiedlichen Liganden oder unterschiedlicher Auflösung vorliegen. Die DALI-Suchmaschine erlaubt eine Eingrenzung der Ergebnisse, so dass alle Treffer, die mehr als 90% Sequenzidentität zueinander haben, ausgeschlossen werden können. Dadurch wurde die Ergebnisliste auf 204 Treffer beschränkt. Anschließend wurden diejenigen Proteine, bei denen es sich um dasselbe Protein nur aus unterschiedlichen Organismen handelte, herausgesucht. Hiervon wurde jeweils nur das Protein mit dem höchsten DALI-Z-score [Holm *et al.*, 2008] für die Ergebnisliste verwendet, so dass eine Liste mit 22 verschiedenen Proteinen übrig blieb (siehe Tabelle 3-8).

Mit Hilfe der PFAM (*Protein Families*) Datenbank [Finn *et al.*, 2010; Punta *et al.*, 2012] konnte die Ergebnisse verschiedenen Faltungsfamilien zugeordnet werden. Dabei zeigte sich, dass alle Ergebnisse zur Superfamilie der PLP abhängigen

Aminotransferasen gehören. Die Superfamilie wird in der PFAM Datenbank in 15 Familien unterteilt. LivB gehört wie die nächsten 11 Proteine zur Klasse III der Aminotransferasen (Tab. 3-8).

Aus den DALI Ergebnissen wurden vier Enzyme ausgewählt, zwei Enzyme der Klasse III, die Glutamat-1-semialdehyd 2,1-aminomutase (GSAM) (Abb. 3-21a) [Hennig *et al.*, 1994; Hennig *et al.*, 1997] und die Diaminopelargonsäure Synthase (DAPA) (Abb. 3-21b) [Käck *et al.*, 1999], sowie zwei Enzyme der Klasse DegT, die 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure Synthase (AHBA) (Abb. 3-21d) [Eads *et al.*, 1999] und die GDP-4-Keto-6-Deoxy-D-Mannose-3-Dehydratase (CoID) (3-21e) [Cook *et al.*, 2006; Cook *et al.*, 2008] (siehe Tabelle 3-8 und Abb. 3-21). Von allen vier Enzymen konnten Strukturen mit einem externen Aldimin aufgeklärt werden. Außerdem wurde noch die Struktur der Aspartat Aminotransferase (A_AT) (3-21c) [Malashkevich *et al.*, 1993] sowie das Enzym PseC aus dem Pseudaminsäure-Stoffwechsel (Abb. 3-22a) [Schoenhofen *et al.*, 2006] zum Vergleich herangezogen. Aus der AGA-Biosynthese werden die S1 Aminotransferase BtrR (3-22b) [Popovic *et al.*, 2006] und die S2 Aminotransferase TobS2 (Abb. 3-22c) [Hennig, 2009] verwendet (siehe Abschnitt 3.1.2.1).

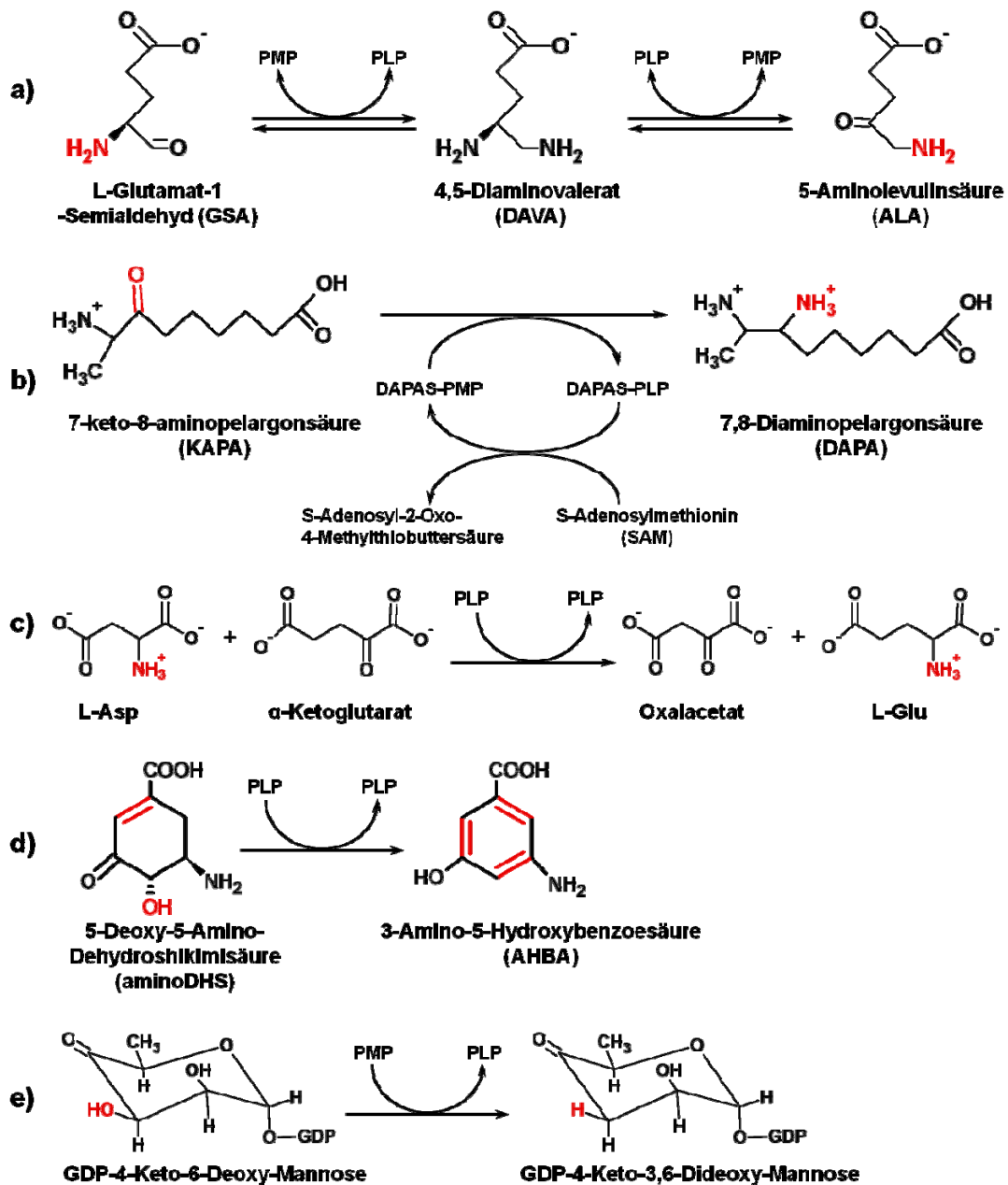


Abb. 3-22: Reaktionsschema ausgewählter mit LivB verwandter Enzyme

Es sind die chemischen Reaktionen für fünf mit LivB verwandte Enzyme dargestellt. In rot sind die während der Reaktion auftretenden Änderungen markiert. a) Reaktion der Glutamate-1-Semialdehyd 2,1 aminomutase (GSAM), b) Reaktion der 7,8-Diamino-Pelargonsäure Aminotransferase (DAPA), c) Reaktion der Aspartat Aminotransferase (A_AT), d) Reaktion der 3-Amino-5-Hydroxybenzoessäure Synthase (AHBA), e) Reaktion der GDP-4-keto-6-deoxymannose-3-dehydratase (CoID).

Tab. 3-8: Ergebnis der DALI-Suche für LivB

Der z-score ist der sogenannte DALI-Z-score, ein Wert der angibt, wie sehr die Proteine einander ähneln. Dabei zeigen Werte über 2 eine signifikante Ähnlichkeit der Strukturen an [Holm *et al.*, 2008]. *nalign* entspricht der Anzahl der abgeglichenen Aminosäuren und *nres* gibt die Gesamtzahl der Aminosäuren in der pdb-Datei des entsprechenden Proteins.

Name	Abkürzung	z-score	rmsd	lali	nres	Sequenz-identität [%]	pdb-code	Lysins im aktiven Zentrum	PFAM PLP_Aminotran Familie:
LivB-PLP-Paromomycin	LivB	-	-	-	408	-	-	231	III
Glutamate-1-Semialdehyd 2,1 aminomutase	GSAM	38,3	2,2	353	402	21	2hoy	273	III
Acetylorithin/Succinyldiaminopimelate Aminotransferase	AO_AT	35,6	2,6	348	387	19	2pb0	255	III
Ornithin Aminotransferase	O_AT	34,9	2,5	348	404	20	1oat	292	III
4-Aminobutyrat Aminotransferase	GAPA	34,4	2,4	353	425	20	1sf2	268	III
D-Phenylglycin Aminotransferase	PG_AT	33,9	2,6	348	401	23	2cy8	269	III
α-Amino-ε-Caprolactam Racemase	AC_racemase	33,2	2,4	348	422	24	3dxv	267	III
2,2 Dialkylglycine decarboxylase	DA_DC	32,7	2,8	356	432	20	1ds7	272	III
Aminotransferase, Klasse III	bac_AT	32,2	3	337	386	22	3i4j	261	III
7,8-Diamino-Pelargonsäure Aminotransferase	DAPA	31,5	3,1	349	429	20	1dty	274	III
ω-Transaminase	Omega_TA	31	3	358	454	19	4a6t	267	III
L-Lysin-ε-Aminotransferase	Lysine_AT	28,4	2,9	341	436	17	2cjd	300	III
Serin Palmitoyltransferase	SPT	28,2	3,3	333	399	15	2x8u	245	I_II
2-Amino-3-Ketobutyrat Coenzym A Ligase	KBL	27,8	3,2	328	401	18	1fc4	244	I_II
5-Aminolevulinat Synthase	ALAS	27,4	3,4	333	399	13	2bwo	248	I_II
8-Amino-7-Oxonanoat Synthase	KAPA	26,8	3,4	327	383	17	1bs0	236	I_II
Sphingosin-1-phosphat Lyase	SPL	23,3	3,9	318	452	14	3mau	311	Pyridoxal_deC
3-Hydroxykynurein Transaminase	3-HKT	20,4	4,2	306	388	12	2ch1	205	V
Aspartat Aminotransferase	A_AT	20,3	3,7	302	392	14	2z9w	197	V
Ureidoglycin glyoxylat Aminotransferase	UG_AT	19,5	4,3	307	410	10	3nnk	200	V
3-Amino-5-Hydroxybenzoesäure Synthase	AHBA	18,7	3,5	279	384	15	1b9h	188	DegT
Aminotransferase WbpE	WbpE	18,7	2,9	269	359	13	3nu7	185	DegT
GDP-4-keto-6-deoxymannose-3-dehydratase	CoID	18,7	3,3	282	388	11	3gr9	His188	DegT

Tab. 3-9: Ergebnis des paarweisen strukturellen Alignments

Paarweises Alignment von LivB mit PseC, TobS2, BtrR und Aspartat Aminotransferase mit dem DALI Server. Der z-score ist der sogenannte DALI-Z-score, *nalign* entspricht der Anzahl der abgeglichenen Aminosäuren und *nres* gibt die Gesamtzahl der Aminosäuren in der pdb-Datei des entsprechenden Proteins.

Name	Abkürzung	z-score	rmsd	lali	nres	Sequenz-Identität [%]	pdb-code	Lysins im aktiven Zentrum	PFAM PLP_Aminotran Familie:
LivB-PLP-Paromomycin	LivB	-	-	-	408	-	-	231	III
PseC	PseC	20,7	3,1	286	374	13	2fnu	183	DegT
TobS2	TobS2	18,4	3,4	286	414	11	-	198	I_II/DegT
Aspartat Aminotransferase	A_AT	17,7	4	306	402	8	1maq	258	I_II
BtrR	BtrR	17,2	3,6	385	411	8	2c7t	192	DegT

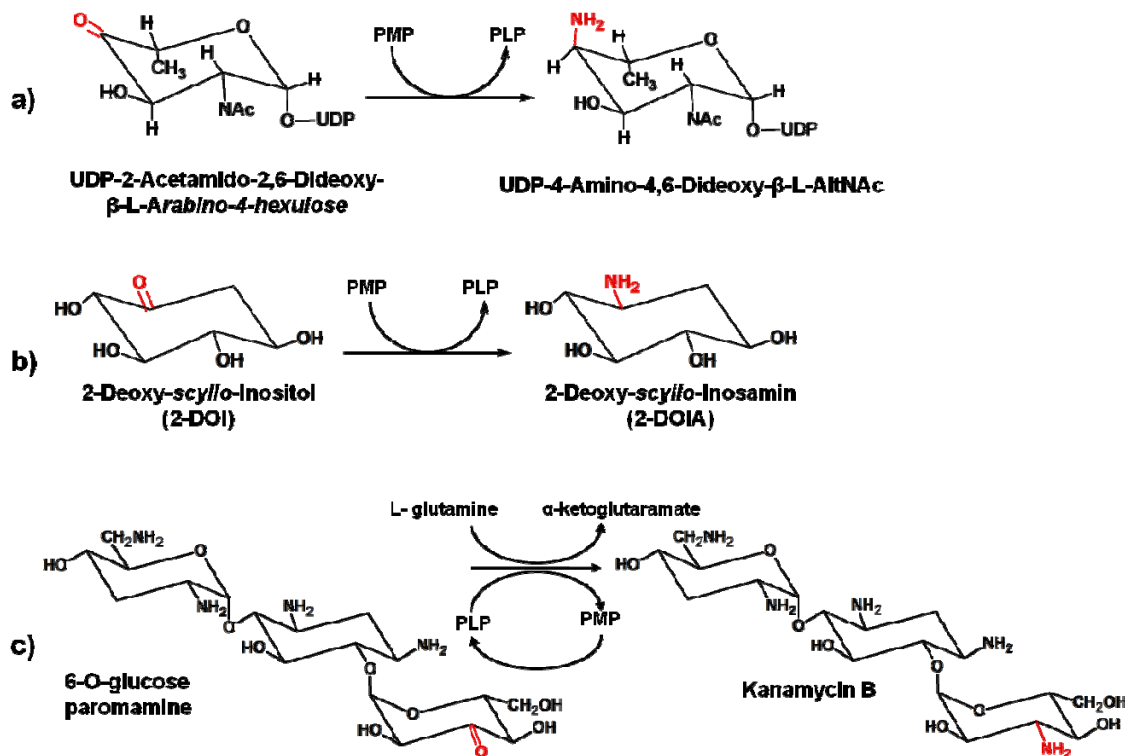


Abb. 3-23: Reaktionsschema für PseC, BtrR und TobS2

Es sind die chemischen Reaktionen für PseC, BtrR und TobS2 dargestellt. In rot sind die während der Reaktion auftretenden Änderungen markiert. a) Reaktion PseC, b) Reaktion von BtrR und c) Reaktion von TobS2.

Wie aus dem strukturellen Alignment der Dali-Suche erkenntlich wird, zeigen die Enzyme eine Sequenzidentität zwischen 24 - 8 % und *rmsd*-Werte zwischen 2,2 - 4,0 Å (Tab. 3-8 und 3-9). Von den ausgewählten Enzymen zeigt die GSAM mit einem *rmsd*-Wert von 2,2 Å und der Sequenzidentität von 21 % die größte Verwandtschaft zu LivB, gefolgt von DAPA (3,1 Å; 20 %), der PseC (3,1 Å; 13 %) sowie der AHBA

(3,5 Å; 15 %). Die beiden Enzyme aus der AGA-Biosynthese, TobS2 (3,4 Å; 11 %) und BtrR (3,6 Å; 8 %), zeigen jedoch zusammen mit ColD (3,3 Å; 11%) und der Aspartat Aminotransferase (4,0 Å; 8 %) die geringste Verwandtschaft zu LivB.

Eine Datenbankrecherche nach sequenziell verwandten Enzymen in ExPasy ergab eine große Anzahl von Proteinen, welche eine höhere Sequenzidentität besitzen, von denen es jedoch noch keine strukturellen Daten gibt (Anhang, Tab. B-1). Ein Sequenzvergleich der 14 sequenziell ähnlichsten Enzyme zeigt, dass die an der Bindung von PLP, des Aminodonors und des Substrates beteiligten Aminosäuren nur schwach oder gar nicht konserviert sind (Anhang, Abb. B-1). Bei einem Vergleich der fünf sequenziell ähnlichsten Enzyme, von denen vier an der Synthese von Aminoglykosid Antibiotika beteiligt sind und die eine Sequenzidentität zwischen 79-54 % aufweisen, stellte sich heraus, dass die an der Bindung beteiligten Aminosäuren jedoch vollständig bzw. stark konserviert sind (Anhang, Abb. B-2).

3.2.5.1 Vergleich der Gesamtstruktur mit anderen Aminotransferasen

Hier soll für zwei verwandte Strukturen, GSAM und TobS2, die Überlagerung der Monomere mit LivB untersucht werden (Abb. 3-24). GSAM wurde wegen der engen Verwandtschaft und TobS2 wegen der Ähnlichkeit der Produkte ausgewählt.

Die Strukturen bestehen aus vielen α -Helices und haben auch das siebensträngige β -Faltblatt und die flankierenden α -Helices der PLP-bindenden Domäne gemeinsam. Untersucht man die beiden Überlagerungen aber genauer, fällt auf, dass die Struktur der GSAM tatsächlich viel besser mit LivB übereinstimmt als TobS2. Bei GSAM stimmt die Position der meisten α -Helices in der N-terminalen und PLP-bindenden Domäne überein (Abb. 3-24a). Größere Abweichungen gibt es hier vor allem in den *loop*-Bereichen und bei einzelnen α -Helices, wie z.B. der N-terminalen Helix. Der Vergleich mit TobS2 zeigt dagegen wesentlich größere Abweichungen. So liegen die α -Helices in anderen Winkeln im Vergleich zu LivB und auch in der PLP-bindenden Domäne zeigen sich größere Abweichungen bezüglich der Position der α -Helices. Auch fallen hier mehr *loop*- und *turn*- Bereiche ins Auge, die an ganz anderer Position liegen. Die verwandtschaftliche Nähe zeigt sich also auch deutlich in der Gesamtstruktur der Monomere.

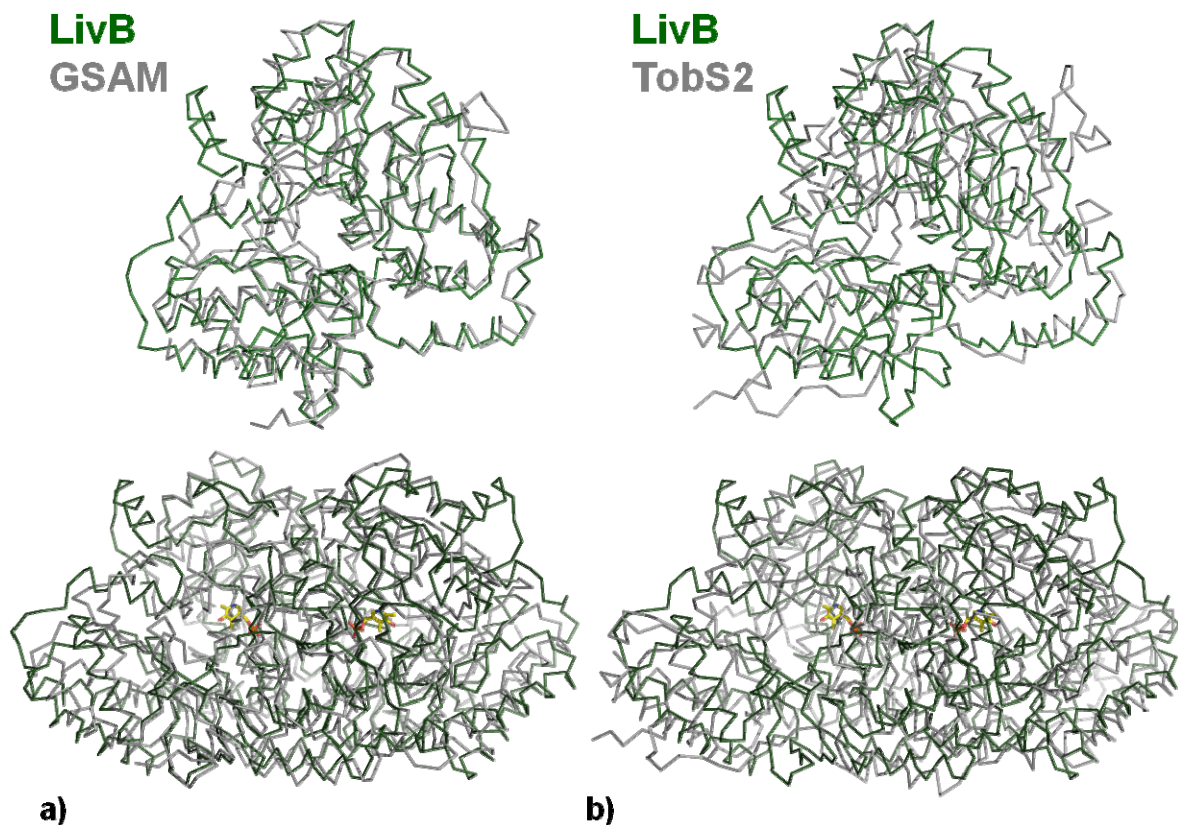


Abb. 3-24: Vergleich von LivB-PLP-Paromomycin, GSAM und TobS2.

a) Alignment von GSAM (4gsa) und LivB (LivB-PLP), b) Alignment von TobS2 (TobS2PLPg) mit LivB (LivB-PLP). LivB ist stets dunkelgrün angefärbt, während GSAM und TobS2 in grau dargestellt sind. In Klammern sind die pdb-Codes bzw. die Namen der Datensätze angeben.

3.2.5.2 Vergleich der PLP-Bindung

Das PLP ist in allen PLP-bindenden Enzymen zur Ausbildung des internen Aldimins an ein Lysin gekoppelt, die einzige bekannte Ausnahme ist hierbei die ColD, bei der an dieser Position ein Histidin vorliegt (Abb. 3-25e). Obwohl alle den gleichen Kofaktor binden, ist nur dieser Lysinrest und ein Aspartat, welches das N1 von PLP koordiniert, bei allen Enzymen konserviert. Beim Vergleich der PLP-Bindung von LivB mit GSAM, DAPA, AHBA, ColD, TobS2 und BtrR (Abb. 3-25 a-g) fällt allerdings auf, dass die Enzyme noch weitere Gemeinsamkeiten haben. So wird bei allen hier dargestellten Proteinen die Phosphatgruppe durch Hauptkettenstickstoffe von einem Glycin und einem darauffolgenden Threonin (Abb. 3-25a, b, d und f) bzw. Serin (Abb. 3-25c, e und g) koordiniert.

Anhand weiterer Merkmale kann man die sieben Enzyme in zwei Gruppen einteilen, wobei die AHBA eine Art Verbindung zwischen beiden Gruppen bilden könnte. So haben LivB, GSAM und DAPA ein Tyrosin, welches in etwa 90° zum Pyridoxalring von PLP angeordnet ist, und die Phosphatgruppe wird zusätzlich durch ein Threonin des zweiten Monomers fixiert (Abb. 3-25 a-c). Bei ColD, TobS2 und BtrR befindet sich an der Position des Tyrosins ein Tryptophan, und die Phosphatgruppe des PLPs wird durch ein Asparagin koordiniert (Abb. 3-25 e-g). Die AHBA hat an dieser Position ebenfalls ein Asparagin und statt eines Tryptophans liegt bei diesem Enzym ein Phenylalanin vor. Außerdem besitzen die ColD, TobS2, BtrR sowie die AHBA einen Serinrest, welcher an der Koordinierung des Phosphates beteiligt ist. Diese Beobachtungen korrelieren auch mit dem Faltungstyp und dem Verwandtschaftsgrad, so gehören LivB, GSAM und DAPA zu Familie III der PLP abhängigen Aminotransferasen (Tab. 3-8), während die anderen Enzyme zur Familie DegT zählen (Tab. 3-8 und 3-9). Die AHBA gehört zwar auch zur DegT Familie, hat aber von den ausgewählten Enzymen nach der DAPA die größten strukturellen Gemeinsamkeiten mit LivB.

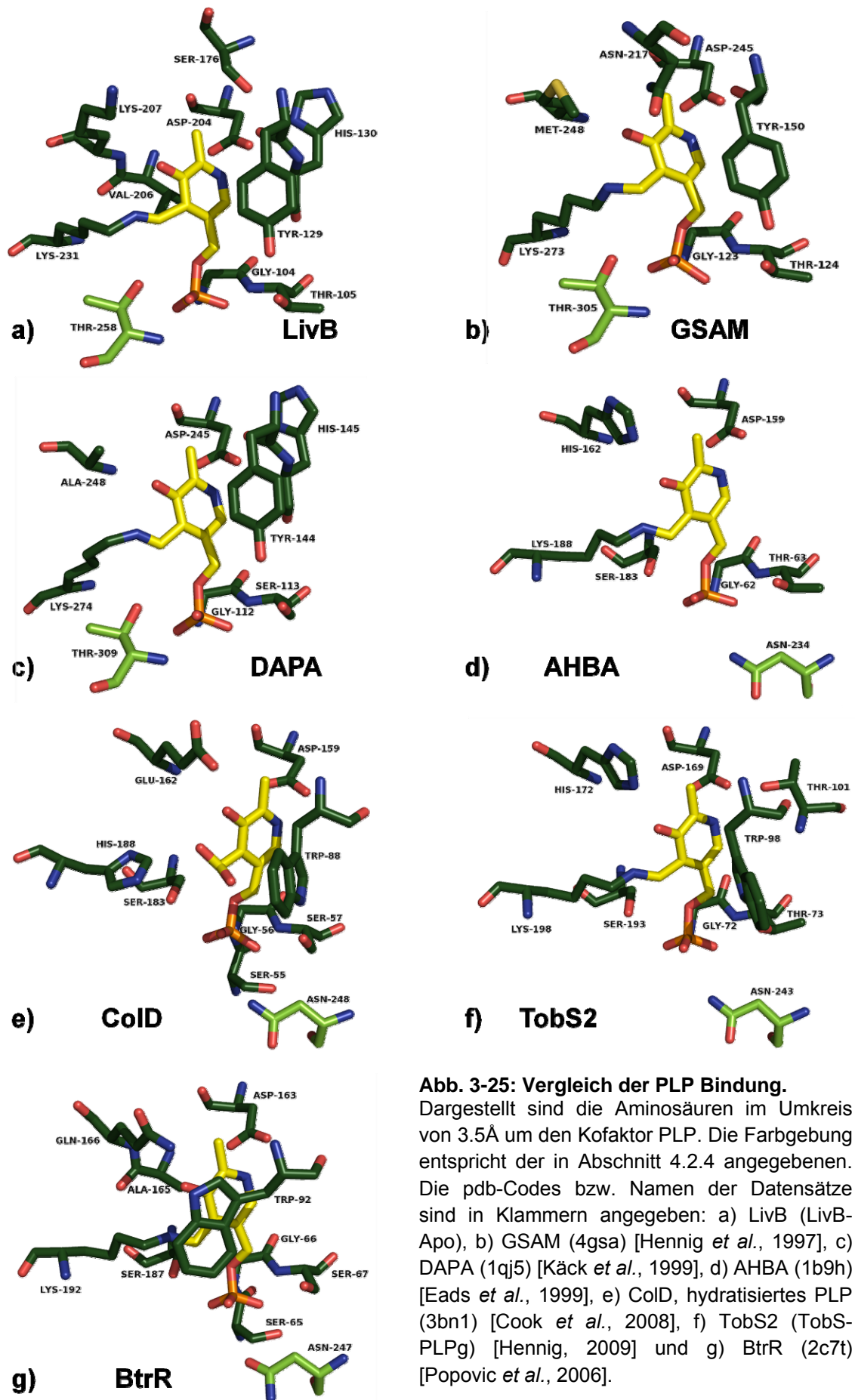


Abb. 3-25: Vergleich der PLP Bindung. Dargestellt sind die Aminosäuren im Umkreis von 3.5Å um den Kofaktor PLP. Die Farbgebung entspricht der in Abschnitt 4.2.4 angegebenen. Die pdb-Codes bzw. Namen der Datensätze sind in Klammern angegeben: a) LivB (LivB-Apo), b) GSAM (4gsa) [Hennig *et al.*, 1997], c) DAPA (1qj5) [Käck *et al.*, 1999], d) AHBA (1b9h) [Eads *et al.*, 1999], e) CoID, hydratisiertes PLP (3bn1) [Cook *et al.*, 2008], f) TobS2 (TobS-PLPg) [Hennig, 2009] und g) BtrR (2c7t) [Popovic *et al.*, 2006].

3.2.5.3 Aminodonorbindung in Aminotransferasen

Von Aminotransferasen werden hauptsächlich L-Glutamat und L-Glutamin bzw. L-Aspartat als Aminodonor genutzt. Leider gibt es nur wenige Kristallstrukturen, in denen der Aminodonor oder das Produkt α -Ketoglutarat vorhanden sind. Für einen Vergleich des aktiven Zentrums in Hinsicht auf die Bindetasche des Aminodonors wurden die Strukturen von TobS2, ColD und der Aspartat Aminotransferase (Asp AT) [Malashkevich *et al.*, 1993] verwendet (Abb. 3-26). In der Struktur von TobS2 konnte die zyklisierte Form des α -Ketoglutarats, die 2-Pyrrolidon-5-Hydroxy-5-Carboxylsäure (PHC) gefunden werden (Abb. 3-26 b). In ColD und der Asp AT liegt jeweils ein Glutamat als externes Aldimin gebunden an das PLP vor (Abb. 3-26a und c).

Bei allen drei Strukturen scheint die Lage des Aminodonors etwas unterhalb des PLPs zu liegen, also ungefähr an der Position, wo auch die Substrate in Abb. 3-26 liegen. Bei TobS2 erfolgt die Koordinierung von PHC über die Seitenkette des Glutamat195 sowie über die Seitenketten des Arginin227 und Arginin245 aus dem zweiten Monomer; außerdem gibt es eine *stacking* Interaktion mit dem Tryptophan98 (Abb. 3-26b). Die Bindung des Donors erfolgt bei der Asp AT ähnlich wie bei TobS2, auch hier wird die Aminosäure L-Glutamat hauptsächlich durch zwei Arginine, Arg292 aus dem Monomer B und Arg386 aus dem Monomer A, sowie dem Tryptophan140 aus Monomer A gebunden (Abb. 3-26c). Bei ColD dagegen erfolgt die Aminodonorbindung hauptsächlich durch die Koordination mit den aromatischen Aminosäuren Tryptophan88, Histidin188 und Phenylalanin185 sowie Histidin215 aus dem zweiten Monomer. Die Seitenkettensauerstoffe des L-Glutamats werden zudem noch vom Arginin250 aus dem zweiten Monomer koordiniert (Abb. 3-26a).

In Abb. 3-26d sind für LivB die Aminosäuren dargestellt, die sich um PHC aus TobS2 befinden. Die Koordination für LivB könnte über die Hauptkettenstickstoffe von Ser256, Phe257 und Thr258 aus dem zweiten Monomer sowie durch die Seitenkette von Arginin48 erfolgen (Abb. 3-26d). In der Struktur von LivB-PLP-Paromomycin ist zumindest an dieser Position eine freie Höhlung, die als Bindungstasche für den Aminodonor dienen könnte.

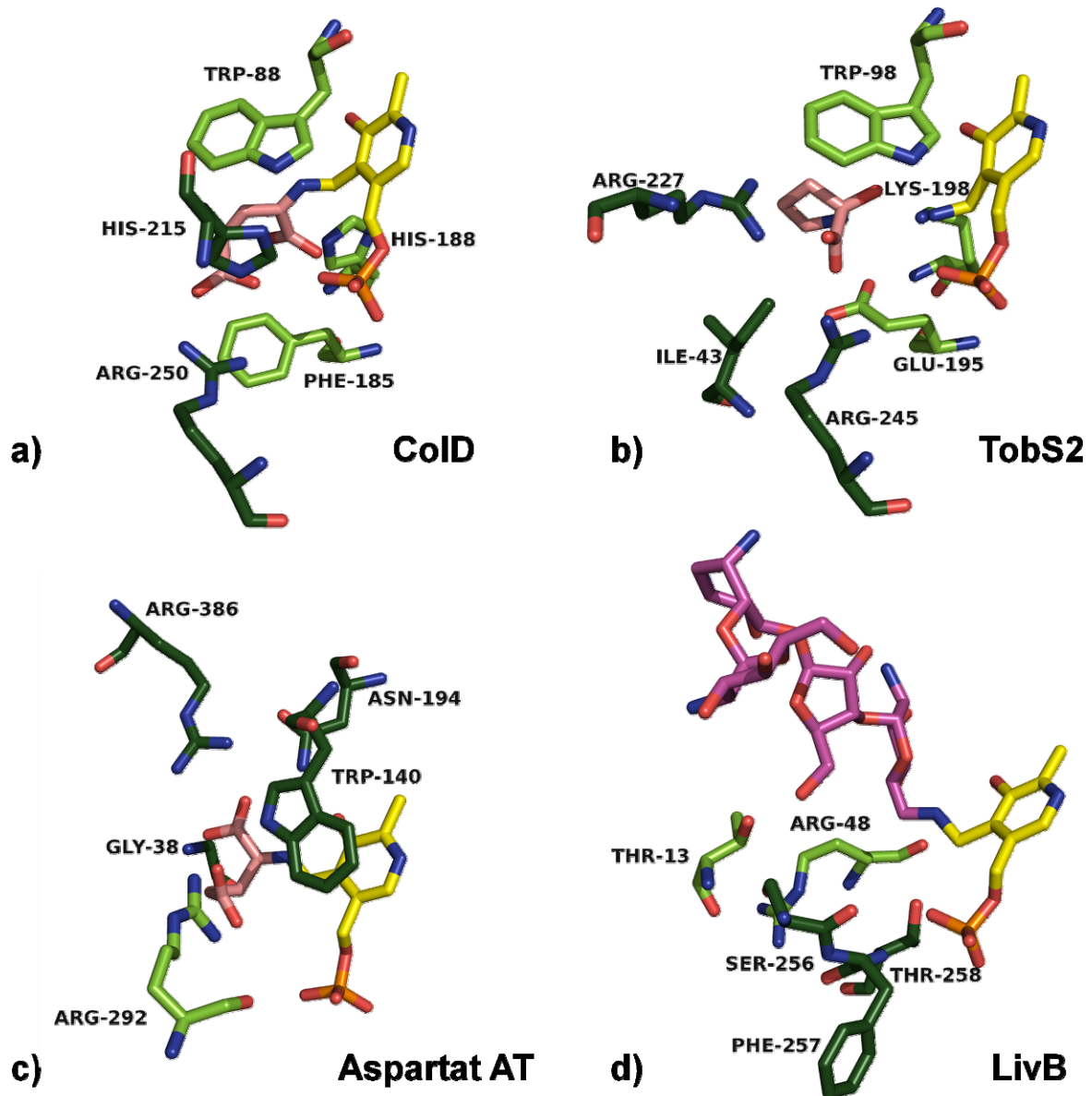


Abb. 3-26: Vergleich der Aminodonor Bindung.

Dargestellt sind die Aminosäuren im Umkreis von 3.5Å um den jeweiligen Aminodonor (Kohelstoffe rosa, *stick*-Darstellung). Die pdb-Codes bzw. Namen der Datensätze und der Namen des Aminodonors sind in Klammern angegeben: a) CoID (2gmu, L-Glu)[Cook *et al.*, 2006], b) TobS2 (TobS-Gln, 2-Pyrrolidon-5-Hydroxy-5-Carboxylsäure) [Hennig, 2009], c) Asp AT (1maq, L-Glu) [Malashkevich *et al.*, 1993], d) LivB (LivB-PLP-Paromomycin).

3.2.5.4 Vergleich der Substratbindung

Während viele PLP-Komplexstrukturen bekannt sind, wuredn noch nicht so viele Kristallstrukturen gelöst, die ein Substrat oder Produkt der Transaminierungsreaktion enthalten. Für den Vergleich der Substratbindung werden die Strukturen von TobS2, PseC [Schoenhofen *et al.*, 2006] und DAPA mit ihrem jeweiligen Substrat und die

GSAM und AHBA mit einem Substratanalogon, dem Inhibitor Gabaculin, verwendet (Abb. 3-27). In TobS2 liegt das Aminoglykosid-Antibiotikum Tobramycin als externes Aldimin gebunden an PLP vor (Abb. 3-27f). In der Struktur der PseC wurde ebenfalls ein externes Aldimin zwischen PLP und Uridin-Diphosphat-N-Acetylglucosamin gefunden (Abb. 3-27e). Bei der DAPA befindet sich das Substrat 7-Keto-8-Aminopelargonsäure im aktiven Zentrum, allerdings liegt das PLP hier noch als internes Aldimin mit der kovalenten Bindung an den Lysinrest vor (Abb. 3-27c).

Bei allen Strukturen fällt auf, dass LivB das einzige Enzym dieser Gruppe ist, bei dem sich das Substrat im Bezug zum Kofaktor PLP nach oben orientiert (Abb. 3-27a). Bei allen anderen scheint die Orientierung der Substratbindetasche seitlich zum Kofaktor zu liegen (Abb. 3-27 b-f). Bei einem Vergleich der an der Bindung beteiligten Aminosäuren zeigte sich, dass bei GSAM, DAPA, AHBA und PseC aromatische Aminosäuren wie Tyrosin oder Tryptophan an der Bindung beteiligt sind. So haben GSAM und DAPA ein Tryptophan in der Nähe des Substrates (Abb. 3-27 b und c), während sich in der AHBA und PseC ein Tyrosinrest in räumlicher Nähe zum Substrat befindet (Abb. 3-27d und e). In LivB gibt es an der ungefähren Position der aromatischen Aminosäuren ebenfalls ein Tyrosin, Tyr341. In TobS2 hingegen scheint die Bindung des Substrates nicht durch aromatische Aminosäuren unterstützt zu werden. Im Umfeld des Substrats Tobramycin befindet sich in diesem Bereich lediglich ein Glutamat (Abb. 3-27f). Zwar lassen sich von den Substratbindetaschen der untersuchten Enzyme keine eindeutigen Aussagen über konservierte Aminosäuren machen, da die von den Enzymen verwendeten Substrate sehr unterschiedlich sind, jedoch fällt auf, dass bei allen Enzymen aromatische Aminosäuren eine Rolle bei der Koordinierung der Substrate spielen. Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die Substratbindung innerhalb der untersuchten Enzyme nicht konserviert ist, da die genutzten Substrate in ihrer Form und Größe zu sehr variieren, um eine gemeinsame Bindungsweise zu zulassen.

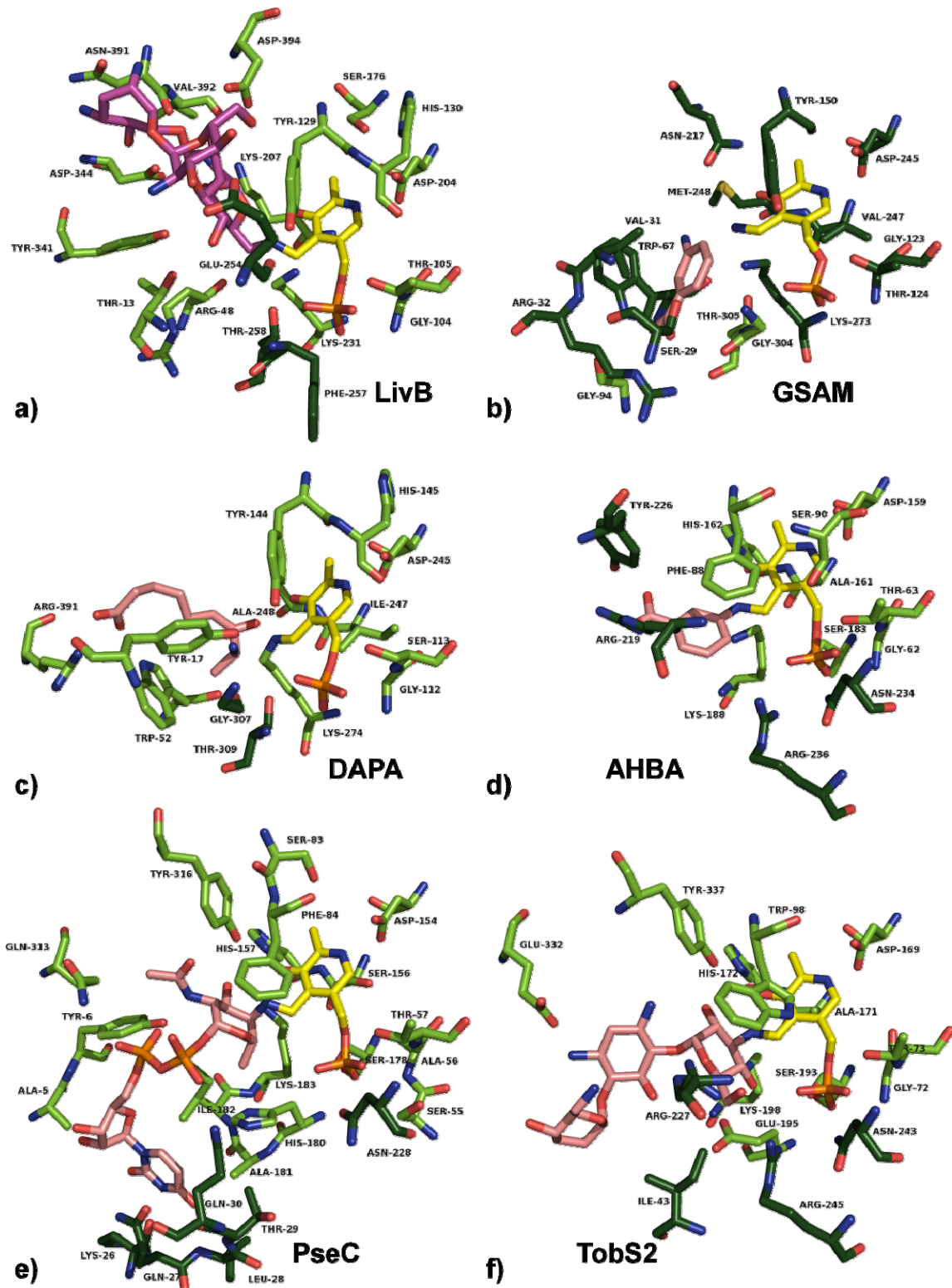


Abb. 3-27: Vergleich der Substratbindung.

Dargestellt sind die Aminosäuren im Umkreis von 3.5Å um das jeweilige Substrat/Produkt bzw. Substratanalogon. Die pdb-Codes bzw. Namen der Datensätze und die Namen der Substrate sind in Klammern angegeben: a) LivB (LivB-PLP-Paromomycin, Paromomycin) [Hennig *et al.*, 1997], b) GSAM (3gsb, Gabculin) [Hennig *et al.*, 1997], c) DAPA (1qj3, 7-Keto-8-Aminopelargonsäure) [Käck *et al.*, 1999], d) AHBA (1b9i, Gabaculin) [Eads *et al.*, 1999], e) PseC (2fnu, Uridin-Diphosphat-N-Acetylglucosamin) [Schoenhofen *et al.*, 2006] und f) TobS2 (TobS-PLPTM) [Hennig, 2009]. Die Produkte sind in *stick*-Form dargestellt, a) Paromomycin in violett, b-f) Ligand in rosa.

3.2.5.5 Abschließende Zusammenfassung

Die Kristallstruktur von LivB repräsentiert die erste Struktur einer Aminotransferase der Gruppe B der Aminoglykosid-Antibiotika. LivB zeigt jedoch eine Struktur, deren Faltung weniger zu den aus der AGA-Biosynthese stammenden Aminotransferasen BtrR und TobS2 passt, sondern eher zu Aminotransferasen und -mutasen wie GSAM, die allerdings sehr viel kleinere Substrate verarbeiten. Für die GSAM sind Strukturen aus zwei Organismen, *Synechococcus elongatus* und *Thermosynechococcus elongatus*, gelöst worden. Dabei zeigte die Kristallstruktur aus *Synechococcus elongatus* ein asymmetrisches Dimer, wobei in einem Monomer PLP gebunden war und im anderen PMP [Hennig *et al.*, 1997], während sich das Dimer der Struktur aus *Thermosynechococcus elongatus* als symmetrisches Dimer herausstellte [Schulze *et al.*, 2006]. Alle von LivB gelösten Strukturen stellen symmetrische Dimere dar, auch wenn in der LivB-PLP-Paromomycin Struktur die Elektronendichte für das Produkt Paromomycin in beiden Monomeren unterschiedlich gut definiert ist.

Mit den vorliegenden Strukturen von LivB ist es zudem gelungen, zwei Schritte des Reaktionsmechanismus (Abb. 3-29) näher zu beleuchten. Dabei handelt es sich zum einen um das interne Aldimin, der kovalenten Verknüpfung von PLP an die Aminosäure Lysin231 (Abb. 3-28a). Durch Soaking mit dem Produkt der Reaktion, Paromomycin, konnte zudem eine Kristallstruktur des externen Aldimin, bestehend aus PLP und Paromomycin erhalten werden (Abb. 3-28b). Zu Beginn der Reaktion liegt der Kofaktor als internes Aldimin gebunden an der ζ -Aminogruppe des Lysinrestes 231 im LivB Holoenzym vor (Abb. 3-28a). Der Aminodonor L-Glutamat reagiert mit dem Kofaktor PLP zu einem Ketimin, welcher unter Freisetzung von α -Ketoglutarat zu Pyridoxin-5'-Phosphat (PMP) umgesetzt wird. Im zweiten Teil der Reaktion bindet das PMP über eine Schiff'sche Base Bindung an das Substrat 6'''-Oxoparomomycin, wobei das externes Aldimin (Abb. 3-28b) ausgebildet wird. Anschließend wird das Produkt Paromomycin abgespalten und dabei der Kofaktor PLP regeneriert, um für weitere Reaktionen bereit zu stehen (Abb. 3-29).

Durch die LivB-Kristallstruktur mit dem externen Aldimin konnte gezeigt werden, dass die Koordinierung des Substrates von LivB hauptsächlich über die Zuckerringe drei und vier des Aminoglykosid-Antibiotikums geschieht. Dies spricht dafür, dass auch andere Substrate von LivB umgesetzt werden könnten, die z.B. aus weniger oder mehr Ringen bestehen.

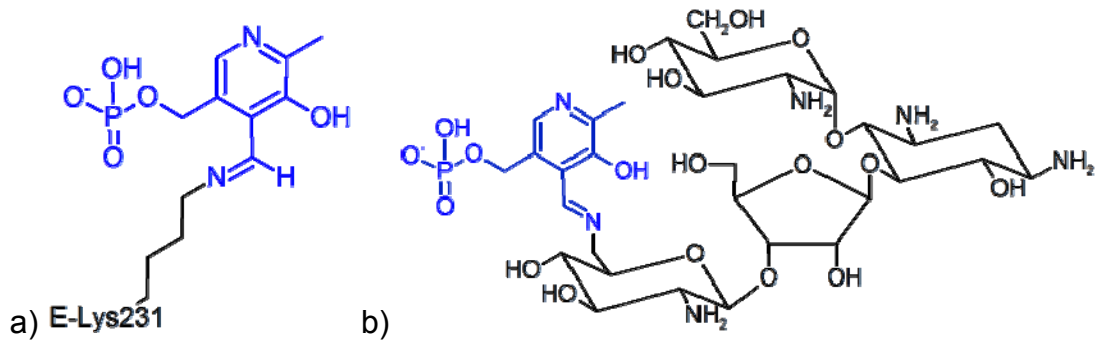


Abb. 3-28: Internes und externes Aldimin von LivB.

a) internes Aldimin, der Kofaktor PLP ist über eine Schiff'sche Base Bindung mit dem Lysinrest 231 verbunden, b) externes Aldimin, die Schiff'sche Base Bindung besteht zwischen dem Kofaktor PLP und dem Substrat 6''-Oxoparomomycin. PLP ist blau dargestellt.

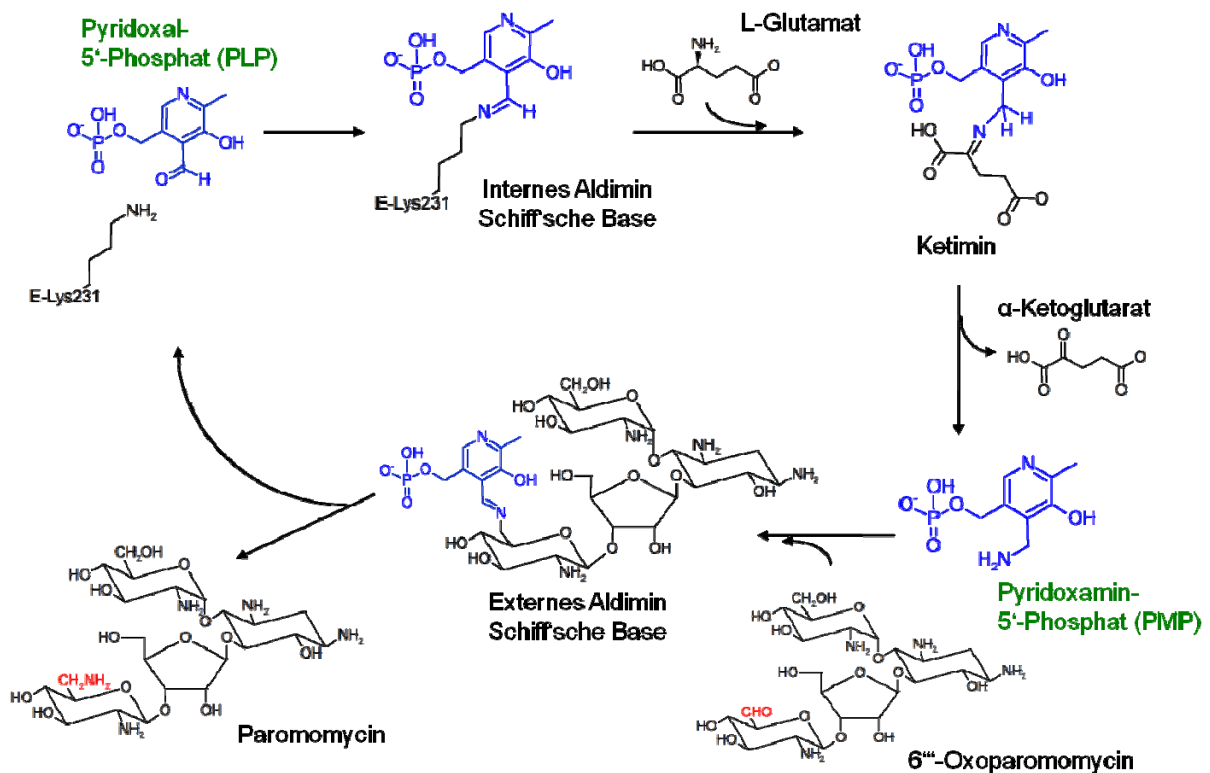


Abb. 3-29: Reaktionsschema der Transaminierungsreaktion von LivB.

In blau ist der Kofaktor PLP bzw. PMP dargestellt, die 6'' Position ist rot markiert.

Leider ist es bisher nicht gelungen, eine Struktur mit dem Aminodonor L-Glutamat aufzuklären, weshalb die genaue Position der Aminodonor-Bindetasche im aktiven Zentrum von LivB nur vermutet werden kann. Möglicherweise kann durch weitere Kristallisationsversuche eine Pufferbedingung gefunden werden, bei der sich der Aminodonor L-Glutamat in höherer Konzentration als 50 mM lösen lässt.

Biochemische Daten zeigten ebenfalls, dass die Substratspezifität nicht bei den B-Enzymen (LivB, NeoB) des AGA-Clusters liegt, sondern die Dehydratasen LivQ und NeoQ spezifisch zwischen den Substraten unterscheiden können [Clausnitzer, 2010; Clausnitzer *et al.*, 2011]. Für ein besseres Verständnis der Substratspezifität von LivB wäre jedoch die Struktur von NeoB sehr interessant, vor allem in Kombination mit dem Produkt Neomycin C. Auch Versuche LivB mit dem Substrat von NeoB, 6''-Oxoneomycin C, oder kürzeren Substraten zu kristallisieren, könnte weiteren Aufschluss darüber geben, welche Aminosäuren spezifisch für die Bindung von 6''-Oxoparomomycin sind.

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Geräte

Zentrifugen:

Tischzentrifuge 1-14 (Sartorius), Biofuge pico (Heraeus), Kühlzentrifuge Universal 32 R (Hettich), Kühlzentrifuge 2-16K (Sigma Zentrifugen), Kühlzentrifuge 5804-R (Eppendorf), Zentrifuge Avanti J-20, J-25 und J-30 (Beckman).

Schüttler, Mixer und Inkubatoren:

Polymax 1040 (Heidolph), Vortex Genie 2 (Scientific Industries), Thermomixer compact (Eppendorf), Thermomixer comfort (Eppendorf), Inkubator TH30 und Schüttler SM30 (Edmund Bühler).

Spektrometer:

UV/Vis Spektrometer Ultrospec 4000 (Pharmacia), UV/Vis Spektrometer Ultrospec 3000 (GE Healthcare), UV/Vis V-630 (Jasco), Spektralanalysator J-810 (Jasco), FluoroMax – 3 (Jobin Yvon SPEX, Horiba).

Elektrophoreseapparaturen:

Gelelektrophoreseapparatur Hoefer SE 260 (Amersham), Dual Gel Caster Hoefer (Amersham), Electrophoresis Power Supply EPS 300 (Pharmacia), Horizontalelektrophorese Easy cast Modell B1A (OWL), Maxi Power Supply E835 (Consort).

Chromatographische Geräte:

ÄKTA FPLC (Pharmacia) mit Fraktionskollektor Frac-950, ÄKTApurifier bzw. ÄKTAexplorer mit Fraktionskollektor Frac-900 (Pharmacia), Pumpe P-1 (Pharmacia).

Chromatographiesäulen und -material:

Superdex200 HiLoad *prep grade* 16/60 (Amersham Biosciences, GE), Superdex200 HiLoad *prep grade* 26/60 (Amersham Biosciences, GE), Superdex75 HiLoad *prep grade* 16/120 (Amersham Biosciences, GE), Superdex75 HiLoad *prep grade* 26/120 (Amersham Biosciences, GE), HisTrap™ HP Säule 1 ml bzw. 5 ml (Amersham Biosciences, GE), Ni-Sepharose™ High Performance (GE), StrepTactin® Superflow® (IBA).

Geräte zur Strukturaufklärung:

Pipettierroboter Cartesian Honeybee X8 + Cartesian Software (Zinsser Analytic), Röntgendrehanodengenerator Rigaku Micromax 007 (Rigaku), Detektor Saturn 944+ CCD (Rigaku) oder Rigaku R-axis IV++ (Rigaku), Imagesystem Desktop Minstrel UV (Rigaku), Mikroskop MSV266 (Leica).

Sonstige Geräte:

Gaulin-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 (APV), Autoklav Varioklav (H und P Labortechnik), Laminarflowbox HERA safe (Heraeus Instruments), pH Meter pH 526 (WTW), Membranpumpe ME2 (Vacuubrand), Ultraschallprozessor UP 200 S (Hielscher Ultrasonics), Analytical plus Feinwaage (OHAUS), BP 4100 S (Sartorius), Rührer CB161 und CB162 (BIBBY, Barloworld scientific), Pipetten Eppendorf Research (0,5-10, 2-20, 10-100, 20-200, 100-1000, 500-5000 μ l) (Eppendorf), Rotilabo[®]-Spritzenfilter 0,22 μ m und 0,45 μ m (Roth), Zentrifugen Filtereinheiten Amicon Ultra-4 und -15 (3, 5, 10 und 30 MWCO) (Millipore), Dialysemembranen Spectra/Por[®] 1-4 (Roth).

verwendete Programme:

Microsoft Office (Word, Excel, Powerpoint), Sigma Plot, CorelDraw, CorelDraw Photopaint, Generunner, ClustalW [Larkin *et al.*, 2007], ClustalO [Sievers *et al.*, 2011], Cartesian Software (Zinsser Analytic), CrystalClear software (Rigaku), HKL2000 [Otwinowski *et al.*, 1997], XDS [Kabsch, 2010], CCP4 software package (PHASER [McCoy *et al.*, 2007], Refmac5 [Murshudov *et al.*, 1999], PROCHECK [Laskowski *et al.*, 1993]), SHELX C/D/E [Sheldrick, 2010], ARP/wARP [Langer *et al.*, 2008], PHENIX [Adams *et al.*, 2010], COOT [Emsley *et al.*, 2004], Pymol [Delano *et al.*, 2005], VMD [Humphrey *et al.*, 1996], MolProbity [Chen *et al.*, 2010].

4.1.2 Chemikalien

Tab. 4-1: Liste der verwendeten Chemikalien

Produkt	Hersteller
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Merck
4-Hydroxyazobenzene-2-Carboxyl-Säure (HABA)	Sigma
5-Amino-2,4,6-triiod-Isophthalsäure (I3C)	Jena Bioscience
Aceton	Roth
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma
Agar-Agar	Roth
Agarose	Roth
Aktivkohle	Roth
Ammoniumperoxosulfat (APS)	Roth
Ammoniumsulfat	Roth
Ampicillin	Sigma/Roth
Bradford Reagenz	BioRad
Bromphenolblau	Roth
Calciumacetat	Merck
Calciumchlorid	Merck
CASO Boullion	Roth
Chloramphenicol	Roth
Coenzym A	Sigma
Coomassie Brilliantblau G250	Merck
D-Desthiobiotin	IBA
D-Glukose	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka
Dithiotreitol (DTT)	Roth
Eisensulfat	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol	Chemikalienausgabe
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Formaldehyd	Roth
Glycerin	Chemikalienausgabe
Glycin	Roth
Guanidin Hydrochlorid	NiGu Chemie GmbH
Harnstoff	Roth
Hefeextrakt	Roth
Imidazol	Merck
Isopropanol	Aldrich
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth/Sigma
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kaliumiodid	Roth
Kaliumsulfat	Roth
Kaliumtetrachloroplatinat	Merck
Kanamycin	Sigma
L-Glutamin	Roth
L-Glutaminsäure	Roth

Tab. 4-1: Liste der verwendeten Chemikalien (Fortsetzung)

Produkt	Hersteller
Magermilchpulver	Applichem
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Roth
Maleinsäure	Roth
Manganchlorid	Roth
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth
N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure (TES)	Roth
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydroxid	Chemikalienausgabe
Natriumthiosulfat	Roth
Nickel(II)sulfat	Roth
Paromomycin	Sigma
p-Cumarsäure	Merck
Piperanzin-N,N-bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES)	Roth
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma
Pyridoxin Hydrochlorid	Roth
Quecksilber(II)-chlorid	Merck
Rotiphorese (30 % Acrylamid / 0.8 % N,N'-Methylenbisacrylamid)	Roth
Saccharose	Roth
Salzsäure (HCl)	Riedel de Häen
Silbernitrat	Roth
Streptomycin	Roth
Tetracyclin	Roth
Thiostrepton	Novagen
Trichloressigsäure (TCA)	Fluka
Trifluoressigsäure (TFA)	Roth
Tris(2-carboxyethyl)phosphine Hydrochlorid (TCEP)	Fluka
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth
Trypton	Roth
Tween20	Roth
Zinksulfat	Roth
β-Mercaptoethanol	Merck

Alle verwendeten Chemikalien hatten, wenn nicht anderes erwähnt, den höchsten Reinheitsgrad von (p.a.).

4.1.3 Medien, Puffer und Lösungen

4.1.3.1 Medien und Antibiotika

Medien:

LB – Medium	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) NaCl
SOC – Medium	2 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glucose
TSB – Medium	3 % (w/v) CASO Bouillon
TSB/PEG8000 - Medium	3 % (w/v) Trypton Soja Broth, 5 % (w/v) PEG 8000 nach dem Autoklavieren: 0,5 % (w/v) Glycin, 5 mM MgCl ₂
KA – Agar	5 % (w/v) Kartoffelbreipulver, 2 % (w/v) Agar, Leitungswasser
LB – Agar	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt; 1 % (w/v) NaCl; 1 % (w/v) Agar-Agar
SPMR - Agar + CaCl ₂	10,3 % (w/v) Saccharose, 0,5 % (w/v) D-Glukose, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) MgCl ₂ , 2 % (v/v) 1M TES Lösung pH 7.6, 0,2 % (v/v) Spurenelement-Lösung, 2 % (w/v) Agar nach dem Autoklavieren: 0,2 % (v/v) CaCl ₂ (5 M)

Der gewünschte pH-Wert wurde mit NaOH oder HCl vor dem Autoklavieren der Medien eingestellt. Alle Medien wurden bei 120 °C dampfsterilisiert. Nichttitzestabile Lösungen wurden mit einem Spritzenvorsatz (Rotilabo®-Spritzenfilter, Roth, 0,22µm) steril filtriert und anschließend dazugegeben.

Antibiotika-Stammlösungen:

Ampicillin	100 mg/ml in ddH ₂ O
Chloramphenicol	50 mg/ml in EtOH
Kanamycin	50 mg/ml in ddH ₂ O
Streptomycin	20 mg/ml in ddH ₂ O
Tetracyclin	12,5 mg/ml in EtOH oder MeOH
Thiostrepton	25 mg/ml in DMSO

Die entsprechenden Antibiotika wurden dem Medium, wenn nicht anders angegeben, im Verhältnis 1:1000 zugegeben.

IPTG-Lösung:

IPTG-Stammlösung 1 M in sterilem ddH₂O

Pyridoxin Hydrochlorid:

Pyridoxin-Hydrochlorid-Lösung 10 mg/ml in sterilem ddH₂O

4.1.3.2 Puffer

Gelelektrophoresepuffer:

SDS-PAGE:

Sammelgel-Puffer 0,5 M Tris-HCl ; pH 6,8
Trenngel-Puffer 1,5 M Tris-HCl ; pH 8,8
10x Lämmli-Laufpuffer 25 mM TrisHCl; 200 mM Glycin;
0,3 mM SDS; pH 8,9
3x Probenpuffer für SDS-Acrylamid-Gele 1,75 ml Sammelgelpuffer; 5 ml 10 % SDS; 1,5 ml
Glycerin; 1,25 ml Bromphenolblau; 0,5 ml β-
Mercaptoethanol
Probenpuffer für nicht-reduzierende
SDS-Acrylamid-Gele 1,75 ml Sammelgelpuffer; 5 ml 10 % SDS; 1,5 ml
Glycerin; 1,25 ml Bromphenolblau

Horizontalelektrophorese:

50x TAE Puffer 2 M TrisHCl; 1 M Essigsäure; 0,1 M EDTA; pH 8,3
5x Probenpuffer für Agarose-Gele 50 % (w/v) Glycerin; 0,25 % (v/v) Bromphenolblau
in 1x TAE Puffer

Sonstige Puffer:

Puffer für Aktivitätstest 4CL1 200 mM TrisHCl; pH 8
Resuspensionspuffer 1 M NaCl; 50 mM TrisHCl; 10 mM β-Mercaptoethanol; pH 8
Puffer für Protoplastentransformation:
Puffer P 300 mM Saccharose; 1,45 mM K₂SO₄; 10 mM MgCl₂; 0,2 % (v/v)
Spurenelement-Lösung; 0,4 mM KH₂PO₄; 250 mM CaCl₂ x 2 H₂O; 25
mM TES pH 7.2 (NaOH)
Puffer T 75 mM Saccharose; 1,45 mM K₂SO₄; 0,2 % (v/v) Spurenelement-
Lösung; 100mM CaCl₂; 5 % (v/v) Puffer TM
Puffer TM 1 M Tris pH 8 (Maleinsäure), steril filtrieren

4.1.3.3 Lösungen

Kompetente Zellen / Stammkulturen

0,1 M CaCl₂
 50 % (v/v) Glycerin

Spurenelement-Lösung:

3,5 mM ZnSO₄
 3,5 mM FeSO₄
 5 mM MnCl₂
 7 mM CaCl₂ 2 H₂O

Gelelektrophorese:

SDS-PAGE nach Lämmli [Laemmli, 1970]

Zur Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen wurden folgende Lösungen verwendet:

0,5 % SDS-Lösung (Stammlösung 10 % (w/v))
 10 % APS
 Rotiphorese (30 % Acrylamid / 0.8 % N,N'-Methylenbisacrylamid)
 TEMED

Tab. 4-2: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngeles (Angaben für 4 SDS-Acrylamid-Gele)

Acrylamidkonzentration	5 %	10 %	12,5 %	15 %
Rotiphorese in ml	1,33	8,0	10,0	12,0
0,5 M TrisHCl; pH 6,8 in ml	1,6	-	-	-
1,88 M TrisHCl; pH 8,8 in ml	-	4,8	4,8	4,8
ddH ₂ O in ml	3,47	6,4	4,4	3,4
0,5 % SDS Lösung in ml	1,6	4,8	4,8	4,8
TEMED in µl	8,0	20	20	20
10 % APS-Lösung in µl	40	120	120	120

Lösungen zum Färben von SDS-Gelen mit Coomassie-Blau (nach Fairbanks [Fairbanks *et al.*, 1971])

Fairbanks I: 25 % (v/v) 2-Propanol, 10 % (v/v) Essigsäure,
0,05 % (w/v) Brillant Blau G 250

Fairbanks II: 10 % (v/v) Essigsäure

Lösung zum Trocknen von SDS-Gelen: 5 % Glycerin in ddH₂O

Agarose-Gelelektrophorese:

Ethidiumbromid-Lösung:

Stammlösung: 1 % (10 mg/ml)

Endkonzentration von Ethidiumbromid im Agarose-Gel: 0,001 %.

4.1.4 Kits

QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
GeneJET™ Plasmid MiniPrep Kit	Fermentas
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen

Kristallisation-Kits:

Factorial solutions 1-96	AG Stubbs
Crystal Screen 1 + 2	Hampton Research
Crystallization Basic Kit for Proteins	Sigma
Crystallization Extension Kit for Proteins	Sigma
Crystallization Low Ionic Kit for Proteins	Sigma
Crystallization Cryo Kit for Proteins	Sigma
Crystallization Basic Kit for Membrane Proteins	Sigma
JBScreen Bulk 1-10	Jena Bioscience GmbH

4.1.5 Bakterienstämme und Plasmide

Zelllinien:

Tab. 4-3: Liste der verwendeten *E. coli* und *S. lividans* Zelllinien

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle/Referenz
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Novagen
<i>E. coli</i> BL21(DE3) Tuner	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B(r_B⁻, m_B⁻) gal, dcm, lacY1</i> (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pRARE (Cam ^R)	Novagen
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3) pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS pRARE (Cam ^R)	Novagen
<i>E. coli</i> SG13009 (pREP4)	Nal ^S Str ^S Rif ^S Thi ⁻ Lac ⁻ Ara ⁺ Gal ⁺ Mtl ⁻ F ⁻ RecA ⁺ Uvr ⁺ Lon ⁺ pREP4 (Km ^R)	Qiagen [Gottesman <i>et al.</i> , 1981]
<i>E. coli</i> Top10	F- <i>mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZM15 lacX74 recA1 ara139 (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogene
<i>E. coli</i> XL1 blue	<i>recA1, endA1, gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lac^f ΔM15 Tn10 (tet^r)]</i>	Stratagene
<i>S. lividans</i> 66 TK24	SLP2 ⁻ , SLP3 ⁻	Hopwood <i>et al.</i> , 1985 [Hopwood, 1985]
<i>S. lividans</i> 66 TK23	spc-1 SLP2 ⁻ SLP3 ⁻	Kieser <i>et al.</i> 2000 [Kieser, 2000]
<i>S. lividans</i> 66 TK64	pro-2 str-6 SLP2 ⁻ SLP3 ⁻	Kieser <i>et al.</i> 2000 [Kieser, 2000]

Vektoren:

Tab. 4-4: Liste der verwendeten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Bezugsquelle
pET11a	T7-Promoter, Ampicillin-Resistenz	Novagen
pET15b	N-terminal 6x His- <i>tag</i> , Thrombin- Schnittstelle, T7-Promoter, Ampicillin- Resistenz	Novagen
pET15bTEV	Vektor pET15b + TEV Schnittstelle zwischen His- <i>tag</i> und MCS	--

pQE30	N-terminal 6x His- <i>tag</i> , T5-promoter/lac-Operator, Ampicillin-Resistenz	Qiagen
pUWLHis	<i>bla tsr P_{ermE} ColE1-ori pIJ101-ori</i>	Wehmeier, unveröffentlicht
pUWL201PW	<i>bla tsr P_{ermE} ColE1-ori pIJ101-ori</i>	Doumith <i>et al.</i> 2000 [Doumith <i>et al.</i> , 2000]

4.1.6 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Eurofins (Ebersberg) bzw. der Firma MetaBion (Martinsried) synthetisiert. Die lyophilisierten Primer wurden zunächst in sterilem Wasser zu einer Konzentration von 100 µM gelöst und vor der Verwendung 1:10 verdünnt.

Tab. 4-5: Liste der verwendeten Primer

Primer	Sequenz 5' – 3'
YRH_hinge_C_for	GGA ATT CCA TAT GTC GAG CCA TCC GCA GTT TGA AAA ATA CCG GCA TAA GGA ATT GAT CAA A
YRH_hinge_C2_for	GGA ATT CCA TAT GTC GAG CCA TCC GCA GTT TGA AAA ATA CCG GCA TGC AGA ATT GAT CAA ATA CA
YRH_hinge_C_rev	CCC GGA TCC TAA TTG GCC ACC ACC
YRH_hinge_N_for	GGA ATT CCA TAT GGC ACC TTC TCC ACA AGA A
YRH_hinge_N_rev	GCG GGA TCC TTA TTT TTC AAA CTG CGG ATG ACT CCA AGC ATG CCG GTA AAC AAT GAA
YRHA_hinge_for	TTC ATT GTT TAT CGG CAT GCA GAA TTG ATC AAA TAC AAA
YRHA_hinge_rev	TTT GTA TTT GAT CAA TTC TGC ATG CCG ATA AAC AAT GAA
YRH_loop_for	GCA TTT GTT GTA AGG TAC CGT CAT TCT GAG ATA GCC GAG
YRH_loop_rev	CTC GGC TAT CTC AGA ATG ACG GTA CCT TAC AAC AAA TGC
C_YRH_loop_for	GGA ATT CCA TAT GTG GAG CCA TCC GCA GTT TGA AAA ATA CCG TCA TTC TGA GAT AGC CGA G
N_YRH_loop_rev	GCC GGA TCC TTA TTT TTC AAA CTG CGG ATG ACT CCA AGC ATG CCG GTA CCT TAC AAC AAA TGC

4.1.7 Enzyme und Standards

Restriktionsenzyme:

<i>Bam</i> H I	New England Biolabs
<i>Dpn</i> I	New England Biolabs
<i>Hind</i> III	New England Biolabs
<i>Kpn</i> I	New England Biolabs
<i>Nde</i> I	New England Biolabs

Polymerasen:

Taq DNA-Polymerase

New England Biolabs

Pfu Turbo DNA-Polymerase

Stratagene/Fermentas

Ligase:

T4 DNA Ligase

New England Biolabs

Alkalische Phosphatase:

CIP

New England Biolabs

Sonstiges:

Avidin

IBA

BSA

New England Biolabs/Sigma

Lysozym

Sigma/Roth

Thrombin

Merck/Sigma

SDS PAGE Standards, broad range

Biorad

100 bp DNA ladder

New England Biolabs

1 kB DNA ladder

New England Biolabs

dNTPs Mix 100 mM (pro dNTP 25 mM)

Stratagene/Invitrogen

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Herstellung einer Sporenkultur für *Streptomyces lividans*

Eine Kolonie TK 24 wurde auf einer KA-Agarplatte ausgestrichen und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Platte weitere 2-3 Tage bei RT inkubiert, bis sich Sporen bildeten. Auf die Agarplatte wurden 1,5 ml steriles Wasser pipettiert und die Sporen mit einem sterilem Wattestäbchen vorsichtig aus dem Myzel gelöst. Die Lösung wurde dann durch eine sterile mit Watte gefüllte Spritze filtriert und für 20 min bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 500 - 1000 µl einer 20 % (v/v) Glycerinlösung resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

4.2.1.2 Herstellung chemisch-kompetenter Zellen

Für *E. coli*:

Aus einer Einzelkolonie wurde über Nacht bei 37 °C eine 4 ml Vorkultur herangezogen. Die Hauptkultur (50 ml) wurde mit den entsprechenden Antibiotika versetzt und mit der Übernachtskultur angeimpft (1:100). Die Kultur wurde schüttelnd bei 37 °C inkubiert bis eine optische Dichte OD₆₀₀ von 0,4-0,6 erreicht wurde. Nach einer Inkubationsphase auf Eis (10 min), wurden die Zellen anschließend durch Zentrifugation (15 min, 5000 g, 4 °C) geerntet, in 40 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 5 min auf Eis gelagert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 min, 5000 g, 4 °C) wurde das Zellpellet in 2 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 2 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden nun mit 2 ml 50 % Glycerin gemischt, zu 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für *Streptomyces lividans*:

Die Herstellung von Protoplasten von *Streptomyces lividans* für die Transformation erfolgte nach der Methode von Babcock und Kendrick [Babcock *et al.*, 1988].

Mit 5 µl einer Sporenkultur von TK 24 wurden zweimal je 20 ml TSB/PEG8000 Medium in Reagenzgläser angeimpft. Den Röhren wurde eine Metallspirale beigefügt, um die Entstehung großer Zellhaufen zu verhindern. Die *Streptomyces* Kultur wurde für 36-48 h unter Schütteln bei 30 °C inkubiert und anschließend unter dem Mikroskop auf Reinheit geprüft. Es wurden 40 ml der Kultur durch Zentrifugation (15 min, 4 °C, 3000 g) geerntet und zweimal mit je 30 ml einer 10,3 %igen Saccharoselösung gewaschen. Das Pellet wurde in 8 ml Puffer P mit 1 mg/ml Lysozym resuspendiert und bei 37 °C im Wasserbad inkubiert bis die Protoplastierung unter dem Mikroskop sichtbar war. Es wurden weitere 8 ml Puffer P (ohne Lysozym) zugegeben und die Protoplastensuspension durch eine sterile mit Watte gefüllte Spritze filtriert, um Myzelrückstände und kleinere Zellhaufen zu entfernen. Das Filtrat wurde für 20 min bei 4 °C und 3000 g zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Puffer P resuspendiert. Die Protoplasten wurden in 100 µl Aliquots aufgeteilt und über Nacht bei -20 °C tiefgefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80 °C.

4.2.1.3 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Für *E. coli*:

Ein Aliquot kompetenter Zellen des entsprechenden *E. coli* - Stammes wurde mit 0,5 - 10 µl DNA (max. 2 ng) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 90 Sekunden auf 42 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden mit 800 µl Medium (LB oder SOC) versetzt und für 45 min unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde ein Teil des Ansatzes auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

Für *Streptomyces lividans*:

Eine Aliquot Protoplasten wurde aufgetaut und bei 3500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Protoplasten vorsichtig mit 100 µl Puffer P resuspendiert. Anschließend wurden 5 - 10 µl DNA hinzugegeben und schnell mit 200 µl T/PEG1000-Puffer gemischt. Nach Zugabe von 1 ml Puffer P wurde die Suspension auf eine KA-Agarplatte ausplattiert und bei 30 °C inkubiert. Nach 36-40 h wurde die Agarplatte mit 2 ml einer Thiostreptonlösung (15 µM) überschichtet und für weitere 2-3 Tage bei 30 °C bebrütet.

4.2.1.4 Plasmidpräparation (Isolierung von Plasmid-DNA)

Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde zunächst eine 4 ml Übernachtkultur (37 °C) herangezogen und die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 g sedimentiert. Das Zellpellet wurde entsprechend der Anleitung des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) bzw. des GeneJET™ Plasmid MiniPrep Kits (Fermentas) behandelt. Die Plasmid-DNA wurde in 30 - 50 µl sterilem ddH₂O eluiert und die Konzentration und Reinheit spektroskopisch überprüft (Abs. 4.2.1.5).

4.2.1.5 Bestimmung der DNA-Konzentration mittels UV/Vis-Spektroskopie

Es wurde ein Spektrum von 240 - 340 nm gegen ddH₂O aufgenommen. Aus dem Absorptionswert bei 260 nm lässt sich die Konzentration der DNA nach folgender Formel berechnen:

$$c \text{ [ng/}\mu\text{l]} = A_{260} \cdot V \cdot F \quad \text{Gl. 4-1}$$

V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor (dsDNA = 50)

Anhand des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm (A_{260}) zu 280 nm (A_{280}) lässt sich die Reinheit der DNA feststellen, der optimale Wert liegt zwischen 1,8 - 2,0.

4.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse und Reinigung von DNA-Fragmenten verwendet. Dafür wurden 0,8 - 1,5 % (w/v) Agaroselösung in 50 ml 1x TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst, mit 0,5 µl der 1 %igen Ethidiumbromidstammlösung versetzt und zu polymerisieren in Gelkammern gegossen. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einer Horizontal-Elektrophoresekammer bei 90 V, 500 mA, 90 W über 30-90 min.

Ethidiumbromid ist eine aromatische Verbindung, welche zwischen die Basen der DNA interkaliert. Deshalb kann die DNA durch Anregung mit UV-Licht über die Fluoreszenz detektiert werden.

4.2.1.7 Restriktionsverdau

Die Methode des Restriktionsverdau wurde sowohl analytisch zur Qualitätskontrolle und zur Überprüfung auf positive Ligationsklone, als auch präparativ, zum Verdau von Plasmiden und PCR-Fragmenten für Ligationreaktionen, angewandt. Im analytischen Maßstab wurde der Verdau im Volumen von 10-20 µl entsprechend der Herstellerangaben (NEB bzw. Fermentas) mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen angesetzt und für 1-16h bei 37 °C inkubiert. Die Glycerinkonzentration im Ansatz wurde unter 10 % gehalten. Zur Analyse wurde der Verdau mit Probenpuffer versetzt und auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

Für die präparative Anwendung der Methode wurden Ansätze von bis zu 50 µl durchgeführt, welche anschließend über das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) gereinigt wurden und die DNA in 10-30 µl sterilem ddH₂O eluiert.

4.2.1.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [Mullis, 1990] wurde im Verlauf dieser Arbeit zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten sowie zum Einfügen von Mutationen in Plasmid-DNA genutzt. Als Polymerase wurde die *Pfu*Turbo-DNA-Polymerase bzw. die *Taq*-Polymerase entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die

Verlängerungszeit des PCR-Programmes ergab sich aus der Länge des Plasmids und der Synthesegeschwindigkeit der Polymerase (*Pfu*Turbo 500 bp/min bzw. *Taq* 2000 bp/min). Die optimale Temperatur für die Anlagerung der Primer wurde in Vorversuchen durch eine PCR mit Temperaturgradienten ermittelt. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 3-5 aufgelistet.

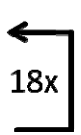
Ortsgerichtete Mutagenese

Die QuikChange®-Methode (Stratagene) wird genutzt, um Basenpaare in einem Plasmid auszutauschen, zu deletieren oder hinzuzufügen.

Ansatz: 1 µl *template* DNA
 5 µl 10x *Pfu*Turbo Puffer
 5 µl Primer for
 5 µl Primer rev
 5 µl dNTPs (10 mM)
 1 µl *Pfu*Turbo DNA-Polymerase
 ad 50 µl ddH₂O

Die Amplifizierung erfolgte in einem Thermocycler unter Verwendung des folgenden Programms (Tab. 4-6).

Tab. 4-6: Programm für Mutagenese-PCR

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	1 min	95 °C	 18x
Denaturierung	30 sec	95 °C	
Anlagerung der Primer	1 min	variabel	
Verlängerung	variabel	72 °C	
terminale Verlängerung	5 min	72 °C	
Lagerung	∞	10 °C	

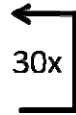
Der PCR Ansatz wurde anschließend mit *Dpn* I verdaut, um die *template* DNA abzubauen, und über das QIAquick PCR Purification Kit gereinigt. Die Plasmid-DNA wurde in den Klonierungsstamm XL1 blue transformiert und die Klone mittels Sequenzierung auf eine erfolgreiche Mutagenese untersucht.

Mutagenese durch PCR mit überhängenden Primern

Diese Methode beruht darauf, dass die PCR Reaktion auch funktioniert, wenn der Primer nicht vollständig an der Sequenz bindet. Dadurch kann man an den Enden des DNA-Fragments u.a. Schnittstellen für Restriktionsenzyme, Erkennungssequenzen für Proteasen oder Mutationen einfügen. Die PCR wurde mit dem in Tabelle 4-7 dargestellten Programm durchgeführt.

- Ansatz: 5 µl *template* DNA
 1 µl *Pfu*Turbo DNA-Polymerase
 5 µl 10x *Pfu*Turbo Puffer
 5 µl Primer 1
 5 µl Primer 2
 2,5 µl dNTPs (10 mM)
 ad 50 µl ddH₂O

Tab. 4-7: Programm für die PCR mit überhängenden Primern

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	1 min	95 °C	 30x
Denaturierung	30 sec	95 °C	
Anlagerung der Primer	1 min	variabel	
Verlängerung	variabel	72 °C	
Terminale Verlängerung	5 min	72 °C	
Lagerung	∞	10 °C	

Nach der PCR wurden die DNA-Fragmente mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten und über das QIAquick PCR Purification Kit gereinigt und konzentriert.

4.2.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Für den Ligationsansatz wurden der Vektor und das Insert in verschiedenen Verhältnissen (1:2 – 1:8) gemischt und entsprechend den Herstellerangaben Ligase Puffer und T4-Ligase dazugegeben. Der gesamte Ansatz wurde für 24-48 h bei 4 °C inkubiert und anschließend 2-10 µl für die Transformation in *E.coli* eingesetzt. Das Volumen des Ansatzes betrug max. 20 µl.

4.2.1.10 Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurden die DNA-Proben an die Firma MWG Eurofins, Ebersbach geschickt. Dafür wurden zuvor ~ 1-2 µg DNA mit Hilfe einer SpeedVac Apparatur eingedampft. Als Sequenzierprimer wurden die entsprechenden Standardprimer für pET-Vektoren bzw. pQE-Vektoren verwendet.

4.2.2 Proteintechnische Methoden

4.2.2.1 Expression von Wildtyp 4CL1 und Varianten in *E. coli*

Für Testexpressionen wurden 50 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angesetzt. Die Hauptkultur wurde mit 1 ml aus einer 4 ml Vorkultur angeimpft und unter Schütteln (150 rpm) bei 37 °C inkubiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,7 durch Zugabe von IPTG (100 - 1000 µM). Anschließend wurden die Kulturen für weitere 4 - 16 h bei 25 - 37 °C inkubiert.

Die Expression im größeren Maßstab erfolgte in 5 L Kolben à 1,5 L LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika. Die Inokulation erfolgte mit 15 - 30 ml einer 100 ml Vorkultur und die Hauptkultur wurde anschließend bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,7 wurde die Expression mit 100 - 1000 µM IPTG induziert und über Nacht (~ 16h) bei 25 - 30 °C und 150 rpm geschüttelt.

4.2.2.2 Expression von LivB in *Streptomyces lividans*

Für Testexpressionen wurde LivB in Reagenzgläsern mit ~20 ml TSB Medium und Thiostrepton (100 - 250 μ M) sowohl als Antibiotika als auch als Induktionsmittel angezogen. Da LivB Pyridoxal-5'-phosphat als Kofaktor braucht, wurde zum Medium Pyridoxin-Hydrochlorid (Endkonzentration 10 μ M) hinzugefügt. Die Inokulation erfolgte durch Zugabe einer Einzelkolonie von einer Protoplasten-Transformationsplatte. Die Kultur wurde bei 30 °C und unter Schütteln (200 rpm) für max. 72 h inkubiert.

Für eine Expression im größeren Maßstab wurden Vorkulturen à 20 ml für max. 60 h angezogen und mikroskopisch auf ihre Reinheit untersucht. Die Vorkulturen wurden anschließend bei 3000 g in sterilem Falcons für 10-15 min bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet mit frischem TSB-Medium gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 4-5 ml frischem TSB-Medium resuspendiert und in den vorbereiteten Erlenmeyerkolben (TSB-Medium, 10 μ M Pyridoxin-Hydrochlorid, 100 - 250 μ M Thiostrepton) für die Hauptkultur transferiert. Die Hauptkultur wurde bei 30 °C und 200 rpm für bis zu 72 h inkubiert und daraufhin geerntet.

4.2.2.3 Zellernte und Zellaufschluss

Für *E. coli*:

Die Zellernte der Testexpression erfolgte durch Zentrifugation (8000 g, 4 °C, 30 min) und das Zellpellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Die Zellen wurden in 5 ml Resuspensionspuffer aufgenommen, mittels Ultraschall auf Eis aufgeschlossen und anschließend bei 9400 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert.

Die Hauptkultur wurde durch Zentrifugation bei 8000 g und 4 °C für 30 min geerntet und das Zellpellet bei -20 °C gelagert. Um die Zellen aufzuschliessen, wurde das Zellpellet in ~ 40 ml 4CL1 Puffer A resuspendiert. Die Suspension wurde für 20 min mit Lysozym (2 mg/g Zellen) auf Eis inkubiert und danach durch Hochdruckdispersion (Gaulin, ~700 bar) aufgeschlossen. Die Probe wurde bei 45000 g und 4 °C für 1 h zentrifugiert um die unlöslichen Zellbestandteile abzutrennen.

Für *Streptomyces lividans*:

Die Kulturen wurden in Aliquots à 50 ml bei 3000 g und 4 °C für 20 - 30 min in sterilen Falcons zentrifugiert und das Pellet anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Für den Zellaufschluss wurde das Zellpellet in 5 ml des LivB Reinigungspuffers A aufgenommen und die Zellen mittels Ultraschall (10 x 20 sec) auf Eis aufgeschlossen. Der lösliche Überstand wurde durch Zentrifugation bei 20000 g und 4 °C für 30 min von den unlöslichen Zellbestandteilen abgetrennt.

4.2.2.4 Natriumdesoxycholat (NaDoc)-Fällung

Zur Konzentrierung von Proteinlösungen für die SDS-PAGE wurde die Natriumdesoxycholat (NaDoc)-Fällung verwendet. Die zu fällende Proteinlösung (max. 100 µl) wurde zunächst auf ein Volumen von 1 ml mit Wasser aufgefüllt und dann mit 1/10 Volumen (100 µl) 1%iger NaDoc-Lösung versetzt und gemischt. Darauf folgte die Zugabe von 1/5 Volumen (200 µl) 10%iger TCA-Lösung und der Ansatz wurde nochmals gemischt. Die Probe wurde für 10 min bei 10000 g zentrifugiert und das Pellet anschließend mit eiskaltem Aceton gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 10000 g wurde das Pellet getrocknet und in Probenpuffer für die SDS-PAGE aufgenommen.

4.2.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-PAGE [Laemmli, 1970] angewendet. Die Gele bestanden aus einem Sammelgel mit einer Acrylamidkonzentration von 5 % und einem Trenngel, welches eine Acrylamidkonzentration zwischen 10 und 15 % hatte. Zur Analyse der Expression wurde das Zellpellet aus 1/OD₆₀₀ ml Medium in 30 - 50 µl reduzierenden Ladepuffer resuspendiert, bei 95 °C für 5 - 10 min inkubiert, kurz zentrifugiert und anschließend 5 - 20 µl der Probe auf ein SDS-Gel geladen.

Zur Analyse von Proteinproben wurden 2 - 10 µg Protein aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Stromstärke von 25 mA pro Gel. Anschließend erfolgte die Detektion der Proteinbanden mittels Coomassie [Wong *et al.*, 2000]- bzw. Silberfärbung [Nesterenko *et al.*, 1994].

4.2.2.6 Affinitätschromatographie

Alle 4CL1-Konstrukte, welche in deM Vektor pQE30 kloniert wurden, besitzen einen N-terminalen Hexa-Histidin-*tag* (His₆-*tag*) und konnten mit Hilfe der Ni²⁺ Affinitätschromatographie gereinigt werden. Konstrukte im Vektor pET11a besitzen einen Strep-II-*tag* und können über eine StrepTactin[®] Superflow[®] Säule gereinigt werden.

Die LivB-Konstrukte besitzen ebenfalls einen His-*tag*, das Konstrukt im Vektor pUWLHis einen N-terminalen und die Variante im Vektor pUWL201PW einen C-terminalen His₆-*tag*.

Die Reinigung aller Varianten erfolgte bei einer Temperatur von 4 - 8 °.

Reinigung über Ni²⁺-Affinitätschromatographie

Zur Reinigung wurden HisTrap[™] HP Säulen in verschiedener Anzahl und Größe (1 ml oder 5 ml) verwendet. Das Säulenmaterial wurde zunächst mit 3 - 4 Säulenvolumen Puffer A äquilibriert. Der Probenauftrag erfolgte mit Hilfe einer Probenschleife (*superloop*) bei einer Flußgeschwindigkeit von max. 1 ml/min, damit die Proteine gut an die Säulenmatrix binden konnten. Die Säule wurde anschließend mit Puffer A gewaschen bis die Basislinie wieder erreicht war. Die Elution des gebunden Proteins erfolgte mit Hilfe des in Puffer B enthaltenen Imidazols, auf jede Proteinvariante optimal zugeschnitten, entweder mit einem Stufengradienten, einem linearen Gradienten über 5 - 10 Säulenvolumen oder einer Kombination aus beidem.

Puffer für Reinigung der 4CL1-Varianten:

Puffer A 50 mM TrisHCl; 500 mM NaCl; 20 mM Imidazol; 3 mM DTT, pH 8

Puffer B 50 mM TrisHCl; 500 mM NaCl; 250 mM Imidazol; 3 mM DTT, pH 8

Puffer für LivB-Reinigung:

Puffer A 50 mM TrisHCl, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 % (w/v) Glycerol, pH 8

Puffer B 50 mM TrisHCl, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 10 % (w/v) Glycerol, pH 8

Reinigung über Strep-tag Affinitätschromatographie

Das Zellysate wurde zunächst mit einer 10 mg/ml Avidinlösung (25 - 50 µl Lösung pro g Zellmasse) versetzt und für 30 - 45 min bei 4 °C inkubiert, um biotinylierte Proteine, welche dauerhaft an das Säulenmaterial binden, zu blockieren. Inzwischen wurde die StrepTactin[®] Superflow[®] Säule (Säulenvolumen: ~ 20 ml) mit 3 - 4 Säulenvolumen Puffer W äquilibriert werden. Nachdem das Zellysate bei 45000 g und 4 °C für 1 h zentrifugiert wurde, um die unlöslichen Zellbestandteile abzutrennen, wurde der Überstand bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,25 - 0,5 ml/min auf Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 0,6 - 0,65 Säulenvolumen Puffer W gewaschen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte mit d-Desthiobiotin durch einen Stufengradienten auf 100 % Puffer E. Das Protein wurde mit 1,25 Säulenvolumen Puffer E eluiert. Die Regeneration der Säulenmatrix erfolgte anschließend durch Spülen der Säule mit 2-3 CV Puffer R und Lagerung in diesem Puffer.

Puffer für die Reinigung der 4CL1-Varianten:

Puffer W 100 mM TrisHCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 3 mM DTT, pH 8

Puffer E 100 mM TrisHCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 3 mM DTT, 2,5 mM d-Desthiobiotin, pH 8

Puffer R 100 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM HABA, pH 8

4.2.2.7 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die Methode der Größenausschlusschromatographie oder Gelfiltration besteht in der Auftrennung der Proteine anhand ihrer Größe. Je nach Molekulargewicht der Proteinvariante und der Größe des Ansatzes wurden unterschiedliche Säulen verwendet. In dieser Arbeit wurden die Säulen Superdex 75 HiLoad *prep grade* 26/120, Superdex 75 HiLoad *prep grade* 16/120, Superdex 200 HiLoad *prep grade* 26/60 sowie Superdex 200 HiLoad *prep grade* 16/60 für die Größenausschlusschromatographie genutzt.

Die Säule wurde zunächst mit mindestens 2 Säulenvolumen des Puffers G äquilibriert und anschließend die Proteinprobe über einen *loop* aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einer Flußgeschwindigkeit von 1 - 1,5 ml/min (je nach Säule) über 2 Säulenvolumen.

Puffer für Größenausschlusschromatographie:

Puffer G 50 mM TrisHCl; 500 mM NaCl; 3 mM DTT, pH 8

4.2.2.8 Proteinkonzentrierung

Für die Konzentrierung von Proteinlösungen wurden Zentrifugen Filtereinheiten Amicon Ultra-4 bzw. -15 mit einem Ausschlussvolumen von 3, 5, 10 und 30 MWCO verwendet. Die Ausschlussgrenze wurde entsprechend der zu konzentrierenden Proteine gewählt.

4.2.2.9 Bestimmung der Proteinkonzentration durch UV/Vis-Spektroskopie

Der molare Absorptionskoeffizient ϵ bei 280 nm lässt sich über die Aminosäuresequenz berechnen [Wetlaufer, 1962] und ist für jedes Protein spezifisch. In dieser Arbeit wurden die Absorptionskoeffizienten mit Hilfe des Programmes Protparam des *ExpASY Proteomics Servers* (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) [Gasteiger *et al.*, 2005] berechnet.

Anhand des Lambert-Beerschen Gesetzes (Gl. 4-2) ließ sich aus der ermittelten Absorption die Konzentration der Proteinprobe errechnen.

$$A = c \cdot d \cdot \varepsilon$$

Gl. 4-2

A = gemessene Absorption

ε = molarer Absorptionskoeffizient ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

c = molare Konzentration der Probe (M)

d = Küvettschichtdicke (cm)

Die Adsorptionskoeffizienten für die in dieser Arbeit verwendeten Proteinvarianten sind in Tab. 4-8 aufgeführt.

Tab. 4-8: Adsorptionskoeffizienten der Varianten von 4CL1 und LivB

Proteinvarianten	ε_{280nm} in ($M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
4CL1 WT	27850
4CL1 YRH _{hinge}	29340
4CL1 C _{YRH hinge}	11460
4CL1 C _{YRHA hinge}	11460
4CL1 N _{YRH hinge}	30370
4CL1 YRHA _{hinge}	29340
4CL1 YRH _{loop}	29340
4CL1 N _{YRH loop}	31860
4CL1 C _{YRH loop}	9970
LivB	64400

4.2.2.10 Fluoreszenzspektroskopie

Zum Vergleich der Gesamtstruktur wurden von den Vollängenvarianten 4CL1 WT, 4CL1 YRH hinge und 4CL1 YRH loop Fluoreszenzspektren gemessen. Die Messungen erfolgten an einem Fluorimeter Fluoromax-3 (Jobin Yvon SPEX, Horiba) mit Pelthierelement. Die Proteinkonzentration betrug 3 μM . Die Proben wurden bei einer Temperatur von 25 °C in einer reduzierten Fluoreszenz-Quarzküvette ($d = 1 \text{ cm}$, Hellma) untersucht. Für die Messungen wurden Proben sowohl von nativen als auch denaturiertem Protein verwendet. Die Messung der nativen Proteinproben erfolgte in Puffer 1 (20 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 10 mM DTT, pH 8),

für die denaturierten Proben wurden die Varianten konzentriert und mit Puffer 2 (8 M Gua, 20 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 10 mM DTT, pH 8) auf die entsprechende Proteinkonzentration und eine Denaturanzkonzentration von 6 M GuanidiumHCl eingestellt. Die Proteinproben wurden über Nacht (~ 16 h) bei 4 °C und vor Beginn der Messung für 10 min bei 25 °C inkubiert. Es wurden die Intensitäten der Emission für 300 - 400 nm aufgezeichnet. Gemessen wurde bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm bzw. 280 nm. Die Spaltbreite der Anregung betrug 1 nm und die Integrationszeit bei jeder Wellenlänge betrug 0,5 s. Es wurden jeweils 5 Spektren akkumuliert. Die Spektren wurden um die Fluoreszenz des Puffers korrigiert.

4.2.2.11 CD-Spektroskopie

Um die Sekundärstruktur der Vollängenkonstrukte zu vergleichen, wurden Fern-UV-CD-Spektren von den Varianten 4CL1 WT, YRH hinge und YRH loop aufgenommen. Es wurde das J-810 CD-Spektrometer (Jasco) mit dem Temperaturregler PTC-4235 (Jasco) für die Messungen verwendet. Die Aufnahme der Spektren erfolgte von 190-250 nm in 1 nm Schritten mit einer Geschwindigkeit von 50 nm/min. Für ein Spektrum wurden 60 Einzelspektren akkumuliert. Die verwendeten Quarzküvetten (Hellma) hatten eine Schichtdicke von 0,1 mm bzw. 0,5 mm. Die Konzentration der Proteinproben nativ und denaturiert betrug 1 mg/ml. Die Proteinvarianten wurden gegen den CD-Puffer 1 (100 mM TrisHCl, 250 mM NaCl, 2 mM TCEP, pH 8) dialysiert und konzentriert. Für die CD-Messung von denaturierten Proteinproben wurden die Proteinvarianten zunächst konzentriert und anschließend mit dem CD-Puffer 2 (100 mM TrisHCl, 8 M Gua, 250 mM NaCl, 2 mM TCEP, pH 8), der 8 M GuanidinHCl enthielt, auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml und eine Denaturanzkonzentration 6 M GuanidiumHCl verdünnt. Um eine vollständige Denaturierung zu gewährleisten, wurden die Proben vor der Messung über Nacht (~ 16 h) bei 4 °C inkubiert.

Von den Varianten 4CL1 WT und YRH loop wurden nativ und denaturiert Dreifachbestimmungen durchgeführt, für die Variante 4CL1 YRH hinge nur eine Zweifachbestimmung. Die erhaltenen Spektren wurden gemittelt, als Referenz wurde ein gemessenes Spektrum des Puffers von den Proteinspektren abgezogen. Die CD-

Signale wurden in molare Elliptizität pro Aminosäure umgerechnet (Gl. 4-3) [Kelly *et al.*, 2005].

$$\theta_{MRC} \left[\frac{\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}}{\text{Aa}} \right] = \frac{\theta \cdot M[\text{mg} \cdot \text{mmol}^{-1}]}{10 \cdot d[\text{cm}] \cdot c[\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}] \cdot N}$$

Gl. 4-3

θ_{MRC} = molare Elliptizität pro Aminosäure

θ = Elliptizität

M = molekulare Masse der Proteinprobe

d = Schichtdicke der Küvette

c = Konzentration der Proteinprobe

N = Anzahl der Aminosäuren

4.2.2.12 Aktivitätstest für 4CL1 Varianten

Die 4-Cumarat:Coenzym A-Ligase katalysiert die Bildung von Zimtsäure-CoA-Estern aus Zimtsäurederivaten. Durch Messung der Zunahme der Extinktion kann die Aktivität direkt spektralphotometrisch [Knobloch *et al.*, 1975] verfolgt werden, wobei die zu messende Wellenlänge abhängig vom Substrat [Gross *et al.*, 1966] (p-Cumarsäure 333 nm, Kaffeesäure 346 nm) ist.

Für die Aktivitätsmessungen wurde zunächst ein Reaktionsmix, bestehend aus ATP, MgCl₂ und p-Cumarsäure, hergestellt und ebenso wie die Enzymproben und die Coenzym A-Lösung auf Eis gelagert. Die Messungen erfolgten bei 30 °C, weshalb der Ansatz (Reaktionspuffer, Reaktionsmix sowie Enzymprobe) vor dem Reaktionsstart für 5 min bei 30 °C inkubiert wurde und anschließend die Reaktion durch Zugabe von Coenzym A gestartet wurde. Die Reaktion wurde über einen Zeitraum von 5 min in 1 s-Intervallen aufgezeichnet. Die Referenzmessung erfolgte mit Reaktionspuffer anstelle von Protein. Als Enzymprobe wurde sowohl der Rohextrakt als auch gereinigtes Protein verwendet.

Der Reaktionsansatz (500 μ l) enthielt:

50 μ l	50 mM	ATP (in H ₂ O)
25 μ l	2 mM	CoA (in H ₂ O)
25 μ l	100 mM	MgCl ₂ (in H ₂ O)
25 μ l	10 mM	p-Cumarsäure (in EtOH)
5-50 μ l		Proteinprobe
325-370 μ l	200 mM	TrisHCl, pH 8

4.2.2.13 Protease - vermittelte Proteinligation

Die Experimente zur Protease-vermittelten Proteinligation wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Frank Bordusa, Abteilung Naturstoffchemie, Universität Halle-Wittenberg in der die Trypsin-Variante K60E/N143H/E151H/D189K entwickelt wurde, durchgeführt. Die Versuche wurden von Dr. Sandra Liebscher ausgeführt [Liebscher *et al.*, 2008; Liebscher *et al.*, 2006]. Die Auswertung der Ligationsversuche erfolgte durch SDS-PAGE Analyse, Detektion von Fluoreszenzmarkern bzw. massenspektrometrisch.

Für die Versuche wurden die 4CL1 Varianten zunächst gegen den Puffer D dialysiert und anschließend konzentriert.

Dialysepuffer:

Puffer D 100 mM TrisHCl, 250 mM NaCl, 2 mM TCEP, pH 8

4.2.2.14 Kristallisation

96-well Kristallisations-Screening

Für die Kristallisation wurde die Proteinprobe auf 2 - 20 mg/ml konzentriert, und größere Aggregate wurden durch Zentrifugation bei 22000 g für 30 min bei 4 °C entfernt. Die *sitting-drop* Kristallisationsexperimente wurden in 96-well plates (CrystalQuick™, *Standard Profile, Flat Bottom*, Greiner) bei 14 °C an einem Pipettierroboter Microsys SQ (Cartesian) mit einer Tropfengröße von je 200 nl für

Protein- und Reservoirlösung unter Verwendung vorhandener Kristallisationskits (siehe 3.1.4) angesetzt. Als Negativkontrolle wurde der Puffer der Proteinlösung verwendet. Das *Imaging* wurde durch ein Desktop Minstrel UV (Rigaku). Die Platten wurden dabei zunächst täglich und dann in größeren Abständen auf Kristallbildung untersucht.

24-well Feinscreening

Das Screening nach besseren und größeren Kristallen erfolgte im 24 well Maßstab (EasyXtalTool, Qiagen) mit der *hanging drop*-Methode. Für die gefundenen Kristallisationsbedingungen wurde ein Feinscreening angesetzt. Je nach Puffer wurde entweder der pH-Wert, die Präzipitanzkonzentration und / oder Proteinkonzentration variiert. Hierzu wurden für jede Pufferbedingung 500 μ l Reservoir und 2-5 μ l Tropfen (1-2 μ l Protein + 1-3 μ l Puffer) angesetzt.

4.2.2.15 Soaking Experimente

Schweratomderivat-Soaking

Mit Hilfe des Schweratomderivat-*Soakings* sollte das Phasenproblem gelöst werden. Hierbei wurden die Proteinkristalle in Schweratomhaltigem Kristallisationspuffer inkubiert, um eine Aufnahme der Schweratome in den Kristall zu erreichen (*soaking*) [Garman *et al.*, 2003; Joyce *et al.*, 2010]. Für die Methode wurden Kaliumiodid (KI), Kaliumtetrachloroplatinat (K_2PtCl_4), Quecksilberchlorid ($HgCl_2$) und die *magic triangle* Verbindung (5-Amino-2,4,6-triiod-Isophthalsäure, I3C; [Beck *et al.*, 2008b; Beck *et al.*, 2009]) eingesetzt. Die Schweratomverbindungen K_2PtCl_4 und $HgCl_2$ lagen als 100 mM Stammlösungen vor. Von I3C wurde eine 1 M Lösung in 3 M LiOH hergestellt und von KI wurde 1 M Stammlösung im Kristallisationspuffer hergestellt. Die Stammlösungen wurden für das *soaking* mit dem Kristallisationspuffer gemischt. Anschließend wurde ein Kristall in einem 3 - 5 μ l großen Tropfen des jeweiligen Kristallisationspuffers bei 20 °C inkubiert. Die verwendeten Inkubationszeiten und die Endkonzentration der Schweratomderivate im Kristallisationspuffer sind in Tab. 4-9 aufgeführt.

Tab. 4-9: verwendete Verbindungen für Schweratomderivat-Soaking von LivB

Verbindung	verwendete Konzentration	Inkubationszeit
KI	0,5 - 1 M	30 h – 96 h
K ₂ PtCl ₄	10 mM	30 h – 96 h
HgCl ₂	10 mM	30 h – 96 h
I3C	50 - 200 mM	30 sec - 30 min

Liganden-Soaking

Durch das Überführen von Kristallen in Tropfen mit Kristallisationspuffer, welche denkbare Interaktionspartner wie Kofaktoren, Substrate oder Produkte enthalten, soll erreicht werden, dass der Kristall diese Liganden aufnimmt (*soaking*). Dies dient der Aufklärung von möglichen Bindungsstellen und kann Protein-Ligand-Interaktionen aufzeigen. Die erhaltenen LivB Kristalle wurden mit dem Kofaktor Pyridoxal-5'-phosphat (PLP), dem Aminodonor L-Glutamat bzw. L-Glutamin und/oder dem Endprodukt Paromomycin inkubiert.

Für die *soaking* Experimente wurden von PLP, Paromomycin und L-Glutamat bzw. L-Glutamin Lösungen hergestellt. Für PLP und Paromomycin wurden je 25 mM im Kristallisationspuffer gelöst. L-Glutamat und L-Glutamin wurden mit einer Konzentration von 50 mM, ebenfalls im Kristallisationspuffer, angesetzt. Für Kombinationen der Komponenten wurden die einzelnen Lösungen vor dem *soaking* Experiment gemischt. Für jeden Versuch wurde ein LivB Kristall in einen 3 µl Tropfen überführt, der entweder den Kofaktor PLP, das Substrat L-Glutamat bzw. L-Glutamin, das Reaktionsendprodukt Paromomycin oder eine Kombination dieser Liganden enthielt. Die Kristalle wurden zwischen 30 s und 4 d im Tropfen inkubiert, die Temperatur betrug dabei 20 °C. Anschließend wurden die Kristalle entweder sofort vermessen oder für spätere Experimente in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.2.2.16 Datensammlung und -prozessierung

Die Kristalle von LivB wurden in einem 0,1 mm *loop* auf dem Goniometerkopf eines Röntgendrehanodengenerators (MicroMax 007 (Rigaku), $\lambda = 1.54182 \text{ \AA}$) montiert und bei -180 °C schockgefroren. Es wurde kein zusätzlicher Kryoschutz verwendet, da der Kristallisationspuffer bereits 40 % (w/v) PEG300 enthielt und keine Eisringe bei

Testbildern auftraten. Die Detektion erfolgte mittels eines Saturn 944+ CCD Detektors bzw. einer R-axis IV++ *Imaging Plate* (Rigaku). Es wurden kurze Oszillationsschritte von 0,25 bis 0,5° und ein Kristall-Detektor-Abstand von 50 - 120 mm verwendet. Der Kristall wurde für eine Einzelaufnahme 30 - 120 sec lang belichtet.

Einige Datensätze wurden zudem am Synchrotron BESSY-2 in Berlin, an der *beamline* 14.1 ($\lambda = 0,9184 \text{ \AA}$), mit einem Mosaic MARCCD 225 mm-Detektor (MarResearch) vermessen.

Die aufgenommenen Datensätze (siehe Tab. 4-10) wurden für die Indizierung, Integration und Skalierung entweder mit D*Trek [Pflugrath, 1999], HKL2000 [Otwinowski *et al.*, 1997] oder XDS [Kabsch, 2010] prozessiert.

Tab. 4-10: Liste der aufgenommenen Datensätze von LivB

Name	Liganden im Kristallisationspuffer
LivB-Apo	--
LivB-I3C	<i>magic triangle</i> Verbindung (I3C)
LivB-PLP	Kofaktor PLP
LivB-L-Glu	L-Glutaminat
LivB-L-Gln	L-Glutamin
LivB-Paromomycin	Paromomycin
LivB-PLP-L-Glu	PLP, L-Glutaminat
LivB-PLP-L-Gln	PLP, L-Glutamin
LivB-PLP-Paromomycin	PLP, Paromomycin

4.2.2.17 Strukturaufklärung und Verfeinerung

Single wavelength anomalous dispersion (SAD)

Der LivB-Apo Datensatz wurde mit Hilfe der Methode des *Single wavelength anomalous dispersion* (SAD) gelöst [Dauter *et al.*, 2002; Rhodes, 2006; Dodson, 2003]. Bei dieser Methode wird ausgenutzt, dass Schweratome, wie z.B. Blei, Platin oder Iod, die Fähigkeit besitzen Röntgenstrahlung einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren. Dies kann genutzt werden, um das Phasenproblem zu lösen. Bei der Methode des SAD wird im Gegensatz zum MAD (*multi wavelength anomalous dispersion*) nur bei einer Wellenlänge gemessen. Der Datensatz konnte mit Hilfe des LivB-I3C Datensatzes und unter Nutzung der Programme SHELX C/D/E (beta

version 2009/4) [Sheldrick, 2008; Sheldrick, 2010] sowie ARP/wARP [Langer *et al.*, 2008] aufgeklärt werden.

Molekularer Ersatz (MR)

Alle weiteren Datensätze konnten durch die Methode des molekularen Ersatzes (*molecular replacement*, MR) mit dem Programm PHASER [McCoy *et al.*, 2007] aus dem Programmpaket CCP4 gelöst werden. Als Suchmodell diente die Struktur des LivB-Apo Datensatzes.

Verfeinerung

Das Einpassen des atomaren Modells in die gemessene Elektronendichte erfolgte mit dem Programm COOT [Emsley *et al.*, 2004]. Für die Verfeinerung wurden die Programme Refmac5 [Murshudov *et al.*, 1999] (CCP4) und PHENIX [Adams *et al.*, 2010] benutzt. Mit den Programmen PROCHECK [Laskowski *et al.*, 1993] und MolProbity [Chen *et al.*, 2010] wurden die Modelle auf ihre Richtigkeit überprüft.

5 Literaturverzeichnis

- Arya, D.P. (2007), Aminoglycoside Antibiotics - From chemical biology to drug discovery. Wiley
- Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkoczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C. und Zwart, P.H. (2010), PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*; 66: 213-221
- Alexander, F.W., Sandmeier, E., Mehta, P.K. und Christen, P. (1994), Evolutionary relationships among pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. Regio-specific alpha, beta and gamma families. *Eur. J. Biochem.*; 219: 953-960
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. (1990), Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*; 215: 403-410
- Aoyagi, T., Kawai, T., Yamada, Y., Gomi, J. und Ogiwara, K. (1975), [Studies on the therapeutic effects of lividomycin in respiratory infections (author's transl)]. *Jpn. J. Antibiot.*; 28: 166-174
- Babcock, M.J. und Kendrick, K.E. (1988), Cloning of DNA involved in sporulation of *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology*; 170: 2802-2808
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B. und Steitz, T.A. (2000), The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*; 289: 905-920
- Beck, T., da Cunha, C.E. und Sheldrick, G.M. (2009), How to get the magic triangle and the MAD triangle into your protein crystal. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.*; 65: 1068-1070
- Beck, T., Krasauskas, A., Gruene, T. und Sheldrick, G.M. (2008a), A magic triangle for experimental phasing of macromolecules. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*; 64: 1179-1182
- Beck, T. und Sheldrick, G.M. (2008b), 5-Amino-2,4,6-triiodo-isophthalic acid monohydrate. *Acta Crystallogr. Sect. E. Struct. Rep. Online.*; 64: o1286-
- Becker, C.F., Hunter, C.L., Seidel, R., Kent, S.B., Goody, R.S. und Engelhard, M. (2003), Total chemical synthesis of a functional interacting protein pair: the protooncogene H-Ras and the Ras-binding domain of its effector c-Raf1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 100: 5075-5080
- Black, J., Calesnick, B., Williams, D. und Weinstein, M.J. (1963), Pharmacology of Gentamicin, a New Broad-Spectrum Antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother*; 161: 138-147
- Branchini, B.R., Southworth, T.L., Murtiashaw, M.H., Wilkinson, S.R., Khattak, N.F., Rosenberg, J.C. und Zimmer, M. (2005), Mutagenesis evidence that the partial reactions of firefly bioluminescence are catalyzed by different conformations of the luciferase C-terminal domain. *Biochemistry*; 44: 1385-1393
- Bräuer, U. (2005), Herstellung von Varianten der 4-Cumarat:Coenzym A Ligase 1 für die Protease-vermittelte Proteinligation. Diplomarbeit; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg:
- Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Carter, A.P., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T. und Ramakrishnan, V. (2000), The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell*; 103: 1143-1154
- Bryan, L.E., Kowand, S.K. und Van Den Elzen, H.M. (1979), Mechanism of aminoglycoside antibiotic resistance in anaerobic bacteria: *Clostridium perfringens* and *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother*; 15: 7-13
- Butt, T.R., Edavettal, S.C., Hall, J.P. und Mattern, M.R. (2005), SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr. Purif.*; 43: 1-9
- Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T. und Ramakrishnan, V. (2000), Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*; 407: 340-348

- Chang, K.H., Xiang, H. und Dunaway-Mariano, D. (1997), Acyl-adenylate motif of the acyl-adenylate/thioester-forming enzyme superfamily: a site-directed mutagenesis study with the *Pseudomonas sp.* strain CBS3 4-chlorobenzoate:coenzyme A ligase. *Biochemistry*; 36: 15650-15659
- Chen, V.B., Arendall, W.B., III, Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J., Murray, L.W., Richardson, J.S. und Richardson, D.C. (2010), MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D. Biol Crystallogr.*; 66: 12-21
- Chong, S., Mersha, F.B., Comb, D.G., Scott, M.E., Landry, D., Vence, L.M., Perler, F.B., Benner, J., Kucera, R.B., Hirvonen, C.A., Pelletier, J.J., Paulus, H. und Xu, M.Q. (1997), Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element. *Gene*; 192: 271-281
- Clausnitzer, D. (2010), Analyse von ausgewählten modifizierenden Enzymen aus den Aminoglycosidantibiotika-Biosynthesewegen von Neomycin, Lividomycin und Nebramycin. Dissertation; Bergische Universität Wuppertal:
- Clausnitzer, D., Piepersberg, W. und Wehmeier, U.F. (2011), The oxidoreductases LivQ and NeoQ are responsible for the different 6'-modifications in the aminoglycosides lividomycin and neomycin. *J Appl Microbiol.*; 111: 642-651
- Cole, C., Barber, J.D. und Barton, G.J. (2008), The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.*; 36: W197-W201
- 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: 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. *EMBO J.*; 16: 4174-4183
- Cook, P.D. und Holden, H.M. (2008), GDP-perosamine synthase: structural analysis and production of a novel trideoxysugar. *Biochemistry*; 47: 2833-2840
- Cook, P.D., Thoden, J.B. und Holden, H.M. (2006), The structure of GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose-3-dehydratase: a unique coenzyme B6-dependent enzyme. *Protein Sci.*; 15: 2093-2106
- Cuff, A.L., Sillitoe, I., Lewis, T., Clegg, A.B., Rentzsch, R., Furnham, N., Pellegrini-Calace, M., Jones, D., Thornton, J. und Orengo, C.A. (2011), Extending CATH: increasing coverage of the protein structure universe and linking structure with function. *Nucleic Acids Res.*; 39: D420-D426
- Dauter, Z., Dauter, M. und Dodson, E. (2002), Jolly SAD. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*; 58: 506-
- David, R., Richter, M.P. und Beck-Sickinger, A.G. (2004), Expressed protein ligation. Method and applications. *Eur. J. Biochem.*; 271: 663-677
- Dawson, P.E., Muir, T.W., Clark-Lewis, I. und Kent, S.B. (1994), Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*; 266: 776-779
- Delano, W.L. und Lam, J.W. (2005), PyMOL: A communications tool for computational models. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*; 230: U1371-U1372
- Dharmatilake, A.J. und Bauer, W.D. (1992), Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* towards nodulation gene-inducing compounds from alfalfa roots. *Appl Environ Microbiol*; 58: 1153-1158
- Dixon, R. und Paiva, N.L. (1995), Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell*; 7: 1085-1097
- Dodson, E. (2003), Is it jolly SAD? *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*; 59: 1958-1965
- Douglas, C.J. (1996), Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. *Trends Biochem Sci*; 1: 171-178
- Doumith, M., Weingarten, P., Wehmeier, U.F., Salah-Bey, K., Benhamou, B., Capdevila, C., Michel, J.M., Piepersberg, W. und Raynal, M.C. (2000), Analysis of genes involved in 6-deoxyhexose biosynthesis and transfer in *Saccharopolyspora erythraea*. *Mol. Gen. Genet.*; 264: 477-485
- 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: 11473-11480

- Dyckes, D.F., Creighton, T. und Sheppard, R.C. (1974), Spontaneous re-formation of a broken peptide chain. *Nature*; 247: 202-204
- Eads, J.C., Beeby, M., Scapin, G., Yu, T.W. und Floss, H.G. (1999), Crystal structure of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid (AHBA) synthase. *Biochemistry*; 38: 9840-9849
- Ebel, J., Schmidt, W.E. und Loyal, R. (1984), Phytoalexin synthesis in soybean cells: elicitor induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs and correlation with phytoalexin accumulation. *Arch. Biochem. Biophys.*; 232: 240-248
- Ehlting, J., Buttner, D., Wang, Q., Douglas, C.J., Somssich, I.E. und Kombrink, E. (1999), Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *Plant J.*; 19: 9-20
- Emsley, P. und Cowtan, K. (2004), Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*; 60: 2126-2132
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2009), Antimicrobial resistance surveillance in Europe - Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)
- Evans, T.C. und Xu, M.Q. (2000), Intein-mediated protein ligation: harnessing nature's escape artists. *Biopolymers*; 51: 333-342
- Fairbanks, G., Steck, T.L. und Wallach, D.F. (1971), Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*; 10: 2606-2617
- Finn, R.D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J.E., Gavin, O.L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E.L., Eddy, S.R. und Bateman, A. (2010), The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.*; 38: D211-D222
- Franks, N.P., Jenkins, A., Conti, E., Lieb, W.R. und Brick, P. (1998), Structural basis for the inhibition of firefly luciferase by a general anesthetic. *Biophys J.*; 75: 2205-2211
- Fulda, M., Heinz, E. und Wolter, F.P. (1994), The fadD gene of *Escherichia coli* K12 is located close to rnd at 39.6 min of the chromosomal map and is a new member of the AMP-binding protein family. *Mol. Gen. Genet.*; 242: 241-249
- Galimand, M., Courvalin, P. und Lambert, T. (2003), Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother*; 47: 2565-2571
- Garman, E. und Murray, J.W. (2003), Heavy-atom derivatization. *Acta Crystallogr. D. Biol Crystallogr.*; 59: 1903-1913
- Garnier, J., Gibrat, J.F. und Robson, B. (1996), GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol.*; 266: 540-553
- 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*; 571-607
- Gillespie, S.H. (2002), Evolution of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and Molecular Perspective. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 46: 267-274
- Gogarten, J.P., Senejani, A.G., Zhaxybayeva, O., Olendzenski, L. und Hilario, E. (2002), Inteins: structure, function, and evolution. *Annu Rev Microbiol*; 56: 263-287
- Gottesman, S., Halpern, E. und Trisler, P. (1981), Role of sulA and sulB in filamentation by lon mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*; 148: 265-273
- Green, R. und Noller, H.F. (1997), Ribosomes and translation. *Annu. Rev. Biochem.*; 66: 679-716
- Grishin, N.V., Phillips, M.A. und Goldsmith, E.J. (1995), Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases. *Protein Sci.*; 4: 1291-1304
- Gross, G.G. und Zenk, M.H. (1966), Darstellung und Eigenschaften von Coenzym A-Thiolester substituiertes Zimtsäuren. *Zeitschrift für Naturforschung*; 21b: 638-690

- Gulick, A.M. (2009), Conformational dynamics in the Acyl-CoA synthetases, adenylation domains of non-ribosomal peptide synthetases, and firefly luciferase. *ACS Chem Biol.*; 4: 811-827
- Gulick, A.M., Lu, X. und Dunaway-Mariano, D. (2004), Crystal structure of 4-chlorobenzoate:CoA ligase/synthetase in the unliganded and aryl substrate-bound states. *Biochemistry*; 43: 8670-8679
- Gulick, A.M., Starai, V.J., Horswill, A.R., Homick, K.M. und Escalante-Semerena, J.C. (2003), The 1.75 Å crystal structure of acetyl-CoA synthetase bound to adenosine-5'-propylphosphate and coenzyme A. *Biochemistry*; 42: 2866-2873
- Harms, J., Schluezen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F. und Yonath, A. (2001), High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell*; 107: 679-688
- Heller, W. und Forkmann, G. (1993), Biosynthesis of flavonoids. *The Flavonoids: Advances in research.*; 499-535
- Hennig, J. (2009), Strukturelle Untersuchungen an den extrazellulären Ligandenbindenden Domänen der Parathormon Rezeptoren 1 und 2 sowie der L-Glutamin-Glykosyl-Prinomamin-3"-Aminotransferase TobS2. Dissertation; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg:
- Hennig, M., Grimm, B., Contestabile, R., John, R.A. und Jansonius, J.N. (1997), Crystal structure of glutamate-1-semialdehyde aminomutase: an alpha2-dimeric vitamin B6-dependent enzyme with asymmetry in structure and active site reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*; 94: 4866-4871
- Hennig, M., Grimm, B., Jenny, M., Muller, R. und Jansonius, J.N. (1994), Crystallization and preliminary X-ray analysis of wild-type and K272A mutant glutamate 1-semialdehyde aminotransferase from *Synechococcus*. *J. Mol. Biol.*; 242: 591-594
- Higgins, C.E. und Kastner, R.E. (1967), Nebramycin, a new broad spectrum antibiotic complex II: Description of *Streptomyces tenebrarius*. *Antimicrob Agents Chemother*; 7: 324-331
- Hisanaga, Y., Ago, H., Nakagawa, N., Hamada, K., Ida, K., Yamamoto, M., Hori, T., Arai, Y., Sugahara, M., Kuramitsu, S., Yokoyama, S. und Miyano, M. (2004), Structural basis of the substrate-specific two-step catalysis of long chain fatty acyl-CoA synthetase dimer. *J. Biol. Chem.*; 279: 31717-31726
- Höfer, N. (2004), Biochemische Charakterisierung der 4-Cumarat:Coenzym A Ligase 1 aus *Glycine max*. Diplomarbeit; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg:
- Holm, L., Kaariainen, S., Rosenstrom, P. und Schenkel, A. (2008), Searching protein structure databases with DaliLite v.3. *Bioinformatics*; 24: 2780-2781
- Holm, L. und Rosenstrom, P. (2010), Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res.*; 38: W545-W549
- Hopwood, D.A. (1985), Genetic manipulation of streptomyces: A laboratory manual. The John Innes Foundation
- Hu, Y., Gai, Y., Yin, L., Wang, X., Feng, C., Feng, L., Li, D., Jiang, X.N. und Wang, D.C. (2010), Crystal structures of a *Populus tomentosa* 4-coumarate:CoA ligase shed light on its enzymatic mechanisms. *Plant Cell*; 22: 3093-3104
- Humphrey, W., Dalke, A. und Schulten, K. (1996), VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.*; 14: 33-38
- Jansonius, J.N. (1998), Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*; 8: 759-769
- Jansson, M., Li, Y.C., Jendeborg, L., Anderson, S., Montelione, B.T. und Nilsson, B. (1996), High-level production of uniformly ¹⁵N- and ¹³C-enriched fusion proteins in *Escherichia coli*. *J. Biomol NMR*; 7: 131-141
- Jogl, G. und Tong, L. (2004), Crystal structure of yeast acetyl-coenzyme A synthetase in complex with AMP. *Biochemistry*; 43: 311-320
- Joyce, M.G., Radaev, S. und Sun, P.D. (2010), A rational approach to heavy-atom derivative screening. *Acta Crystallogr. D. Biol Crystallogr.*; 66: 358-365

- Kabsch, W. (2010), Xds. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography*; 66: 125-132
- Käck, H., Sandmark, J., Gibson, K., Schneider, G. und Lindqvist, Y. (1999), Crystal structure of diaminopelargonic acid synthase: evolutionary relationships between pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *J. Mol. Biol.*; 291: 857-876
- Kelly, S.M., Jess, T.J. und Price, N.C. (2005), How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta*; 1751: 119-139
- Kieser, T. (2000), *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation
- Knobloch, K.H. und Hahlbrock, K. (1975), Isoenzymes of p-coumarate: CoA ligase from cell suspension cultures of *Glycine max*. *Eur. J. Biochem.*; 52: 311-320
- Kondo, H., Miwa, T., Suhachiro, M., Yokouchi, S. und Ando, Y. (1975), [Clinical experiences of lividomycin on respiratory tract infections (author's transl)]. *Jpn. J. Antibiot.*; 28: 149-154
- Kondo, J., Pachamuthu, K., Francois, B., Szychowski, J., Hanessian, S. und Westhof, E. (2007), Crystal structure of the bacterial ribosomal decoding site complexed with a synthetic doubly functionalized paromomycin derivative: a new specific binding mode to an a-minor motif enhances in vitro antibacterial activity. *Chem Med Chem*; 2: 1631-1638
- Kondo, S., Linuma, K., Yamamoto, H., Maeda, K. und Umezawa, H. (1973a), Letter: Syntheses of 1-n-(S)-4-amino-2-hydroxybutyryl)-kanamycin B and -3', 4'-dideoxykanamycin B active against kanamycin-resistant bacteria. *J Antibiot (Tokyo)*; 26: 412-415
- Kondo, S., Linuma, K., Yamamoto, H., Maeda, K. und Umezawa, H. (1973b), Letter: Synthesis of (S)-4-amino-2-hydroxybutyryl derivatives of 3',4'-dideoxykanamycin B and their antibacterial activities. *J Antibiot (Tokyo)*; 26: 705-707
- Krissinel, E. und Henrick, K. (2007), Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol.*; 372: 774-797
- Kumar, A. und Ellis, B.E. (2003), 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Rubus idaeus*: cDNA structures, evolution, and expression. *Plant Mol. Biol.*; 51: 327-340
- Kumazawa, J. und Momose, S. (1973), Clinical effectiveness of lividomycin on urinary tract infections: evaluation with double-blind method. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.*; 15: 873-901
- Kurokawa, K., Nagano, K., Hamada, M. und Kondo, K. (1972), [Experience in the use of lividomycin in urology]. *Jpn. J. Antibiot.*; 25: 420-426
- Laemmli, U.K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227: 680-685
- Langer, G., Cohen, S.X., Lamzin, V.S. und Perrakis, A. (2008), Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nat Protoc.*; 3: 1171-1179
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. und Higgins, D.G. (2007), Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*; 23: 2947-2948
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. und Thornton, J.M. (1993), PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst.*; 26: 283-291
- Liebscher, S., Trost, E., Hoess, E. und Bordusa, F. (2008), Site-specific PEGylation of human IgG1-Fab using a rationally designed trypsin variant. *Journal of Peptide Science*; 14: 72-72
- Liebscher, S., Wehofsky, N., Hoess, E. und Bordusa, F. (2006), Site-specific N-terminal modification of proteins by using a rational designed trypsin variant. *Journal of Peptide Science*; 12: 128-128
- Lindermayr, C., Fliegmann, J. und Ebel, J. (2003), Deletion of a single amino acid residue from different 4-coumarate:CoA ligases from soybean results in the generation of new substrate specificities. *J. Biol. Chem.*; 278: 2781-2786
- Lindermayr, C., Mollers, B., Fliegmann, J., Uhlmann, A., Lottspeich, F., Meimberg, H. und Ebel, J. (2002), Divergent members of a soybean (*Glycine max* L.) 4-coumarate:coenzyme A ligase gene family. *Eur. J. Biochem.*; 269: 1304-1315

- Liu, W., Peterson, P.E., Langston, J.A., Jin, X., Zhou, X., Fisher, A.J. und Toney, M.D. (2005), Kinetic and crystallographic analysis of active site mutants of Escherichia coli gamma-aminobutyrate aminotransferase. *Biochemistry*; 44: 2982-2992
- Llano-Sotelo, B., Azucena, E.F., Kotra, L.P., Mobashery, S. und Chow, C.S. (2002), Aminoglycosides modified by resistance enzymes display diminished binding to the bacterial ribosomal aminoacyl-tRNA site. *Chem. Biol.*; 9: 455-463
- Lozoya, E., Hoffmann, H., Douglas, C., Schulz, W., Scheel, D. und Hahlbrock, K. (1988), Primary structures and catalytic properties of isoenzymes encoded by the two 4-coumarate: CoA ligase genes in parsley. *Eur J Biochem*; 176: 661-667
- Lynch, S.R., Gonzales, R.L. und Puglisi, J.D. (2003), Comparison of X-ray crystal structure of the 30S subunit-antibiotic complex with NMR structure of decoding site oligonucleotide-paromomycin complex. *Structure*; 11: 43-53
- Magnet, S. und Blanchard, J.S. (2005), Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem. Rev.*; 105: 477-498
- Malashkevich, V.N., Toney, M.D. und Jansonius, J.N. (1993), Crystal structures of true enzymatic reaction intermediates: aspartate and glutamate ketimines in aspartate aminotransferase. *Biochemistry*; 32: 13451-13462
- Marley, J., Lu, M. und Bracken, C. (2001), A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. *J Biomol NMR*; 20: 71-75
- May, J.J., Kessler, N., Marahiel, M.A. und Stubbs, M.T. (2002), Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 99: 12120-12125
- May, J.J., Wendrich, T.M. und Marahiel, M.A. (2001), The dhb operon of Bacillus subtilis encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *J Biol Chem.*; 276: 7209-7217
- 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: 658-674
- Mehta, P.K., Hale, T.I. und Christen, P. (1993), Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *Eur. J. Biochem.*; 214: 549-561
- Michal, G. (1999), *Biochemical Pathways: Biochemie-Atlas*. Spektrum Akademischer Verlag
- Mita, T., Takahashi, Y., Hara, S., Ishigami, J. und Kobayashi, M. (1972), [Application of lividomycin in urology]. *Jpn. J. Antibiot.*; 25: 414-419
- Moazed, D. und Noller, H.F. (1987), Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature*; 327: 389-394
- Muir, T.W., Sondhi, D. und Cole, P.A. (1998), Expressed protein ligation: a general method for protein engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*; 95: 6705-6710
- Müller, S., Hoege, C., Pyrowolaskis, G. und Jentsch, S. (2001), SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 2: 202-210
- Mullis, K.B. (1990), The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.*; 262: 56-5
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., Lebedev, A., Wilson, K.S. und Dodson, E.J. (1999), Efficient anisotropic refinement of macromolecular structures using FFT. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*; 55: 247-255
- Musser, J.M. (1995), Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacteria: Molecular Genetic Insights. *Clin. Microbiol. Rev.*; 8: 496-514
- Nakatsu, T., Ichiyama, S., Hiratake, J., Saldanha, A., Kobashi, N., Sakata, K. und Kato, H. (2006), Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. *Nature*; 440: 372-376
- Nesterenko, M.V., Tilley, M. und Upton, S.J. (1994), A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys. Methods*; 28: 239-242

- Neu, H.C. und Fu, K.P. (1978), 1-N HAPA gentamicin B, a new aminoglycoside active against gentamicin resistant isolates--activity compared to other aminoglycosides. *J Antibiot (Tokyo)*; 31: 385-393
- Oda, T., Mori, T., Ito, H., Kunieda, T. und Munakata, K. (1971), Studies on new antibiotic lividomycins. I. Taxonomic studies on the lividomycin-producing strain *Streptomyces lividus* nov. sp. *J. Antibiot. (Tokyo)*; 24: 333-338
- Ogle, J.M., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Jr., Tarry, M.J., Carter, A.P. und Ramakrishnan, V. (2001), Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science*; 292: 897-902
- Ogle, J.M., Murphy, F.V., Tarry, M.J. und Ramakrishnan, V. (2002), Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell*; 111: 721-732
- Ogle, J.M. und Ramakrishnan, V. (2005), Structural insights into translational fidelity. *Annu. Rev. Biochem.*; 74: 129-177
- Otwinowski, Z. und Minor, W. (1997), Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Macromolecular Crystallography, Pt A*; 276: 307-326
- Ouali, M. und King, R.D. (2000), Cascaded multiple classifiers for secondary structure prediction. *Protein Sci.*; 9: 1162-1176
- Pape, T., Wintermeyer, W. und Rodnina, M.V. (2000), Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nat Struct Biol.*; 7: 104-107
- Pflugrath, J.W. (1999), The finer things in X-ray diffraction data collection. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*; 55: 1718-1725
- Piepersberg, W., Aboshanab, K.M., Schmidt-Beißner, H. und Wehmeier, U.F. (2007) *The Biochemistry and Genetics of Aminoglycoside Producers*. 15-118; aus *Aminoglycoside Antibiotics: From Chemical Biology to Drug Discovery*, John Wiley & Sons, Inc.
- Pollastri, G. und McLysaght, A. (2005), Porter: a new, accurate server for protein secondary structure prediction. *Bioinformatics*; 21: 1719-1720
- Popovic, B., Tang, X., Chirgadze, D.Y., Huang, F., Blundell, T.L. und Spencer, J.B. (2006), Crystal structures of the PLP- and PMP-bound forms of BtrR, a dual functional aminotransferase involved in butirosin biosynthesis. *Proteins*; 65: 220-230
- Prammananan, T., Sander, P., Brown, B.A., Frischkorn, K., Onyi, G.O., Zhang, Y., Böttger, E.C. und Wallace, R.J.Jr. (1998), A single 16S ribosomal RNA substitution is responsible for resistance to amikacin and other 2-deoxystreptamine aminoglycosides in *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*. *J Infect Dis.*; 177: 1573-1581
- Punta, M., Coggill, P.C., Eberhardt, R.Y., Mistry, J., Tate, J., Boursnell, C., Pang, N., Forslund, K., Ceric, G., Clements, J., Heger, A., Holm, L., Sonnhammer, E.L., Eddy, S.R., Bateman, A. und Finn, R.D. (2012), The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.*; 40: D290-D301
- Rall, K. und Bordusa, F. (2002), Substrate mimetics-specific peptide ligases: studies on the synthetic utility of a zymogen and zymogen-like enzymes. *J. Org. Chem.*; 67: 9103-9106
- Reger, A.S., Carney, J.M. und Gulick, A.M. (2007), Biochemical and crystallographic analysis of substrate binding and conformational changes in acetyl-CoA synthetase. *Biochemistry*; 46: 6536-6546
- Reger, A.S., Wu, R., Dunaway-Mariano, D. und Gulick, A.M. (2008), Structural characterization of a 140 degrees domain movement in the two-step reaction catalyzed by 4-chlorobenzoate:CoA ligase. *Biochemistry*; 47: 8016-8025
- Rhodes, G. (2006), Crystallography made crystal clear.
- Rosenberg, E.Y., Ma, D. und Nikaido, H. (2000), AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. *J Bacteriol*; 182: 1754-1756
- Schatz, A. und Waksman, S.A. (1944a), Effect of Streptomycin and Other Antibiotic Substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and Related Organisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*; 57: 244-248

- Schatz, A., Waksman, S.A. und Bugle, E. (1944b), Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*; 55: 66-69
- Schluezen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F. und Yonath, A. (2000), Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell*; 102: 615-623
- Schmelz, S. und Naismith, J.H. (2009), Adenylate-forming enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*; 19: 666-671
- Schoenhofen, I.C., Lunin, V.V., Julien, J.P., Li, Y., Ajamian, E., Matte, A., Cygler, M., Brisson, J.R., Aubry, A., Logan, S.M., Bhatia, S., Wakarchuk, W.W. und Young, N.M. (2006), Structural and functional characterization of PseC, an aminotransferase involved in the biosynthesis of pseudaminic acid, an essential flagellar modification in *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.*; 281: 8907-8916
- Schulze, J.O., Schubert, W.D., Moser, J., Jahn, D. und Heinz, D.W. (2006), Evolutionary relationship between initial enzymes of tetrapyrrole biosynthesis. *J. Mol. Biol.*; 358: 1212-1220
- Sheldrick, G.M. (2008), A short history of SHELX. *Acta Crystallogr. A*; 64: 112-122
- Sheldrick, G.M. (2010), Experimental phasing with SHELXC/D/E: combining chain tracing with density modification. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*; 66: 479-485
- Shimizu, T. (1974), Studies on lividomycin. I. In vitro antibacterial activities of LVDM against clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Jpn. J. Antibiot.*; 27: 766-774
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J.D. und Higgins, D.G. (2011), Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst. Biol*; 7: 539-
- Southworth, M.W., Amaya, K., Evans, T.C., Xu, M.Q. und Perler, F.B. (1999), Purification of proteins fused to either the amino or carboxy terminus of the *Mycobacterium xenopi* gyrase A intein. *Biotechniques*; 27: 110-120
- Stanger-Hall, K.F., Lloyd, J.E. und Hillis, D.M. (2007), Phylogeny of North American fireflies (Coleoptera: Lampyridae): implications for the evolution of light signals. *Mol. Phylogenet. Evol.*; 45: 33-49
- Stetefeld, J., Jenny, M. und Burkhard, P. (2006), Intersubunit signaling in glutamate-1-semialdehyde-aminomutase. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*; 103: 13688-13693
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J. (1994), CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*; 22: 4673-4680
- Tokito, T., Shigematsu, S. und Eto, K. (1972), [Clinical evaluation of lividomycin in urinary tract infections]. *Jpn. J. Antibiot.*; 25: 432-435
- Tsukamura, M. (1972), A preliminary trial of lividomycin in patients with pulmonary tuberculosis. *Tubercle.*; 53: 43-46
- Tsukamura, M. (1975), [Therapeutic effect of lividomycin on infections of the respiratory tract (author's transl)]. *Jpn. J. Antibiot.*; 28: 143-148
- Umezawa, H., Ueda, M., Maeda, K., Yagishita, K., Kondo, S., Okami, Y., Utahara, R., Osato, Y., Nitta, K. und Takeuchi, T. (1957), Production and isolation of a new antibiotic: kanamycin. *J Antibiot (Tokyo)*; 10: 181-188
- Vacca, R.A., Giannattasio, S., Capitani, G., Marra, E. und Christen, P. (2008), Molecular evolution of B6 enzymes: Binding of pyridoxal-5'-phosphate and Lys41Arg substitution turn ribonuclease A into a model B6 protoenzyme. *BMC Biochem.*; 19: 9-17
- Vakulenko, S.B. und Mobashery, S. (2003), Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin. Microbiol. Rev.*; 16: 430-450
- Vicens, Q. und Westhof, E. (2001), Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site. *Structure.*; 9: 647-658

- Vicens, Q. und Westhof, E. (2002), Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding site. *Chem. Biol.*; 9: 747-755
- Voet, D. und Voet, J.G. (1995), *Biochemistry*. Wiley
- Waksman, S.A. und Lechevalier, H.A. (1949), Neomycin, a New Antibiotic Active against Streptomycin-Resistant Bacteria, including Tuberculosis Organisms. *Science*; 109: 305-307
- Wallace, C.J. (1993), Understanding cytochrome c function: engineering protein structure by semisynthesis. *FASEB J*; 7: 505-515
- Wallace, C.J. (1995), Peptide ligation and semisynthesis. *Curr Opin Biotechnol*; 6: 403-410
- Wang, L. und Schultz, P.G. (2002), Expanding the genetic code. *Chem Comm (Camb.)*; 1-11
- Wehofsky, N., Kirbach, S.W., Haensler, M., Wissmann, J.D. und Bordusa, F. (2000), Substrate mimetics and freezing strategy: a useful combination that broadens the scope of proteases for synthesis. *Org. Lett.*; 2: 2027-2030
- Wehofsky, N., Koglin, N., Thust, S. und Bordusa, F. (2003), Reverse proteolysis promoted by in situ generated peptide ester fragments. *J. Am. Chem. Soc.*; 125: 6126-6133
- Wetlaufer, D.B. (1962), Ultraviolet Spectra of Proteins and Amino Acids. *Advances in Protein Chemistry*; 17: 303-390
- White, E.H., Raraport, E., Seliger, H.H. und Hopkins, T.A. (1971), The chemi- and bioluminescence of firefly luciferin: An efficient chemical production of electronically excited states. *Bioorg. Chem.*; 1: 92-122
- Wimberly, B.T., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vornrhein, C., Hartsch, T. und Ramakrishnan, V. (2000), Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*; 407: 327-339
- Wong, C., Sridhara, S., Bardwell, J.C. und Jakob, U. (2000), Heating greatly speeds Coomassie blue staining and destaining. *Biotechniques*; 28: 426-8, 430, 432
- Wu, R., Cao, J., Lu, X., Reger, A.S., Gulick, A.M. und Dunaway-Mariano, D. (2008), Mechanism of 4-chlorobenzoate:coenzyme a ligase catalysis. *Biochemistry*; 47: 8026-8039
- Yamamoto, M., Fukuhara, T. und Aoyagi, T. (1973), [Therapeutic effects of lividomycin in the retreatment for pulmonary tuberculosis patients]. *Kekkaku*; 48: 121-127
- Yonus, H., Neumann, P., Zimmermann, S., May, J.J., Marahiel, M.A. und Stubbs, M.T. (2008), Crystal Structure of DltA: Implications for the reaction mechanism of non-ribosomal peptide synthetase adenylation domains. *J. Biol. Chem.*; 283: 32484-32491
- Zhang, X.H. und Chiang, V.L. (1997), Molecular cloning of 4-coumarate:coenzyme A ligase in loblolly pine and the roles of this enzyme in the biosynthesis of lignin in compression wood. *Plant Physiol*; 113: 65-74

Anhang

Abb. A-1: Sequenzalignment von sequentiell verwandten 4CLs

4CL1_soybn	-----MAPSPQEIIFRSPLPDIPIPTHLPPLYSYCFQNLQSFHDRPCLIDG	45
4CL2_rubid	-----MENKHQDDHEFIIFRSKLPDIYIPNHLPLHTYCFENISQFHDRPCLING	48
4CL1_leule	-----METPSMEFIIFRSKLPDIYIPDHLPLHSYVFENLSQVKDRPCLIDG	45
4CL2_sorau	-----MEHHHKDDEFIIFRSKLSDIYXPNHLPLHTYCFENISQFMDRPCLING	47
4CL5_popto	-----MEAVNDQAQEFIIFRSKLPDIHIPNHLPLHTYCFENLSRFKDNPCLING	48
4CL1_poptr	-----MEAENDQAQEFIIFRSKLPDIHIPNHLPLHTYCFENLSRFKDNPCLING	48
4CL1_pophy	-----MEAKNDQAQEFIIFRSKLPDIHIPNHLPLHTYCFENLSRFKDNPCLING	48
CoAL_ricco	----MEDAKIDNNTNNNIHHQEFIIFRSKLPDIYIPNHLPLHTYCFENISQFKDNACLING	56
4CL2_pophy	-----MEANKDQVQEFIIFRSKLPDIYIPNHLPLHTYCFEKLQSFKDNPCLING	48
4CL1_corca	-----MAPQAPQLPQEDFIIFRSKLPDIYIPKHLPLHSYCFENISKVASKPCLING	50
4CL4_popto	-----MEANKDQVKEFIIFRSKLPDIYIANHLPLHTYCFEKLQSFKDNPCLING	48
4CL1_cinca	-----MESPKDHIIFKSKLPDIYIPNHLPLHSYCFQNIHFFADRPCIIDG	44
4CL1_eucca	-----MEAKPSEQREFIIFRSKLPDIYIPDNLSLHAYCFENISEFADRPCVING	49
4CL3_poptr	-----MDAIMNSQEEFIIFRSKLPDIYIPKNLPLHSYVLENLSKYSSKPCLING	48
4CL_popde	-----MNPQEFIIFRSKLPDIYIPKNLPLHSYVLENLSKYSSKPCLING	43
4CL_eucgl	-----MEAKPSEQREFIIFRSKLPDIYIPDNLSLHAYCFENISEFADRPCVING	49
4CL_popto	-----MNPQEEFIIFRSKLPDIYIPKNLPLHSYVLENLSNHSSKPCLING	44
4CL3_popni	-----MDAIMNPQEEFIIFRSKLPDIYIPKNLPLHSYVLENLSKYSSKPCLING	48
4CL_hibca	-----MEANQDGHEFIIFRSKLPDIIPNHLPLHTYCFENLSNFKDGPCLINA	47
4CL_poptrm	-----MNPQEFIIFRSKLPDIYIPKNLPLHSYVLENLSKHSSKPCLING	43
4CL2_tobac	-----MEKDTKQVDIIFRSKLPDIYIPNHLPLHSYCFENISEFSSRPCLING	47
4CL_vanpl	-----MAAAVAIEEQKDIIFRSKLPDIYIPKNLPLHSYCFENISKFSSRPCLING	51
4CL_paufo	-----METTITKQEDIIFRSKLPDIYIPKHLPLHSYCFENISKFSTRPCLING	48
4CL1_tobac	-----MPMETTTETKQSGDLIFRSKLPDIYIPKHLPLHSYCFENISEFSSRPCLING	52
4CL_amofr	-----MAFETEPEKFEFIIFRSKLPDIYIPKHLPLHSYCFENLSEFGSRPCLISA	48
4CL2_soltu	-----MPMDIETKQSGDLIFRSKLPDIYIPKHLPLHSYCFENLSEFNRPCLIDG	50
4CL3_popto	-----MDTITKQKEEFIIFRSKLPDIIPRGLPLHSYVFENFSKYPSKPCLING	48
4CL2_poptr	-----MDTITKQKEEFIIFRSKLPDIIPKGLPLHSYVFENFSKYPSKPCLING	48
4CL_gynbi	-----MTPAPEKEIIFRSKLPDIYIPKHLPLHSYCFENISKFSDRPCLIDG	46
4CL_pethy	-----MPMETE---TNQGDIFRSKLPDIYIPKHLPLHSYCFENISEFSSRPCLING	49
4CL1_soltu	-----MPMDTETKQSGDLIFRSKLPDIYIPKHLPLHSYCFENLSEFNRPCLIDG	50
4CL1_petr	-----MGDCVAPKEDLIIFRSKLPDIYIPKHLPLHTYCFENISKVGDKSCLING	48
4CL_soltu	-----MPMDTETKQSGDLIFRSKLPDIYIPKHLPLHSYCFENLSEFNRPCLIDG	50
4CL2_capan	-----MPME-----NETRDLIFRSKLPDIYIPKHLPLHSYCFENISEFNRPCLIDG	47
4CL2_rutgr	MEVQIQTQIQTQAPGRQTQSDETIIFRSKLPDIIPNHLPLHSYCFQNISRIADRPCLING	60
4CL_tobac	-----MEKDTKHGDIIFRSKLPDIYIPNHLPLHSYCFENISEFSSRPCLING	47
4CL2_salmi	-----MEVPTMPEEIVFRSKLPDIYIPKHLPLHSYCFENISKFSSRPCLING	47
4CL2_petr	-----MGDCVAPKEDLIIFRSKLPDIYIPKHLPLHTYCFENISKVGDKSCLING	48
4CL1_araly	MAPQ----EEVMEKQSNNNNSDVIIFRSKLPDIYIPNHLPLHDIYIFQNISEFATKPCLING	56
4CL_betlu	-----MAIQAKEQEFIIFRSKLPDIYIPKHLPLHSYCFENISKVGSRPCLING	47
4CL_betpl	-----MAIQAKEQEFIIFRSKLPDIYIPKHLPLHSYCFENISKVGSRPCLING	47
4CL1_arath	MAPQEQAQVSVMEKQSNNNNSDVIIFRSKLPDIYIPNHLPLHDIYIFQNISEFATKPCLING	60
4CL1_melof	-----MENPAGQEEIIFRSKLPDIYIPKHLPLHSYCFENISKFSTRPCLING	47
4CL2_arath	MTTQDVIVN--DQNDQKQCSNDVIIFRSKLPDIYIPNHLPLHDIYIFENISEFAAKPCLING	58
4CL_galor	-----MAPFEQDKNEIIFRSKLPDIYIPNHLPLHSYVFQNLSEFGSRPCLINA	48
4CL2_scuba	-----METVENHGDVIFQSKLPDIYIPKHLPLHSYCFENISEHRTKPCLING	47
4CL1_scuba	-----METVENHGDVIFQSKLPDIYIPKHLPLHSYCFENISEHRTKPCLING	47
4CL1_pinma	-----MANGIKKVEHLYRSKLPDIIEISDHLPLHSYCFERVAEFADRPCLING	47
4CL_pinta	-----MANGIKKVEHLYRSKLPDIIEISDHLPLHSYCFERVAEFADRPCLING	47
4CL_pinra	-----MANGIKKVEHLYRSKLPDIIEISDHLPLHSYCFERVAEFADRPCLING	47

:::* * :* : : * : : . * : *

4CL1_soybn	DTGETLTYADVDLAARRIASGLHKIGIRQGDVIMLVLNRNCPQFALAFLGATHRGAVVTTA	105
4CL2_rubid	NTGETFTTYAEVELTSRRVAAGLDKLGIQQNDVVMLLLQNCPEFAFAFLGASYIGAMSTTA	108
4CL1_leule	DTGETLTYADVDELTAARRVAAGLTKLGIQQGDVIMLVLNRNCPQFALAFLGASFAGAAVTTA	105
4CL2_sorau	NNGDFTTYADVDELTSRKVAAGLHKIGIHQTDVIMLLLQNCPEFVFAFLGASNIGAVVTTA	107
4CL5_popto	PTGEIHTTYAEVELTSRKVASGLSKLGIKQGDVILLLLQNSPEFVFAFLGASIIIGAISTTA	108
4CL1_poptr	PTGEIHTTYADVDELTSRKVASGLNKLGIKQGDVILLLLQNSPEFVFAFLGASIIIGAISTTA	108
4CL1_pophy	PTGEIHTTYAEVELTSRKVASGLNKLGIKQGDVILLLLQNSPEFVFAFLGASIIIGAISTTA	108
CoAL_ricco	ATGDVYTYADVDELTSRKVAAGLHKLGIKQNEVIMILLQNSPEFVFAFLGASVLGAISTTA	116
4CL2_pophy	PTGDIYTYADVDELTSRKVASGLYKLGQQGDVILLLLQNSPEFVFAFLGASFIGAISSTA	108
4CL1_corca	TTGQIYTYEEVELTARRVAAGLHKLGVQQRQVIMLLLNTPEFVLSFLGASFLGAVCTAA	110
4CL4_popto	PTGDIYTYADVDELTSRKVASGLYKFGQQGDVILLLLQNSPEFVFAFLGASFIGAISSTA	108
4CL1_cinos	ATGDIIFTYADVDELTSRKVAAGLHHLGVEKGDVIMILLPNCPEFVFAFLGASYRGATTTTA	104
4CL1_eucca	ATGRTYTYAEVELISRRVSAGLNGLGVGQGDVIMLLLQNCPEFVFAFLGASIRGAISTTA	109
4CL3_poptr	ANGDVYTYADVDELTAARRVASGLNKIGIQQGDVIMLLPSSPEFVLAFLGASHRGAIVTAA	108
4CL_popde	ANGDVYTYADVDELTAARRVASGLNKIGIQQGDVIMLLPSSPEFVLAFLGASHRGAIITAA	103
4CL_eucgl	ATGQTYTYAEVELISRRVSAGLNGLGVGQGDVIMLLLNRNCPPEFVFAFLGASYRGAISTTA	109
4CL_popto	ANGDVYTYADVDELTAARRVASGLNKIGIQQGDVIMLLPSSPEFVLAFLGASHRGAIITAA	104
4CL3_popni	ANGDVYTYADVDELTAARRVASGLNKIGIQQGDVIMLLPSSPEFVLAFLGASHRGAIITAA	108
4CL_hibca	PTGRVYTYAQVHLTCRKVAAGLNKLGIQQGDVIMLLLHNSPEFVFAFLGASFRGAIITTA	107
4CL_poptrm	ANGDVYTYADVDELTAARRVASGLNKIGIQQGDVIMLLPSSPEFVLAFLGASHRGAMITAA	103
4CL2_tobac	ANKQIYTYADVELNSRKVAAGLHKQGIQPKDTIMILLPNSPEFVFAFIGASYLGAISTMA	107
4CL_vanpl	ATDEIFTYADVDELISRRVSGSLKLGKQGDTIMILLPNSPEFVFAFLGASFIGSISTMA	111
4CL_paufo	ATNEVYTYEEVELIARKVATGLSKLGIQQGDTILLLLPNSPEYVFAFLGASYIGAISTMA	108
4CL1_tobac	ANDQIYTYAEVELTCRKVAVGLNKLGIQQKDTIMILLPNSPEFVFAFMGASYLGAISTMA	112
4CL_amofr	PTGDVYTYDYDELTAARRVASGLNKLGVQGDVIMLLLNSPEFVFSFLGASYRGAMITAA	108
4CL2_soltu	ANDRIYTYAEVELTSRKVAVGLNKLGIQQKDTIMILLPNCPEFVFAFIGASYLGAISTMA	110
4CL3_popto	ANGDIYTYSDVELTARRAASGLNKLGIQQGDVIMLILPSSPEFVLAFLGASHRGAIITAA	108
4CL2_poptr	ANGDVYTYADVDELTAARRAASGLNKLGIQQGDVIMLILPSSPEFVLAFLGASHRGAIITAA	108
4CL_gynbi	ASGQEYTYADVDELTSRKVASALHQGINKGDVIMILLPNSPEFVYAFIGASYLGAISTMA	106
4CL_pethy	ANNHIYTYADVDELTSRKVAAGLNKLGIQQKDTIMILLPNSPEFVFAFMGASYLGAISTMA	109
4CL1_soltu	ANDRIYTYAEVELTSRKVAVGLNKLGIQQKDTIMILLPNCPEFVFAFIGASYLGAISTMA	110
4CL1_petcr	ATGETFTYSQVELLSRKVASGLNKLGIQQGDTIMLLLNSPEYFFAFLGASYRGAISTMA	108
4CL_soltu	ANDRIYTYAEVELTSRKVAVGLNKLGIQQKDTIMILLPNCPEFVFAFIGASYLGAISTMA	110
4CL2_capan	ANDQIYSYAEVELTSRKVAVGLNKLGVQKDTIMILLPNSPEFVFAFMGASYLGAISTMA	107
4CL2_rutgr	SNGHILTYGEVERTARSIGAGLNKLGVGQRDVMLLLNTPEFVLAFLGASYRGAVSTAA	120
4CL_tobac	ANKQIYTYADVELSSRKVAAGLHKQGIQQKDTIMILLPNSPEFVFAFIGASYLGAISTMA	107
4CL2_salmi	ATGDVYTYEEVEMTARKVASGLSQVGIQQGETIMLLLNTPEYIFAFGLGASYIGAVSTMA	107
4CL2_petcr	ATGETFTYSQVELLSRKVASGLNKLGIQQGDTIMLLLNSPEYFFAFLGASYRGAISTMA	108
4CL1_araly	PTGHVYTYSDVHVISRRIAAGFHKLVNHNDDVVMLLLNSPEFVLSFLAASFRGAIATAA	116
4CL_betlu	LTGKVYTYDYDELTAARKVASGLSKLGIQKGDVVMLLLNSPEFAFVFLGASYLGAMTTAA	107
4CL_betpl	LTGKVYTYDYDELTAARKVASGLSKLGIQKGDVVMLLLNSPEFAFVFLGASYLGAMTTAA	107
4CL1_arath	PTGHVYTYSDVHVISRQIAANFHKLVNQNDVVMLLLNSPEFVLSFLAASFRGATATAA	120
4CL1_melof	ATGDVYTYEEVELTARKVATGLSQLGIQQGETIMLLLNSPEYVFAFLGASYIGAVSTMA	107
4CL2_arath	PTGEVYTYADVHVTSRKLAAGLHNLGVKQHDVVMILLNSPEVVLTFLAASFIAITTTA	118
4CL_galor	PTGKVYTYFDVELTARKVASGLNKLGLKQGDVIMILLNSPEFVFSFLAASYLGAIAATAA	108
4CL2_scuba	ATNEVHTYEEVELISRKVAAGLSHLGLHHGDTIMILLNSPEFVFAFLGASYIGAVSTMA	107
4CL1_scuba	ATNEVHTYEEVELISRKVAAGLSHLGLHHGDTIMILLNSPEFVFAFLGASYIGAVSTMA	107
4CL1_pinma	ATDRTYCFSEVELISRKVAAGLAKLGLQQGQVVMLLLNSPEFAFVFMGASVRGAIVTAA	107
4CL_pinta	ATDRTYCFSEVELISRKVAAGLAKLGLQQGQVVMLLLNSPEFAFVFMGASVRGAIVTAA	107
4CL_pinra	ATDRTYCFSEVELISRKVAAGLAKLGLQQGQVVMLLLNSPEFAFVFMGASVRGAIVTAA	107
	. : :* . * . : * : : : : * . : * : * : * : *	

Anhang

4CL1_soybn	NPFYTPAELAKQATATKTRLVITQSAIVEKIKSFADSSSDVMVMCIDDDFS--YENDGVL	163
4CL2_rubid	NPFYTPAEVAKQAKASNAKLIITQSAIVDKVKDFAKLND-VKVMCVDETSS-----EDVL	162
4CL1_leule	NPLSTPAELAKQATASKSLIITQAAFVEKIKDFADKR-GVSLMCIDSTFP---E'EGIS	161
4CL2_sorau	NPFYTPAEMAKQGRASNAELIITQSAIVDKVKDFALKND-VQIMVVDNAET-EKDGNTYH	165
4CL5_popto	NPFYTPAEVAKQATASKAKLIITQAVYAEKVQQFVKENDHVKIVTVDSPP-----ENYL	162
4CL1_poptr	NPFYTPAEVAKQATASKAKLIITQAVYAEKVQQFVKENDHVKIVTVDSPP-----ENYL	162
4CL1_pophy	NPFYTPAEVAKQATASKAKLIITQAVYAEKVQEFVKENVHVKIVTVDSPP-----ENYL	162
CoAL_ricco	NPFYTPAEIKKQASASNAKLIITQAAIVEKVDFANENG- IKIMTIDSPPPALDDCRDCL	175
4CL2_pophy	NPFYTSAEIAKQATASKAKLIITHAAYAEKVQQFAQENDHVKIMTIDSLT-----ENCL	162
4CL1_corca	NPFYTPAEVAKQAKASNAKLIITQSAIVDKVKDFQENVDVKVMCID-----SAPEGCL	164
4CL4_popto	NPFYTPAEIAKQATASKAKLIITQAAFAEKVQQFAQENDHVKIMTIDSLT-----DNCL	162
4CL1_cinos	NPFYTPQEVSKQAKACNACVVIITQSQYVDKLRDLMQESD-VKVVCIDKAV-----EGCM	157
4CL1_eucca	NPFYTPGEIAKQASAAQAKIVITQAAAYADKVRPFAEENG-LRVVCIDTAP-----EGCL	162
4CL3_poptr	NPFSTPAELAKHAKASRAKLLITQACYVDKVKDFARES-DVKVMCVD-----SAPDGCL	161
4CL_popde	NPFSTPAELAKHAKASRAKLLITQACYEYKVKDFARES-DVKVMCVD-----SAPDGCL	156
4CL_eucgl	NPFYTPGEIAKQASAAQAKIVITQAAAYADKVRPFAEENG-VKVVCIDTAP-----EGCL	162
4CL_popto	NPFSTPAELAKHAKASRAKLLITQACYEYKVKDFARES-DVKVMCVD-----SAPDGCL	157
4CL3_popni	NPFSTPAELAKHAKASRAKLLITQACYHEKVKDFARES-DVKVMCVD-----SAPDGCL	161
4CL_hibca	NPFYTPAEIAKQASASKTRLFITQAVYAEKVKNFALDKD- IKIITIDTTP-----EGCL	160
4CL_poptrm	NPFSTPAELAKHAKASRAKLLITQACYEYKVKDFARES-DVKVMCVD-----SAPDGAS	156
4CL2_tobac	NPLFTPAEVVKQAKASSAKIIVTQACHVNKVKDYAFEND-VKIICIDSAP-----GCL	160
4CL_vanpl	NPFYTPAEVVKQAKASNAKLIITQGCYVDKVKDYACENG-VKIISIDTTTAA-DDAANIL	169
4CL_paufo	NPFYTPAEVVKQAKASNAKLIITQACYVEKVRDYALEKG-VKVMCIDAPS-A-----DCL	161
4CL1_tobac	NPLFTPAEVVKQAKASSAKIITQSCFVGVKVKDYASEND-VKVICIDSAP-----GCL	165
4CL_amofr	NPFYTSAEIAKQAKASNTKLLITQASYVDKVKDLVDK-----LVFVDS---P---PDGHM	157
4CL2_soltu	NPLFTPAEVVKQAKASSAKIIVTQACFAGKVKDYAIEND-LKVICVDSAP-----GCV	163
4CL3_popto	NPLFTPAELAKQAKASAKLIITQACYVDKVKDYAQEN-DVKVMCVD-----SAPDVCL	161
4CL2_poptr	NPFSTPAELAKQAKASAKLIITQACYVDKVKDYAQON-DVKVMCVD-----SAPDVCL	161
4CL_gynbi	NPFYTPAEI IKQAKASNAKLIITQSAHVSKVKRFSSENS-ITIVCIDSAP-----GCL	159
4CL_pethy	NPLFTPAEVVKQAKASNAKLIITQACFVNKVKDYAFDNN-LNVICIDSAP-----GCI	162
4CL1_soltu	NPLFTPAEVVKQAKASSAKIIVTQACFAGKVKDYAIEND-LKVICVDSVPE-----GCV	163
4CL1_petcr	NPFYTPAEVVKQAKASNAKLIITQACYVDKVKDYAAEKN-IQIICIDDAP-Q-----DCL	161
4CL_soltu	NPLFTPAEVVKQAKASSAKIITQACFAGKVKDYAIEND-LKVICVDSAP-----GCV	163
4CL2_capan	NPLFTPAEVVKQAKASSAKIITLACYIGKVKDYATEND-VKVICIDSAP-----GCI	160
4CL2_rutgr	NPFYTPAEI IQKQVKASGAKLIITQACHVDKLDIP----EVKIMCID-----SPPDGCL	170
4CL_tobac	NPLFTAAEVVKQVKASGAKIIVTQACHVNKVKDYALENN-VKIICIDSAP-----GCL	160
4CL2_salmi	NPFYTPAEVVKQAKASAAKLIITQACYVDKVRDYAAEAG-AKVVCIDAPP-A-----GCL	160
4CL2_petcr	NPFYTPAEVVKQAKASNAKLIITQACYVDKVKDYAAEKN-IQIICIDDAP-Q-----DCL	161
4CL1_araly	NPFYTPAEIAKQAKASNTKLIITQACFVNDKIKSLQNDG-GVVIVCIDDNESV-PIPDGCL	174
4CL_betlu	NPFCTAGEVSKQAKASNAKIVVTQACYVDKVKDYANENG-VKIICIDSPPE-----DCL	160
4CL_betpl	NPFCTAGEVSKQAKASNAKIVVTQACYVDKVKDYTNENG-VKIICIDSPPE-----DCL	160
4CL1_arath	NPFYTPAEIAKQAKASNTKLIITQACYVDKIKPLQNDG-GVVIVCIDDNESV-PIPEGCL	178
4CL1_melof	NPFYTPAEVVKQAKASAAKLIITQACYVDKVKDYASDNG-VKVMCIDAPP-P-----GCL	160
4CL2_arath	NPFYTPAEISKQAKASAAKLIITQASRYVDKIKNLQNDG-VLI-V---TTSD-AIPENCL	172
4CL_galor	NPFYTPAEI GKQAKASNAKLIITQACYEYKVKELLNDINDHKMVLIDSLFTT---DDQVV	165
4CL2_scuba	NPFYTPAEVVKQAKASNAKLIITQACYVKKVWDYAVENG-VKVMCVDSP-P-EAAGECL	164
4CL1_scuba	NPFYTPAEVVKQAKASNAKLIITQACYVKKVWDYAVENG-VKVMCVDSP-P-EAAGECL	164
4CL1_pinma	NPFYKPGEIAKQAKAAGARIIVTLLAAYVEKLADLQSHD--VLVITIDDAPK-----EGCQ	160
4CL_pinta	NPFYKPGEIAKQAKAAGARIIVTLLAAYVEKLADLQSHD--VLVITIDDAPK-----EGCQ	160
4CL_pinra	NPFYKPGEIAKQAKAAGARIIVTLLAAYVEKLADLQSHD--VLVITIDDAPK-----EGCQ	160
**:	*: *: : : : : * . . : :	:

Anhang

4CL1_soybn	HFSTLSNADET-----EAPAVKINPDELVALPFSSGTTGLPKGVMLSHKNLVTITIAQLVD	218
4CL2_rubid	HFSELMASADES-----ETPAVKINPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	217
4CL1_leule	HFSELLTQADEA-----CMPAVKISPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQLVD	216
4CL2_sorau	HFSELTSADEN-----DIPAVKINPENVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	220
4CL5_popto	HFSELTNSDED-----DIPAVEINPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	217
4CL1_poptr	HFSELTNSDED-----DIPAVEINPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	217
4CL1_pophy	HFSELTNSDED-----DIPAVEINPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	217
CoAL_ricco	HFSELTKADEN-----DIPAVKINPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKSLVTSVAQQVD	230
4CL2_pophy	HFSELTSSDEN-----EIPTVKIKPDDIMALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	217
4CL1_corca	HFSELTQADEN-----DLPEVEINPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	219
4CL4_popto	HFSELTSSDEN-----EIPAVKIKPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	217
4CL1_cinos	HFSELAEADES-----ELPEVDISPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLITSVAQQVD	212
4CL1_eucca	HFSELMQADEN-----AAPAADVKPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHRGQVTSVAQQVD	217
4CL3_poptr	HFSELTQADEN-----EVPQVDFSPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLITSVAQQVD	216
4CL_popde	HFSELTQADEN-----EVPQVDFSPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLITSVAQQVD	211
4CL_eucgl	HFSELMQADEN-----AAPAADVKPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHRGQVTSVAQQVD	217
4CL_popto	HFSELTQADEN-----EAPQVDISPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLITSVAQQVD	212
4CL3_popni	HFSELTQADEN-----EVPQVDFSPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLITSVAQQVD	216
4CL_hibca	HFSELTRVHED-----EIPAVKINPDDVVALPFSSGTTGLPKGVMLTHKSLVTSVAQHVG	215
4CL_poptrm	LFRRAHTQADEN-----EVPQVDISPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLITSVAQQVD	211
4CL2_tobac	HFSVLTQ-ANE---HDI-PEVEIQPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	215
4CL_vanpl	HFSELTG-ADE---NEM-PKVEISPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	224
4CL_paufo	QFSELTS-ADE---RDM-PAVKIHPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	216
4CL1_tobac	HFSELTQ-SDE---HEI-PEVKIQPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	220
4CL_amofr	HYSELRE-ADE---SDM-PEVKINPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLSHKGLATSIAQQVD	212
4CL2_soltu	HFSELIQ-SDE---HEI-PDVKIQPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	218
4CL3_popto	HFSDLTQADDD-----DMPQVDISPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHRGLITSVAQQVD	216
4CL2_poptr	HFSELTQADDN-----DMPQVDIRPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLITSVAQQVD	216
4CL_gynbi	HYSELLS-GDE---SKL-PEVEISPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	214
4CL_pethy	HFSELTQ-ADE---HDI-PDVKIQSDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	217
4CL1_soltu	HFSELIQ-SDE---HEI-PDVKIQPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	218
4CL1_petr	HFSKLME-ADE---SEM-PEVVINSDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	216
4CL_soltu	HFSELIQ-SDE---HEI-PDVKIQPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	218
4CL2_capan	HFSELTQ-SDE---HEI-PDVKIQPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	215
4CL2_rutgr	HFSELTDQSVQEEEFVDSVEILPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	230
4CL_tobac	HFSVLTQ-ADE---HDI-PEVEIQPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	215
4CL2_salmi	TFSELTA-ADE---REM-PAVKIHPEDAVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	215
4CL2_petr	HFSKLME-ADE---SEM-PEVVIDSDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	216
4CL1_araly	RFTELTQSTTE---SSDVIDSVEISPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	232
4CL_betlu	HFSELTK-ADE---NDV-AEVDISPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	215
4CL_betpl	HFSELTK-ADE---NDV-AEVDISPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	215
4CL1_arath	RFTELTQSTTE---ASEVIDSVEISPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	236
4CL1_melof	PFSELTS-ADE---RDM-PAVKIHPEDAVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	215
4CL2_arath	RFSELTQSEEP---RVDSI-PEKISPDDVVALPFSSGTTGLPKGVMLTHKGLVTSVAQQVD	229
4CL_galor	HFSKLSEEADE---NELPEEVKINPEDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVSSIAQQVD	222
4CL2_scuba	EFSQLTS-ADE---GDM-PEVEINSDDVVALPYSSGTTGLPKAVMLTHKGLVTSVAQQVD	219
4CL1_scuba	EFSQLTS-ADE---GDM-PEVEINSDDVVALPYSSGTTGLPKALMLTHKGLVTSVAQQVD	219
4CL1_pinma	HISVLTEADET-----QCPAVKIHPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVSSVAQQVD	215
4CL_pinta	HISVLTEADET-----QCPAVKIHPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVSSVAQQVD	215
4CL_pinra	HISVLTEADET-----QCPAVTIHPDDVVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGLVSSVAQQVD	215

: :*:***:*:*:*:*:*: :*:** *

Anhang

4CL1_soybn	GENPHQYTHSEDEVLLCVLPMFHIIYALNSILLCGIRSGAAVLILQKFEITTLLELIEKYKV	278
4CL2_rubid	GENPNLYFHKEDVILCVLPLFHIYSLNSVFLCGLRVGAAAILIMQKFEINKLLELVEKEKV	277
4CL1_leule	GENPNQYTTSDDVHICVLPFHIYALNSILLCCIRAGAAITMGKYDIATLLKMIKTYKV	276
4CL2_sorau	GENPNLYFHSEDEVILCVLPLFHIYSLNSVFLCGLRVGAAAILIMQKFEITKLELVENYKV	280
4CL5_popto	GENPNLYFHEKDVILCVLPLFHIYSLNSVLLCGLRVGSAAILIMQKFEIVTLMELVQYKYV	277
4CL1_poptr	GENPNLYFHEKDVILCVLPLFHIYSLNSVLLCGLRVGSAAILIMQKFEIVTLMELVQYKYV	277
4CL1_pophy	GENPNLYFHEKDVILCVLPLFHIYSLNSVLLCGLRVGSAAILIMQKFEIVTLMELVQYKYV	277
CoAL_ricco	GENPNLYFHEKDVILCCLPLFHIYSLNSVLLCGLRVGAAAILIMQKFEITALMELVQYKYV	290
4CL2_pophy	GENPNLYFHERDVILCVLPLFHIYSLNSVFLCGLRAGSAIIVMOKFDIVSMDLVQYKYV	277
4CL1_corca	GENPNLYFHSDDVILCTPLFHIYALNSIMLCGLRAGAAAILIMQKFEIGLLLDLIQYKI	279
4CL4_popto	GENPNLYFHERDVILCVLPLFHIYSLNSVFLCGLRAGSAIIVMOKFETVALMDLVQYKYV	277
4CL1_cinos	GDNPNLYFKKEDVILCCLPLFHIYSLNSVFLCGLRVGAAAILIMQKFDIVALMELVQYKYV	272
4CL1_eucca	GDNPNLYFHKEDVILCTPLFHIYSLNSVMFCALRVGAAAILIMQKFEIMALMELVQYRYV	277
4CL3_poptr	GDNPNLYFHSEDEVILCVLPMFHIIYALNSIMLCGLRVGASILIMPKFDIGTLLGLIEKYKV	276
4CL_popde	GDNPNLYFHSEDEVILCVLPMFHIIYALNSIMLCGRRVGASILIMPKFDIGTLLGLIEKYKV	271
4CL_eucgl	GDNPNLYHHKEDVILCTPLFHIYSLNSVMFCALRVGAAAILIMQKFEIVALMELVQYRYV	277
4CL_popto	GDNPNLYFHSEDEVILCVLPMFHIIYALNSIMLCGLRVGAPILIMPKFEIGSLLGLIEKYKV	272
4CL3_popni	GDNPNLYFHSEDEVILCVLPMFHIIYALNSIMLCGLRVGASILIMPKFDIGTLLGLIEKYKV	276
4CL_hibca	GDNPNLYFHERDVILCCLPLFHIYSLNCSILLCSLRAGAAAILIMQKFEILPLTELVEKYSV	275
4CL_poptrm	GDNPNLYFHSEDEVILCVLPMFHIIYALNSMMLCGLRVGASILIMPKFEIGSLLGLIEKYKV	271
4CL2_tobac	GENPNLYIHSEDEVMLCVLPLFHIYSLNSVLLCGLRVGAAAILIMQKFDIVSFLELIQRYKV	275
4CL_vanpl	GENPNLYMHSDDVLLCVLPLFHIYSLNSVLLCGLRAGSGILIMQKFEIVPFLELIQYKYV	284
4CL_paufo	GENPNLYIHSEDEVMLCVLPLFHIYSLNSVLLCGLRVGAAAILIMQKFDIVPFLELIQYKYV	276
4CL1_tobac	GENANLYMHSEDEVLMCVLPLFHIYSLNSILLCGLRVGAAAILIMQKFDIAPFLELIQYKYV	280
4CL_amofr	GENPNLYFHNEDEVILCVLPLFHIYSLNSVLLCGLRAKAAAILIMPKFEINALLGLIQKHRV	272
4CL2_soltu	GENANLYMHSDDVLMCVLPLFHIYSLNSVLLCALRVGAAAILIMQKFDIAQFLELIPKHKV	278
4CL3_popto	GDNPNLYFHREDEVILCVLPMFHIIYALNSIMLCGLRAGAAAILIMPKFEIGSLLGLIEKYKV	276
4CL2_poptr	GDNPNLYFHSEDEVILCVLPMFHIIYALNSIMLCGLRVGAAAILIMPKFEIGSLLGLIEKYKV	276
4CL_gynbi	GENPNLWIHSEDEVILCVLPLFHIYSLNSILLCGLRAGAAAILIMQKFDIVPFLLQLIEKYKV	274
4CL_pethy	GENANLYMHSEDEVLMCVLPLFHIYSLNSVLLCGLRVGAAAILIMQKFDIVQFCELEIEKYKV	277
4CL1_soltu	GENANLYMHSDDVLMCVLPLFHIYSLNSVLLCALRVGAAAILIMQKFDIAQFLELIPKHKV	278
4CL1_petr	GDNPNLYMHSEDEVMICILPLFHIYSLNAVLCCGLRAGVTILIMQKFDIVPFLELIQYKYV	276
4CL_soltu	GENANLYMHSDDVLMCVLPLFHIYSLNSVLLCALRVGAAAILIMQKFDIAQFLELIPKHKV	278
4CL2_capan	GENANLYMHSEDEVLMCCLPLFHIYSLNSVLLCGLRIGAAAILIMQKFDIVHFLELIQYKYV	275
4CL2_rutgr	GENPNLYFHSEDEVILCVLPLFHIYALNSIMLCGLRAGAAAILIMQKFEINSLRLRLTERYKV	290
4CL_tobac	GENRNLYIHSEDEVLLCVLPLFHIYSLNSVLLCGLRVGAAAILIMQKFDIVPFLELIQYKYV	275
4CL2_salmi	GENPNLYIHSEDEVMLCVLPLFHIYSLNSVLLCGLRVGAAAILIMQKFEIVPFLLDLMQRYKV	275
4CL2_petr	GDNPNLYMHSEDEVMICILPLFHIYSLNAVLCCGLRAGVTILIMQKFDIVPFLELIQYKYV	276
4CL1_araly	GENPNLYFHSDDVILCVLPMFHIIYALNSIMLCGLRVGAAAILIMPKFEINLLELIQRCYV	292
4CL_betlu	GENPNLYYHSEDEVILCVLPLFHIYSLNSVFLCGLRAGASILILPKFEIVSLLQLIQKHKV	275
4CL_betpl	GENPNLYYHSEDEVILCVLPLFHIYSLNSVFLCGLRAGASILILPKFEIVSLLQLIQKHKV	275
4CL1_arath	GENPNLYFHSDDVILCVLPMFHIIYALNSIMLCGLRVGAAAILIMPKFEINLLELIQRCYV	296
4CL1_melof	GENPNLYIHSEDEVMLCVLPLFHIYSLNSVLLCGLRVGAAAILIMQKFDIVPFLELMQYKYV	275
4CL2_arath	GENPNLYFNRRDDVILCVLPMFHIIYALNSIMLCGLRVGATILIMPKFEITLLELIQRCYV	289
4CL_galor	GENPNLYYKCEDVILCVLPLFHIYSLNSVLLCGLRAKATILIMPKFDIVVFLNLVNHGKV	282
4CL2_scuba	GENPNLYIHSDDVILCVLPLFHIYSLNSVLLCGLRVGAAAILIMQKFDIVPFLELIQRYKV	279
4CL1_scuba	GENPNLYIHSDDVILCVLPLFHIYSLNSVLLCGLRVGAAAILIMQKFDIVPFLELIQRYKV	279
4CL1_pinma	GENPNLYFHSEDEVILCVLPLFHIYSLNSVLLCALRAGAAATLIMQKFNLTTCLELIQYKYV	275
4CL_pinta	GENPNLYFHSDDVILCVLPLFHIYSLNSVLLCALRAGAAATLIMQKFNLTTCLELIQYKYV	275
4CL_pinra	GENPNLYFHSDDVILCVLPLFHIYSLNSVLLCALRAGAAATLIMQKFNLTTCLELIQYKYV	275
	: . : ** :* **:*:*:*:*:*:*:* * * * : *:* :	

Anhang

4CL1_soybn	TVASFVPPIVLALVKS-GETHRYDLSSIRAVVTGAAPLGGEIQEAVKARLPHATFGQGYG	337
4CL2_rubid	TIAPFVPPIVLSIAKC-PDLHRYDLSSIRVMMSGGAAPMGKELEDTVRAKLPNAKLGQGYG	336
4CL1_leule	TMASFVPPILLNIVKS-EEVDRHDLSSIRTIVTGAAPVSVELEQALRAKLPAILGQGYG	335
4CL2_sorau	TIAPFVPPIVLSIAKS-PDLDRYDLSSIRVMMSGGAAPMGKELEDTVRAKLPNAKLGQGYG	339
4CL5_popto	TIAPFVPPVVLAVAKC-PVVDKYDLSSIRTVMSGGAAPMGKELEDTVRAKLPNAKLGQGYG	336
4CL1_poptr	TIAPFVPPVVLAVAKC-PVVDKYDLSSIRTVMSGGAAPMGKELEDTVRAKLPNAKLGQGYG	336
4CL1_pophy	TIAPFVPPVVLAVAKC-PVVDKYDLSSIRTVMSGGAAPMGKELEDTVRAKLPNAKLGQGYG	336
CoAL_ricco	TIAPFVPPIVLSIAKS-PAVDKYDLSSIRTVMSGGAAPMGKELEDTVRAKLPNAKLGQGYG	349
4CL2_pophy	TIAPLVPPICLAIKAKS-PVVDQYDLSSIRTVLSGAAPLGKELEDTVRAKLPNAKLGQGYG	336
4CL1_corca	TIAPMVPPIVLAIKAKS-SETEKYDLSSIRVMKSGGAAPLGKELEDAVRAKFPKAKLGQGYG	338
4CL4_popto	TIAPLVPPIFLAIKAKS-PVVDQYDLSSIRTVLSGAAPMGKELEDTVRAKLPNAKLGQGYG	336
4CL1_cinos	TIAPFVPPIVLAIKAKS-PEVDRYDLSSIRTVMSGGAAPMGKELEDILRAKIPNAKLGQGYG	331
4CL1_eucca	TILPIVPPIVLAIKAKS-AEVDKYDLSSIRTVMSGGAAPMGKELEDTVRAKLPNAKLGQGYG	336
4CL3_poptr	SIAPVVPPVMLAIKAKS-PDLDKHDLSSLRMIKSGGAPLGKELEDTVRAKFPQARLGQGYG	335
4CL_popde	SIAPVVPPVMLAIKAKS-PDLDKHDCSSLRMIKSGGAPLGKELEDTVRAKFPQARLGQGYG	330
4CL_eucgl	TILPIVPPIVLAIKAKS-AEVDKYDLSSIRTVMSGGAAPMGKELEDAVRAKLPNAKLGQAYG	336
4CL_popto	SIAPVVPPVMMKIAKS-PDLDKHDLSSLRMIKSGGAPLGKELEDTVRAKFPQARLGQGYG	331
4CL3_popni	SIAPVVPPVMLAIKAKS-PDLDKHDLSSLRMIKSGGAPLGKELEDTVRAKFPQARLGQGYG	335
4CL_hibca	TIAPFVPPIILAIKAKT-PDIQKYDLSSIRVMISGAAPMGKLEDAVRDRLPNAKLGQGYG	334
4CL_poptrm	SIAPVVPPVMMKIAKS-PDLDKHDLSSLRMIKSGGAPLGKELEDTVRAKFPQARLGQGYG	330
4CL2_tobac	TIGPFVPPIVLAIKAKS-PMVDDYDLSSVRTVMMSGGAAPLGKELEDTVRAKFPNAKLGQGYG	334
4CL_vanpl	TIGPFVPPIVLAIKAKS-TVVDNYDLSSVRTVMMSGGAAPLGKELEDAVRAKFPNAKLGQGYG	343
4CL_paufo	TIGPFVPPIVLAIKAKS-PVVDKYDLSSVRTVMMSGGAAPLGKELEDAVRKIFPNAKLGQGYG	335
4CL1_tobac	SIGPFVPPIVLAIKAKS-PIVDSYDLSSVRTVMMSGGAAPLGKELEDAVRTKFPNAKLGQGYG	339
4CL_amofr	TIAPIVPPIVLAIKAKS-PDLEKYDLSSIRVLKSGGASLGKELEDTVRAKFPKAKLGQGYG	331
4CL2_soltu	TIGPFVPPIVLAIKAKS-PLVHNYDLSSVRTVMMSGGAAPLGKELEDAVRAKFPNAKLGQGYG	337
4CL3_popto	SIAPVVPPVMLAIKAKS-PDLDKHDLSSLRMLKSGGAPLGKELEDTVRAKFPQARLGQGYG	335
4CL2_poptr	SIAPVVPPVMMKIAKS-PDLDKHDLSSLRMLKSGGAPLGKELEDTVRAKFPQARLGQGYG	335
4CL_gynbi	TIGPFVPPIVLTIANNEKIVDKYDLSSIRTVMSGGAAPLGKELEDTVRMKIPNAKLGQGYG	334
4CL_pethy	TIGPFVPPIVLAIKAKS-PVVDNYDLSSVRTVMMSGGAAPLGKELEDAVRKIFPNAKLGQGYG	336
4CL1_soltu	TIGPFVPPIVLAIKAKS-PLVDNYDLSSVRTVMMSGGAAPLGKELEDAVRAKFPNAKLGQGYG	337
4CL1_petcr	TIGPFVPPIVLAIKAKS-PVVDKYDLSSVRTVMMSGGAAPLGKELEDAVRAKFPNAKLGQGYG	335
4CL_soltu	TIGPFVPPIVLAIKAKS-PLVHNYDLSSVRTVMMSGGAAPLGKELEDAVRAKFPNAKLGQGYG	337
4CL2_capan	TIGPFVPPIVLAIKAKS-PLVDHYDLSSVRTVMMSGGAAPLGKELEDVTRTKFPNAKLGQGYG	334
4CL2_rutgr	TVAPVVPPIVLAMAKS-PEIEKYNLSSIRILKSGAAPLGKELEDVRAKFPNATLGQGYG	349
4CL_tobac	TIGPFVPPIVLAIKAKS-PMVDDYDLSSVRTVMMSGGAAPLGKELEDTVRAKFPNAKLGQGYG	334
4CL2_salmi	TIGPFVPPIVLAIKAKS-PLVAKYDLSSVVMMSGGAAPLGKELEDVTRTKFPNAKLGQGYG	334
4CL2_petcr	TIGPFVPPIVLAIKAKS-PVVDKYDLSSVRTVMMSGGAAPLGKELEDAVRAKFPNAKLGQGYG	335
4CL1_araly	TVAPMVPPIVLAIKAKS-PETEKYDLSSIRVVKSGAAPLGKELEDAVSAKFPNAKLGQGYG	351
4CL_betlu	TVMPVPPIVLAIKAKT-PDLDKYDLSSVVMKLSGGAPLGKEIEETVKAKFPNALFGQGYG	334
4CL_betpl	TVMPVPPIVLAIKAKT-PDLDKYDLSSVVMKLSGGAPLGKEIEETVKAKFPNALFGQGYG	334
4CL1_arath	TVAPMVPPIVLAIKAKS-SETEKYDLSSIRVVKSGAAPLGKELEDAVNAKFPNAKLGQGYG	355
4CL1_melof	TIGPFVPSIVLAIKAKS-PLVGKYDISSVMMMSGGAAPLGKELEDVTRTKFPNAKLGQGYG	334
4CL2_arath	TVAMVVPPIVLAIKAKS-PETEKYDLSSVVMKSGAAPLGKELEDAISAKFPNAKLGQGYG	348
4CL_galor	SVAPVVPPIVLAIKAKS-PDLNKYDLSSIRILKSGGAPLGKELEDTVRAKFPKAILGQGYG	341
4CL2_scuba	TIGPFVPPIVLAIKAKS-PVVGNYDLSSIRTVMSRAAPLGKELEEAVRKIFPNAKLGQGYG	338
4CL1_scuba	TIGPFVPPIVLAIKAKS-PVVGNYDLSSIRTVMSGGAAPLGKELEEAVRKIFPNAKLGQGYG	338
4CL1_pinma	TVAPIVPPIVLDITKS-PIVSQYDVSSVRIIMSGAAPLGKELEDALRERFPKAIKFGQGYG	334
4CL_pinta	TVAPIVPPIVLDITKS-PIVSQYDVSSVRIIMSGAAPLGKELEDALRERFPKAIKFGQGYG	334
4CL_pinra	TVAPIVPPIVLDITKS-PIVSQYDVSSVRIIMSGAAPLGKELEDALRERFPKAIKFGQGYG	334
	:: .** : : :: : : **:: : : : : : : : : * * : ** .**	

Anhang

4CL1_soybn	MTEAGP-LAISMAFAKVPSKIKPGACGTVVRNAEMKIVDTETGDSLPRNKHGEICIGTK	396
4CL2_rubid	MTEAGPVLMSCLAFAKEPYEIKSGACGTVVRNAEMKIIDPDTNESLPRNQSGEICIRGSQ	396
4CL1_leule	MTEGGP-LSISLSFAKEPVEMKSGACGSVIRNAEMKIVDIETGASLPRNRAGEICIRGNQ	394
4CL2_sorau	MTEAGPALSMCLAFAKEPFEIKSGACGTVVRNAEMKIVDPDTGASLPRNQAGEICIRGSQ	399
4CL5_popto	MTEAGPVLMSCLAFAREPFEIKSGACGTVVRNAEMKIVDPDTGRSLPRNQAGEICIRGSQ	396
4CL1_poptr	MTEAGPVLMSCLAFAKEPFEIKSGACGTVVRNAEMKIVDPDTGRSLPRNQAGEICIRGSQ	396
4CL1_pophy	MTEAGPVLMSCLAFAKEPFEIKSGACGTVVRNAEMKIVDPDTGRSLPRNQSGEICIRGSQ	396
CoAL_ricco	MTEAGPVLMSCLAFAKEPFEIKSGACGTVVRNAEMKIVDPDTGKSLQRNQAGEICIRGSQ	409
4CL2_pophy	MTEAGPVIAMCLAFAKEPFEIKSGACGTVVRNAEMKIVDPETGESQPRNKTGEICIRGCQ	396
4CL1_corca	MTEAGPVIAMCLGFAKEPFEIKSGACGTVVRNAEMKIVDPDTGASLPRNQAGEICIRGDQ	398
4CL4_popto	MTEAGPVIAMCLAFAKEPFEIKSGACGTVVRNAEMKIVDPETGDSQPRNKAGEICIRGSQ	396
4CL1_cinos	MTEAGPVLMSCLAFAKEPFEIKSGACGTVVRNAELKIVDPETGASLPRNQAGEICIRGSQ	391
4CL1_eucca	MTEAGPVLAMCLAFAKEPFEIKSGACGTVVRNAEMKIVDPETGASLPRNQAGEICIRGHQ	396
4CL3_poptr	MTEAGPVLAMCLAFAKEPFDIKPGACGTVVRNAEMKIVDPETGASLPRNQAGEICIRGDQ	395
4CL_popde	MTEAGPVLAMCLAFAKEPFDIKPGACGTVVRNAEMKIVDPETGASLPRNQAGEICIRGDQ	390
4CL_eucgl	MTEAGPVLAMCLAFAKEPFEIKSGACGTVVRNAEMKIVDPETGASLPRNQAGEICIRGHQ	396
4CL_popto	MTEAGPVLAMCLAFAKEPFDIKPGACGTVVRNAEMKIVDPETGASLPRNQAGEICIRGDQ	391
4CL3_popni	MTEAGPVLAMCLAFAKEPFDIKPGACGTVVRNAEMKIVDPETGASLPRNQAGEICIRGDQ	395
4CL_hibca	MTET--VLALNLAFAKEPWETKSGACGTVVRNAEMKIVDPETGTSLPRNQSGEICIRGSQ	392
4CL_poptrm	MTEAGPVLAMCLAFAKEPFDIKPGACGTVVRNAEMKIVDPETGVSLPRNQAGEICIRGDQ	390
4CL2_tobac	MTEAGPVLAMCLAFAKEPFEIKSGACGTVVRNAEMKIVDPKTGNSLPRNQSGEICIRGDQ	394
4CL_vanpl	MTEAGPVLAMCLAFAKEPFDIKSGACGTVVRNAEMKIVDPETGSSLPRNHPGEICIRGDQ	403
4CL_paufo	MTEAGPVLAMCLAFAKEPFEIKSGACGTVVRNAEMKIVDIETGASLGRNQAGEICIRGDQ	395
4CL1_tobac	MTEAGPVLAMCLAFAKEPFDIKSGACGTVVRNAEMKIVDPDTGCSLPRNQAGEICIRGDQ	399
4CL_amofr	MTEAGPVLTMCLAFAKEPIDVKPGACGTVVRNAEMKIVDPETGNSLPRNQSGEICIRGDQ	391
4CL2_soltu	MTEAGPVLAMCLAFAKEPFDIKSGACGTVVRNAEMKIVDPDTGCSLPRNQAGEICIRGDQ	397
4CL3_popto	MTEAGPVLAMCLAFAKEPFDIKPGACGTVVRNAEMKIVDPETGSSLPRNLPGEICIRGDQ	395
4CL2_poptr	MTEAGPVLAMCLAFAKEPFDIKPGACGTVVRNAEMKIVDPETGSSLPRNLPGEICIRGDQ	395
4CL_gynbi	MTEAGPVLAMCLAFAKEPYDIKSGACGTVVRNAEMKIVDPDTGLSLPRNQAGEICIRGDQ	394
4CL_pethy	MTEAGPVLAMCLAFAKEPFDIKSGACGTVVRNAEMKIVDPDTGCSLPRNQAGEICIRGDQ	396
4CL1_soltu	MTEAGPVLAMCLAFAKEPFDIKSGACGTVVRNAEMKIVDPDTGCSLPRNQAGEICIRGDQ	397
4CL1_petr	MTEAGPVLAMCLAFAKEPYEIKSGACGTVVRNAEMKIVDPETNASLPRNQAGEICIRGDQ	395
4CL_soltu	MTEAGTVLTMCLAFAKEPFDIKSGACGTVVRNAEMKIVDPDTGCSLPRNQAGEICIRGDQ	397
4CL2_capan	MTEAGPVLAMCLAFAKEPFEIKSGACGTVVRNAEMKIVDPDTGCSLPRNQAGEICIRGDQ	394
4CL2_rutgr	MTEAGPVLAMCLSFAKKPFKIKAGACGTVVRNAEMKIIDPESGASLPRNKAGEICIRGDQ	409
4CL_tobac	MTEAGPVLAMCLAFAKEPFEIKSGACGTVVRNAEMKIVDPETGNSLPRNQSGEICIRGDQ	394
4CL2_salmi	MTEAGPVLMSCLAFAKEPFEIKSGACGTVVRNAEMKIIDPQTVSLGRNQSGEICIRGDQ	394
4CL2_petr	MTEAGPVLAMCLAFAKEPYEIKSGACGTVVRNAEMKIVDPETNASLPRNQAGEICIRGDQ	395
4CL1_araly	MTEAGPVLAMSLGFAKEPFPVKSGACGTVVRNAEMKIVDPDTGDSLPRNQAGEICIRGHQ	411
4CL_betlu	MTEAGPVLAMCLAFAKEPMQVKSACGTVVRNAEMKIVDPETGASLARNQAGEICIRGDQ	394
4CL_betpl	MTEAGPVLAMCLAFAKEPMEVKSACGTVVRNAEMKIVDPETGASLPRNQAGEICIRGDQ	394
4CL1_arath	MTEAGPVLAMSLGFAKEPFPVKSGACGTVVRNAEMKIVDPDTGDSLPRNQAGEICIRGHQ	415
4CL1_melof	MTEAGPVLMSCLAFAKEPFEIKSGACGTVVRNAEMKIVDPETGASLGRNQSGEICIRGDQ	394
4CL2_arath	MTEAGPVLAMSLGFAKEPFPVKSGACGTVVRNAEMKILDPDTGDSLPRNKAGEICIRGNQ	408
4CL_galor	MTEAGPVLTMCLAFAKEALNVKAGACGTVVRNAEMKIVDPETGHSLPRNQSGEICIRGDQ	401
4CL2_scuba	MTEAGPVLAMCLAFAKEGFEIKSGACGTVVRNAEMKIVDIETAASLGRNQAGEICIRGDQ	398
4CL1_scuba	MTEAGPVLAMCLAFAKEGFEIKSGACGTVVRNAEMKIVDIETAASLGRNQAGEICIRGDQ	398
4CL1_pinma	MTEAGPVLAMNLAFAKNPFPVKSGACGTVVRNAQIKILDDETGESLPHNQAGEICIRGPE	394
4CL_pinta	MTEAGPVLAMNLAFAKNPFPVKSGACGTVVRNAQIKILDDETGESLPHNQAGEICIRGPE	394
4CL_pinra	MTEAGPVLAMNLAFAKNPFPVKSGACGTVVRNAQIKILDDETGESLPHHQAGEICIRGPE	394
***	::: :.***: * *:*:*:*:*:*:*:* * : * :. *** * * :	

Anhang

4CL1_soybn	VMKGYLNDPEATERTVDKEGWLHTGDIGFIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	456
4CL2_rubid	IMKGYLNDPEATENTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	456
4CL1_leule	VMKGYLNDPEATKTTIDEEGWLHTGDIGHVDDDDDEV	FVDRLKEIKYKGFQVAPAELEA	454
4CL2_sorau	IMKGYLNDPEATERTVDKQGWLHTGDIGYIDGDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	459
4CL5_popto	IMKGYLNDPEATERTIDNDGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	456
4CL1_poptr	IMKGYLNDPEATERTVDNDGWLHTGDIGYIDGDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	456
4CL1_pophy	IMKGYLNDPEATERTVDNDGWLHTGDIGYIDGDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	456
CoAL_ricco	IMKGYLNDPEATERTIDKEGWLHTGDVGYIDGDDELFI	VDRLKELIKYNGFQVAPAELEA	469
4CL2_pophy	IMKGYLNDPEATERTIDKDGWLHTGDIGYIDE-DELF	FVDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	455
4CL1_corca	IMKGYLNDPEATARTIDKDGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	458
4CL4_popto	IMKGYLNDPEATERTIDKDGWLHTGDIGYIDE-DELF	FVDRLKELIKYKGFQVAPAELES	455
4CL1_cinos	IMKGYLNDPEATKMTIDKEGWLHTGDIGFVDDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	451
4CL1_eucca	IMKGYLNDPEATANTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	456
4CL3_poptr	IMKGYLNDPEATSRTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	455
4CL_popde	IMKGYLNDPEATSRTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	450
4CL_eucgl	IMKGYLNDPEATANTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	456
4CL_popto	IMKGYLNDPEATSRTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	451
4CL3_popni	IMKGYLNDPEATSRTIDKQGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	455
4CL_hibca	IMKGYLNDPEATKRTIDKEGWLHTGDIGYIDEDNELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	452
4CL_poptrm	IMKGYLNDPEATSRTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPTELEA	450
4CL2_tobac	IMKGYLNDPEATARTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	454
4CL_vanpl	IMKGYLNDPEATARTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	463
4CL_paufo	IMKGYLNDLESTEGTIDKDGWLHTGDIGFIDTDELFI	VDRLKEIKYKGFQVAPAELEA	455
4CL1_tobac	IMKGYLNDPEATTRTIDKEGWLHTGDIGFIDEDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAEIEA	459
4CL_amofr	IMKGYLNDQEATQRTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	451
4CL2_soltu	IMKGYLNDPEATARTIEKEGWLHTGDIGFIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	457
4CL3_popto	IMKGYLNDPEATSRTIDNDGWLHTGDIGFIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	455
4CL2_poptr	IMKGYLNDPEATSRTIDNDGWLHTGDIGFIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	455
4CL_gynbi	IMKGYLNDPESTKNTIDADGWLHTGDIGLIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	454
4CL_pethy	IMKGYLNDPEATTRTIDKEGWLHTGDIGYIDNDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	456
4CL1_soltu	IMKGYLNDPEATARTIEKEGWLHTGDIGFIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	457
4CL1_petcr	IMKGYLNDPESTRTTIDEEGWLHTGDIGFIDDDDELFI	VDRLKEIKYKGFQVAPAELEA	455
4CL_soltu	IMKGYLNDPEATARTIEEGWLHTGDIGFIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	457
4CL2_capan	IMKGYLNDLESTTRTIDKEGWLHTGDMGFIDNDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	454
4CL2_rutgr	IMKGYLNDPEATNRTIDKDGWLHTGDVGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	469
4CL_tobac	IMKGYLNDPEATARTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	454
4CL2_salmi	IMKGYLNDPESTKNTIDEDGWLHTGDIGFIDADDELFI	VDRLKEIKYKGFQVAPAEIEA	454
4CL2_petcr	IMKGYLNDPESTRTTIDEEGWLHTGDIGFIDDDDELFI	VDRLKEIKYKGFQVAPAELEA	455
4CL1_araly	IMKGYLNDPEATAETIDKDGWLHTGDIGLIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	471
4CL_betlu	IMKGYLNDPEATASTIDKEGWLHTGDIGLIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	454
4CL_betpl	IMKGYLNDPEATASTIDKEGWLHTGDIGLIDNDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	454
4CL1_arath	IMKGYLNDPEATAETIDKDGWLHTGDIGLIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	475
4CL1_melof	IMKGYLNDLESTKRTIDHDGWLHTGDIGFIDADDELFI	VDRLKEIKYKGFQVAPAEIEA	454
4CL2_arath	IMKGYLNDPEATASTIDKDGWLHTGDVGFIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELES	468
4CL_galor	IMKGYLNDPEEATERTIDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI	VDRLKELIKYKGFQVAPAELEA	461
4CL2_scuba	IMKGYLNDPESTARTIDKEGWLHTGDIGFIDDDDELFI	VDRLKEIKYKGFQVAPAEIEA	458
4CL1_scuba	IMKGYLNDPESTARTIAKEGWLHTGDIGFIDDDDELFI	VDRLKEIKYKGFQVAPAEIEA	458
4CL1_pinma	IMKGYLNDPESTAATIDEEGWLHTGDVGYIDDDDEIFI	VDRVKEIKYKGFQVAPAELEA	454
4CL_pinta	IMKGYLNDPESTAATIDEEGWLHTGDVEYIDDDDEIFI	VDRVKEIKYKGFQVAPAELEA	454
4CL_pinra	IMKGYLNDPESTAATIDEEGWLHTGDVGYIDDDDEIFI	VDRVKEIKYKGFQVAPAELEA	454

:****:* : * * : :****:* : * :*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:

Anhang

4CL1_soybn	LLIAHPNISDAAVVGMKDEAAGEIPVAFVVRNSGSE-IAEDEIKKYISQQVVFYKRICRV	515
4CL2_rubid	MLISHPNLSDAAVVSMKDEAAGEVPVAFVVRNSGSK-ISEDNIKQYISKQVVFYKRISKV	515
4CL1_leule	LLISHPFISDAAVVPMKDEAAGELPVAFVVRNSGFK-ISEDNIKLFISQQVVYKRIHKV	513
4CL2_sorau	MLIAHPNISDAAVVPMKDEAAGEIPVAFVVRNSGSK-ISEDNIKQYISKQVVFYMRIGRV	518
4CL5_popto	MLIAHPDISDCAVVPMKDEAAGEVPVAFVVRANGSK-ITEDEIKQYISKQVVFYKRISRV	515
4CL1_poptr	MLIAHPDISDCAVVPMKDEAAGEVPVAFVVRANGSK-ITEDEIKQYISKQVVFYKRISRV	515
4CL1_pophy	MLIAHPDISDCAVVPMKDEAAGEVPVAFVVRANGSK-ITEDEIKQYISKQVVFYKRISRV	515
CoAL_ricco	MLIAHPSISDAAVVPMKDEAAGEIPAAFVVRNSGSK-ITEDDVQQYISKQVIYYKRIRRV	528
4CL2_pophy	MLIAHPNISDAAVVPMKDEAAGEVPVAFVVRNSGSK-ITEDEIKQYISKQVIFYKRIGRV	514
4CL1_corca	MLIAHPEIDAAVVAMKDEVAGEVPVAFVVKSEKSE-ITEDEIKQYISKQVVFYKRISRV	517
4CL4_popto	MLIAHPSISDAAVVPMKDEAAGEVPVAFVVRNSGSK-ITEDEIKQYISKQVIFYKRIGRV	514
4CL1_cinos	MLITHPNVADAADVPMKDVLAGVVPVAFVVKSNSSN-ITEEEIKQFVAKQVVFYKRINRV	510
4CL1_eucca	MLIAHPSISDAAVVPMKDEVASEVPVAFVVKSNSSV-ITEDEIKQYISKQVVFYKRINRV	515
4CL3_poptr	LLLAHPEISDAAVVGMKDEDEAGEVPVAFVVKSEKSQ-ATEDEIKQYISKQVIFYKRIKRV	514
4CL_eucgl	LLLAHPEISDAAVVGMKDEDEAGEVPVAFVVKSEKSQ-ATEDEIKQYISKQVIFYKRIKRV	509
4CL_eucgl	LLLAHPSISDAAVVPMKDEVAGEVPVAFVVKSNSSV-ITEDEIKQYISKQVFNKRINRV	515
4CL_popto	LLIAHPEISDAAVVGLKDEDEAGEVPVAFVVKSEKSQ-ATEDEIKQYISKQVIFYKRIKRV	510
4CL3_popni	LLLAHPEISDAAVVGMKDEDEAGEVPVAFVVKSEKSQ-ATEDEIKQYISKQVIFYKRIKRV	514
4CL_hibca	MLISHPNISDAAVVPMKDEAAGEVPVAFVVRNSHNSN-IEDEIKQFISKQVVFYKRLARV	511
4CL_poptrm	LLIAHPEISDAAVVGLKDEDEAGEVPVAFVVKSEKSQ-ATEDEIKQYISKQVIFYKRIKRV	509
4CL2_tobac	LLLNHPNISDAAVVPMKDEQAGEVPVAFVVRNSGST-ITEDEVKDFISKQVIFYKRIKRV	513
4CL_vanpl	LLLTHPCISDAAVVPMKDEAAGEVPVAFVVKSNHNSN-ITEDEIKQFISKQVIFYKRINRV	522
4CL_paufo	LLLNHPYISDAAVVPMKDEQAGEVPVAFVVRNSGST-ITEDEIKQFISKQVVFYKRINRV	514
4CL1_tobac	LLLNHPNISDAAVVPMKDEQAGEVPVAFVVRNSGSA-ITEDEVKDFISKQVIFYKRVKRV	518
4CL_amofr	LLLSHPKITDAAVVPMKDEAAGEVPVAFVVRNSGHTDTTEDEIKQFISKQVVFYKRISRV	511
4CL2_soltu	LLINHPDISDAAVVPMIDEQAGEVPVAFVVRNSGST-ITEDEVKDFISKQVIFYKRIKRV	516
4CL3_popto	LLQAHTGISEAAVVGMKDEDEAGEIPVAFVIKSENSQ-VTEEEIMQYISKQVIFYKRIKRV	514
4CL2_poptr	LLQAHTGISDAAVVGMKDENSGEIPVAFVIKSENSQ-VTGEEIMQYISKQVIYYKRIKRV	514
4CL_gynbi	LLLTHPDISDAAVVSMVNDAAAGEVPVAFVVKTNDS-ITEDEIKQFVSKQVVFYKRINRV	513
4CL_pethy	LLLNHPNISDAAVVPMKDEQAGEVPVAFVVRNSGSD-ITEDEVKDFVSKQVIFYKRIKRV	515
4CL1_soltu	LLLNHPDISDAAVVPMIDEQAGEVPVAFVVRNSGST-ITEDEVKDFISKQVIFYKRIKRV	516
4CL1_petcr	LLLTHPTISDAAVVPMIDEKAGEVPVAFVVRNNGFT-TTEEEIKQFVSKQVVFYKRIKRV	514
4CL_soltu	LLINHPDISDAAVVPMIDEQAGEVPVAFVVRNSGST-ITEDEVKDFISKQVIFYKRIKRV	516
4CL2_capan	LLLNHPNISDAAVVPMKDEQAGEVPVAFVVRNSGST-ITEDEVKDFVSKQVVFYKRIKRV	513
4CL2_rutgr	LLLSHSSISDAAVVPMKDDGAGEVPVAFVVKSNSSQ-ISEDEIKQFVSKQVVFYKRISRV	528
4CL_tobac	LLLNHPFTSDAAVVPMKDEQAGEVPVAFVVRSSGST-ITEDEVKDFISKQVIFYKRIKRV	513
4CL2_salmi	LLLNHPYISDAAVVSMQDEQAGEVPVAFVVRNSGST-ITEDEIKQFISKQVIFYKRINRV	513
4CL2_petcr	LLLTHPTISDAAVVPMIDEKAGEVPVAFVVRNNGFT-TTEEEIKQFVSKQVVFYKRIKRV	514
4CL1_araly	LLIGHPDITDVAVVAMKEEAAGEVPVAFVVKSKDSE-LSEDDVKQFVSKQVVFYKRINKV	530
4CL_betlu	LLLTHPNISDAAVVPMKDDLAGEVPVAFVVRNSGSK-ITEDEIKQFVSKQVVFYKRISRV	513
4CL_betpl	LLLTHPNISDAAVVPMKDDLAGEVPVAFVVRNSGSK-ITEDEIKQFVSKQVVFYKRISRV	513
4CL1_arath	LLIGHPDITDVAVVAMKEEAAGEVPVAFVVKSKDSE-LSEDDVKQFVSKQVVFYKRINKV	534
4CL1_melof	LLLSHPYISDAAVVSMQDEQAGEVPVAFVVRNSGST-ITEDEIKQFISKQVVFYKRINRV	513
4CL2_arath	LLIGHPEINDVAVVAMKEEDAGEVPVAFVVRNSKDSN-ISEDEIKQFVSKQVVFYKRINKV	527
4CL_galor	LLLSHPKISDAAVVPMNDEAAGEVPVAFVVRNSGYTDLTEDEIKQFISKQVVFYKRINRV	521
4CL2_scuba	LLLNHPNISDAAVVSMKDEEAGEVPVAFVVKSNGST-ITEDDIKQFISKQVIFYKRIHRV	517
4CL1_scuba	LLLNHPNISDAAVVSMKDEEAGEVPVAFVVKSNGST-ITEDDIKQFISKQVIFYKRIHRV	517
4CL1_pinma	LLVAHPSIADAADVPMKDEEAGEVPVAFVVKSS---EISEQEIKEFVAKQVVFYKRIHRV	511
4CL_pinta	LLVAHPSIADAADVPMKDEEAGEVPVAFVVKSS---EISEQEIKEFVAKQVVFYKRIHRV	511
4CL_pinra	LLVAHPSIADAADVPMKDEEAGEVPVAFVVKSS---EISEQEIKEFVAKQVVFYKRIHRV	511
	:* . . : *** . : :* ** : :: . : : : ** : : : *	

Anhang

4CL1_soybn	FFTDSIPKAPSGKILRKVLTARLNEGLVVAN-----	546
4CL2_rubid	FFTDKIPKAPSGKILRKDLRARLAAGLPN-----	544
4CL1_leule	IFTDTIPKAVSGKILRKDLKARLASDLGN-----	542
4CL2_sorau	FFTDKIPKAPSGKILRKDLRAKLAASLPN-----	547
4CL5_popto	FFTESIPKAPSGKILRKDLRARLATGDLPH-----	545
4CL1_poptr	FFTEAIPKAPSGKILRKDLRARLATGDLPH-----	545
4CL1_pophy	FFTEAIPKAPSGKILRKDLRARLATGDFLIKFOHDTYMQKQQ	557
CoAL_ricco	FFTDSIPKAPSGKILRKDLRARLAAGVPT-----	557
4CL2_pophy	FFTEAIPKAPSGKILRKDLRARVSAGDLPCTSDS-----	548
4CL1_corca	FFMEAIPKAPSGKILRKELRAKLAGSNY-----	545
4CL4_popto	FFTEAIPKAPSGKILRKDLRAMVSAGDIPHQIPNMITYMQNQH	556
4CL1_cinos	FFVDSIPKAPSGKILRKDLRARLAAGMPN-----	539
4CL1_eucca	FFTDAIPKAPSGKILRKDLRAKLAGSVYN-----	544
4CL3_poptr	FFIEAIPKAPSGKILRKNLRETLPGI-----	540
4CL_popde	FFIEAIPKAPSGKILRKNLREKLPGI-----	535
4CL_eucgl	FFTDAIPKAPSGKILRKDLRAKLAGSVYN-----	544
4CL_popto	FFIEAIPKAPSGKILRKNLKEKLAGI-----	536
4CL3_popni	FFIEAIPKAPSGKILRKNLREKLPGI-----	540
4CL_hibca	FFVDTIPKAPSGKILRKDVRAKLAAHVPN-----	540
4CL_poptrm	FFIEAIPKAPSGKILRKNLKEKLPGI-----	535
4CL2_tobac	FFVDAIPKSPSGKILRKDLRAKLAAGLPN-----	542
4CL_vanpl	FFVEAIPKAPSGKILRKDLRARLAAAALPTN-----	553
4CL_paufo	FFIDAIPKSPSGKILRKDLRARLAAGVPN-----	543
4CL1_tobac	FFVETVPKSPSGKILRKDLRARLAAGVPN-----	547
4CL_amofr	FFIDAIPKSPSGKILRKDLRAKLAAGVPN-----	540
4CL2_soltu	FFVETVPKSPSGKILRKDLRARLAAGISN-----	545
4CL3_popto	FFVEAIPKAPSGKILRKNLRETLAGGLQK-----	543
4CL2_poptr	FFVEAIPKAPSGKILRKNLRETLAGGLQK-----	543
4CL_gynbi	FFIDTIPKSPSGKILRKDLRAKLAAGVPN-----	542
4CL_pethy	FFVETVPKSPSGKILRKDLRARLAAGVPN-----	544
4CL1_soltu	FFVETVPKSPSGKILRKDLRARLAAGISN-----	545
4CL1_petcr	FFVDAIPKSPSGKILRKDLRARIASGDLPK-----	544
4CL_soltu	FFVETVPKSPSGKILRKDLRARLAAGISN-----	545
4CL2_capan	FFVETVPKSPSGKILRKDLRARLAAGVTN-----	542
4CL2_rutgr	FFVDAIPKAPSGKILRKDLRAKLAAGYPN-----	557
4CL_tobac	FFVDAVPKSPSGKILRKDLRAKLAAGLPN-----	542
4CL2_salmi	FFIDAIPKSPSGKILRKDLRARLAAAV-----	540
4CL2_petcr	FFVDAIPKSPSGKILRKDLRAKIASGDLPK-----	544
4CL1_araly	FFTESIPKAPSGKILRKDLRAK-----	552
4CL_betlu	FFIDVVPKSPSGKILRKELRAKLAAGFSN-----	542
4CL_betpl	FFIDVVPKSPSGKILRKELRAKLAAGFSN-----	542
4CL1_arath	FFTESIPKAPSGKILRKDLRAKLANGL-----	561
4CL1_melof	FFIDAIPKSPSGKILRKDLRSRLAAAV-----	540
4CL2_arath	FFTDSIPKAPSGKILRKDLRARLANGLMN-----	556
4CL_galor	FFIDAIPKSPSGKILRKDLRAKLAAGVPN-----	550
4CL2_scuba	FFIDAIPKNPSGKILRKDLRAILPTKAATLSN-----	549
4CL1_scuba	FFIDAIPKNPSGKILRKDLRAILPTKAATLSN-----	549
4CL1_pinma	YFVDAIPKSPSGKILRKDLRSRLAAK-----	537
4CL_pinta	YFVDAIPKSPSGKILRKDLRSRLAAK-----	537
4CL_pinra	YFVDAIPKSPSGKILRKDLRSRLAAK-----	537
	* : : ** ***** :	

Abb. A-1: Sequenzalignment von sequentiell verwandten 4CLs

Das Alignment wurde mit ClustalO [Sievers *et al.*, 2011] durchgeführt. Ein * (Stern) bedeutet eine vollständig konservierte Aminosäure, ein : (Doppelpunkt) zeigt die starke Konservierung von Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften an und ein . (Punkt) stellt die schwache Konservierung von ähnlichen Aminosäuren dar. Striche (–) bedeuten Lücken, die zu einem besseren Sequenzalignment führen. 4CL1-5 steht für 4 Cumarat:Coenzym A Ligase Isoformen 1 bis 5, CoAL für Coenzym A Ligase. Die Abkürzungen stehen für folgenden Organismen: soybn - *Glycine max*, rubid - *Rubus idaeus*, leule - *Leucaena leucocephala*, sorau - *Sorbus aucuparia*, popto - *Populus tomentosa*, poptr - *Populus trichocarpa*, pophy - *Populus Hybride*, ricco - *Ricinus communis*, corca - *Corchorus capsularis*, cinos - *Cinnamomum osmophloeum*, eucca - *Eucalyptus camaldulensis*, popde - *Populus deltoides*, eucgl - *Eucalyptus globulus*, popni - *Populus nigra*, hibca - *Hibiscus cannabinus*, poptrm - *Populus tremuloides*, tobac - *Nicotiana tabacum*, paufo - *Paulownia fortune*, vanpl - *Vanilla planifolia*, amofr - *Amorpha fruticosa*, soltu - *Solanum tuberosum*, gynbi - *Gynura bicolor*, pethy - *Petunia hybrida*, petcr - *Petroselinum crispum*, capan - *Capsicum annuum*, rutgr - *Ruta graveolens*, salmi - *Salvia miltiorrhiza*, betlu - *Betula luminifera*, araly - *Arabidopsis lyrata*, betpl - *Betula platyphylla*, arath - *Arabidopsis thaliana*, melof - *Melissa officinalis*, galor - *Galega orientalis*, scuba - *Scutellaria baicalensis*, pinma - *Pinus massoniana*, pinta - *Pinus taeda* and pinra - *Pinus radiata*.

Tab. A-1: Liste von 4CL1 verwandten Enzyme mit bekannten Strukturdaten

UniProt Accession number	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
Q941M3	4-coumarate:CoA ligase, [<i>Populus tomentosa</i> (Chinese white poplar)]	743	743	97%	0.0	69%
P13129	Luciferin 4-monooxygenase; Luciferase [<i>Luciola cruciata</i> (Japanese firefly)]	287	287	89%	3,00E-93	36%
P08659	Luciferin 4-monooxygenase; Luciferase [<i>Photinus pyralis</i> (North American firefly)]	286	286	88%	9,00E-93	35%
Q5UFR2	Luciferase [<i>Lampyris turkestanicus</i> (Iranian firefly)]	271	288	90%	4,00E-87	60%
O30147	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase (FadD-1) [<i>Archaeoglobus fulgidus</i>]	238	255	91%	7,00E-75	31%
O53306	probable chain-fatty-acid-CoA ligase FADD13 [<i>Mycobacterium tuberculosis</i>]	210	210	88%	1,00E-64	32%
Q6ND88	Malonyl CoA synthetase [<i>Rhodopseudomonas palustris</i>]	182	182	93%	7,00E-55	28%
Q6NAE3	Putative long-chain-fatty-acid CoA ligase [<i>Rhodopseudomonas palustris</i>]	176	176	92%	2,00E-52	31%
Q5SKN9	medium-chain-fatty-acid--CoA ligase [<i>Thermus thermophilus</i> HB8]	175	175	95%	6,00E-52	27%
P40871	2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase [<i>Bacillus subtilis</i>]	152	168	93%	3,00E-44	32%
P10378	2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase component of enterobactin synthase multienzyme complex [<i>Escherichia coli</i> str. K-12]	141	141	91%	2,00E-40	26%
Q13WK3	Benzoate-coenzyme A ligase [<i>Burkholderia xenovorans</i>]	137	137	93%	3,00E-39	27%
P63526	O-succinylbenzoic acid--CoA ligase [<i>Staphylococcus aureus</i>]	130	130	65%	5,00E-37	29%
Q8TLW1	AMP-binding protein [<i>Methanosarcina acetivorans</i>]	130	130	88%	1,00E-36	26%
Q8ZKF6	acetyl-CoA synthetase [<i>Salmonella enterica</i>]	124	124	93%	4,00E-34	23%
Q9L0A2	Putative fatty acid synthase [<i>Streptomyces coelicolor</i>]	122	122	63%	3,00E-34	28%
Q8GN86	4-chlorobenzoyl CoA ligase [<i>Alcaligenes</i> sp.]	120	120	88%	2,00E-33	25%
Q01574	Acetyl-coenzyme A synthetase 1 [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288c]	111	159	90%	6,00E-30	32%
Q81G39	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 1 (DltA) [<i>Bacillus cereus</i>]	92.0	107	84%	6,00E-24	75%
Q99ZA6	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 1 (DltA) [<i>Streptococcus pyogenes</i> M1]	89.0	89.0	74%	5,00E-23	24%
Q5XBN5	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 1 (DltA) [<i>Streptococcus pyogenes</i> M6]	89.0	89.0	74%	5,00E-23	24%
P0C061	Gramicidin S synthase 1; includes ATP-dependent D-phenylalanine adenylation (D-PheA); [<i>Brevibacillus brevis</i>]	83.6	100	89%	9,00E-21	24%
P39581	D-alanine:D-alanyl-carrier protein ligase (DltA) [<i>Bacillus subtilis</i> , Peptide, 503 aa]	82.0	82.0	91%	8,00E-21	25%

Tab. A-1: Liste von 4CL1 verwandten Enzyme mit bekannten Strukturdaten

Die Liste wurde durch eine Blast-Suche [Altschul *et al.*, 1990] mit der Aminosäuresequenz von 4CL1 aus *Glycine max.* gegen die Protein Data Base (PDB) ermittelt. Die Proteine sind absteigend nach dem Score bzw. der Sequenzidentität geordnet.

Anhang

4Cl1_soybn ASGL-HKIGI--RQGDVIMLVLRNCPQFALAFLGATHRGAVVTTANPFYTPAELAKQATA 120
4Cl1_popto ASGL-NKIGI--QQGDVIMLFLPSSPEFVLAFLGASHRGAIITAANPFSTPAELAKHAKA 119
Luci_lucrr GKAL-QNYGL--VVDGRIALCSENCEFFIPIVAGLFIGVGVAPTNEIYTLRELVHSLGI 122
Luci_phopy AEAM-KRYGL--NTNHRIVVCSSENSLQFFMPVVGALFIGVAVAPANDIYNERELLSMNI 120
Luci_lamtu AETM-KRYGL--GLQHHIIVCSSENSLQFFMPVCGALFIGVGVAPTNDIYNERELYSLSI 120
LCFACS_arcfu ASGI-SRKGV--RKGEHVGVCI PINSIDYVMTIYALWRVAATPVPINPMYKSFLEHILND 120
FACS_myctu ADVL-TALGI--AKGDRVALLMPNSVEFCCLFYGAAGLAVAVPINTRLAAPVSVFILSD 99
MaCoA_rhopa ANVL-VARGL--QVGDVAAQTEKSVEALVLYLATVRAGGVYLPNTAYTLHELDYFID 98
LCFACS_rhopa ASGL-LRDGV--HTGDRVAILSQNCSEMIELIGAVLIGAILLPVNYRLNADEIAFVLGD 102
LCFACS_theth MGGL-RALGV--GVGDVAVTLGFNHRHLEAYFAVPGMGAVLHTANPRLSPKEIAYILNH 117
DhbE_bacsu AAGF-QKLG I--QQMDRVVVQLPNIKEFFEVIFALFRLGALPVFALPSHRSSEITYCFEF 120
EntE_ecoli ACSL-RRQGI--KPGETALVQLGNVAELYITFFALLKLGAVPVLALFHSQRSELNAYASQ 118
BeCoA_burxe ASAL-RTLGV--HPEERILLVMLDTVALPVAFLGALYAGVVPVAVANTLLTPADYVYMLTH 118
MenE_staa AKRL-KAY-----QQSRVGLYIDNSIQSIIILIHACWLANEIAMINTRITPNEMTNQMS 91
AMPbp_metac ANFF-VKHGI--KGGDYVMLTLKSRDYFWYCMGLGHLKGAIAVPATHMLKTRDIVRYIEK 136
ACS_salty ANTL-LDLGI--KKGDVVAIYMPMVEAAVAMLACARIGAVHSVIFGGFSPEAVAGRIID 177
FACS_strco AGRI-GGA-----GRVAVWATPAMETGVAVVAALLAGVAAPLNPKSGDKELAHILSD 93
CBAL_alcsp A-GL-HADGL--RPQQRVAVVAPNSADVIAAILALHRL--AVPALLNPRKLSAELAEIKR 97
ACS_yeast AQVLTYSMGV--RKGDTVAVYMPMVEAIIITLLAISRIGAIHSVVFAGFSSNSLRDRIND 204
DltA_bacce AHWI-S-SE-YPDDRSPIVMYGMQPEMIINFLGCVKAGHAYIPVDLSIPADRVQRIEA 96
DltA_strp1 AAFI-D-SL-ALLAKSPVLVFGAQT YDMLATFVALTKSGHAYIPVDVHSAPERILAIIEI 98
DltA_strp6 AAFI-D-SL-ALLAKSPVLVFGAQT YDMLATFVALTKSGHAYIPVDVHSAPERILAIIEI 98
PheA_anemi ARIF-IEKGIGK--TLVGIMMEKSIDLFIGILAVLKAGGAYVIDIEYPKERIQYILDD 134
DltA_bacsu AAAI-Q-KRISGEKKSPIVYGHMPEHMIVSFLGSVKAGHPYIPVDLSPSERIAKIES 97

4Cl1_soybn TKTRLVITQSA-----YVEKIKSF-----ADS--SSDV-MVMCIDD----D-F 155
4Cl1_popto SRAKLLITQAC-----YVEKVKDF-----ARE--SDV-KVMCVDS----- 151
Luci_lucrr SKPTIVFSSKK-----GLDKVITV-----QKT--VTTIKTIVILDS----K-V 158
Luci_phopy SQPTVVFVSKK-----GLQKILNV-----QKK--LPIIQKIIIMDS----K-T 156
Luci_lamtu SQPTIVFCSKR-----ALQKILGV-----QKK--LPIIQKIVILDS----R-E 156
LCFACS_arcfu SEATTLVVHSM-----LYENFKPV-----LEK--TG-VERVAVVGG----E-V 155
FACS_myctu SGSKVVIYGAP-----SAPVIDAI-----RAQ--ADPPGT-VT-----D 130
MaCoA_rhopa AEPKIVVCDPS-----KRDGIAAI-----AAK--V---GA-TV-----E 126
LCFACS_rhopa GAPSVVVAGTD-----YRDIVAGV-----LPS--LGGVKKAYA-IG-----D 136
LCFACS_theth AEDKVLLFDPN-----LLPLVEAI-----RGE--LKTQVH-FV-VM-----D 150
DhbE_bacsu AEAAYIIPDA--YSGFDYRSLARQV-----QSK--LPTLKNIV-AG----E- 159
EntE_ecoli IEPALLIADRQHALLFSGDDFLNTFVTE-----HSS--IRVQLLND-SG----E- 160
BeCoA_burxe SHARAVIASGA-----LVQNVTOA-----LES--AEHDGCQLI-VS----QPR 154
MenE_staa IDVQLIFCTLP-----LELRGFI-----VSLDDIEFAGRDITTTG----LLD 130
AMPbp_metac AGLKMIVCIAE-----D-DVPEQV-----DEA--HAECGDIPLKKA----KVG 172
ACS_salty SSSRLVITADE-----GVRAGRSIPLKKNVDDALKNPVTSVEHVIVLKR-T-GSDID 228
FACS_strco SAPSLVLAPPD-----AELPPA-----L--GA----- 113
CBAL_alcsp GEMTAAVIAVG-----RQVADAI-----FQS--GSGARIIFL-GD----LVR 132
ACS_yeast GDSKVVIITDE-----SNRGGKVIETKRIVDDALRETP--GVRHVLVYRKTNNPSVA 284
DltA_bacce SGAKLLLSATA-----VTVTDLPV-----R--IVSED----- 121
DltA_strp1 AKPSLIIAIEE-----FPLTIEGI-----S--LVLSL----- 123
DltA_strp6 AKPSLIIAIEE-----FPLTIEGI-----S--LVLSL----- 123
PheA_anemi SQARMLLTQKH-----LVHLHNI-----Q--FNGQV----- 159
DltA_bacsu SGAELLIHAAG-----LSIDAVGQ-----Q--IQTV----- 121

4Cl1_soybn SYENDGVLFHSTLS----NADETEAPAVKINPDE-LVALPFSSGTSGLPKGVMLSHKNL- 209
4Cl1_popto --APDGCLHFSELT----QADENEAPQVDI SPDD-VVALPYSSGTTGLPKGVMLTHKGL- 203
Luci_lucrr DYRGYQCLDTFIKRNTPPGFQASSFKTVEVDRKEQVALIMNSSGTTGLPKGVQLTHENT- 217
Luci_phopy DYQGFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPESEFDRDKTIALIMNSSGTTGLPKGVLPHRTA- 215
Luci_lamtu DYMKGQSMYSFIESHLPAGFNEYDYIPDSFDRETATALIMNSSGTTGLPKGVMLTHKNI- 215
LCFACS_arcfu NS-----L--SE----VMDSGSEDFENVKVNPEEDVALIPTYGTTGMPKGVMLTHFNL- 203
FACS_myctu WIG---ADSLAERLRS----AADEPAVECGGD-DNLFIMYTSGTTGHPKGVVHTHESV- 181
MaCoA_rhopa TLGPDGRGSLTDAAGA----SEAFATIDRGAD-DLAAILYTSGTTGRSKGAMLSHDNL- 180
LCFACS_rhopa GSGPFA--PFKD--LAS----DTPFSAPEFGAA-DGFVIIHTAAVGGPRGALISQGNL- 186
LCFACS_theth EKAPEGYLAYEEALGEE-----ADPVVPER-AACGMAYTTGTTGLPKGVVYSHRALV 202
DhbE_bacsu ---AE---EFLP----LEDLHAEPVKLPEVKSS-DVAFQLSGGSTGLSKLIPRTHDDYI 208
EntE_ecoli ---HN----LQD----AINHPAEDFTATPSPAD-EVAYFQLSGGTTGTPKLI PRTHNDY 208
BeCoA_burxe ESEPRLAPLFEELIDAA----APAAKAAATGCD-DIAFWLYSSGTTGPKGTVHTHANLY 209
MenE_staa NTMGIQYDTSNETVVPK--ESPSNILNTSFNLD-DIASIMFTSGTTGPKQAVPQTFRNH- 186
AMPbp_metac GDVLEGWIDFRKELEESSPIFERPTGEVSTKNE-DICLVYFSSGTTAGFPKVMVEHDNTYP- 230
ACS_salty WQEGR-DLWWRDLIEKA----SPEHQPEAMNAE-DPLFILIYTSGSTGPKGVMLHTGGY- 281
FACS_strco ---LERV DV---DVRA----RGAVPEDGADDG-DPALVYVYTSGTTGPKGAVIPRRAL- 160
CBAL_alcsp DGEPI-----SY----GPIIEDPQRDAA-QPAFIYFYSGTTGLPKAAIIPQRAE 177
ACS_yeast FHAPR-DLDWATEKKKY----KTYYPCTPVDSE-DPLFLLYTSGSTGAPKGVQHSAGY- 337
DltA_bacce NL-----KD--IFFTHKGNTPNPEHAVKGD-ENFYIIYTSGSTGNPKGVQITYNCL- 169
DltA_strp1 EI-----ES--AKL--AEMPYERTHSVKGD-DNYIIIFTSGTTGQPKGVQISHDNL- 169
DltA_strp6 EI-----ES--AKL--AEMPYERTHSVKGD-DNYIIIFTSGTTGQPKGVQISHDNL- 169
PheA_anemi EI-----FE--EDTIKIREGNTLHVPSKST-DLAYVIYTSGTTGNPKGMLEHKG I- 207
DltA_bacsu -S-----AE--ELLENEGSVSQDQWVKEH-ETFYIIYTSGSTGNPKGVQISAANL- 168

: . * :

Anhang

4CL1_soybn -VTTIAQLVDGENPHQYTHSEDEVLLCVLPMFHIYA---LNSILLCG--IRSGAAVLIL-- 261
4CL1_popto -ITSVAQQVDGDNPNLYFHSEDEVLLCVLPMFHIYA---LNSIMLCG--LRVGAPILIM-- 255
Luci_lucrr -VTRFSSHARDPIYGNQVS-PGTAVLTVVPPHHGFGMFTTLGYLICG--FR---VVML-- 267
Luci_phopy -CVRFSSHARDPIFGNQII-PDTAILSVVPPHHGFGMFTTLGYLICG--FR---VVML-- 265
Luci_lantu -CVRFSHCRDPVFGNQII-PDTAILTVIPHHGFGMFTTLGYLTCG--FR---IVLM-- 265
LCFACS_arcfu -AANALQLAV---ATGLSHMD-TIVGCMPPMHSAEFG---LVNLM--VTVGNEYVVM-- 250
FACS_myctu -HSAASSWAS---TIDVR-YRDRLLPLPMFHVAAALTTVIFSA-----MRGVTLISM-- 228
MaCoA_rhopa -ASNSLTLVD---YWRFT-PDDVLIHALPIYHHTHGLFVASNVT-----LFARGSMIFL-- 228
LCFACS_rhopa -LIAQSSLVD---AWRLT-EADVNLGMLPLFHVTVGLGLMLTLQ-----QAG-GASVIA-- 233
LCFACS_theth LHSLAASLVD---GTALS-EKDVVLPVPMFHVNAWCLPYAAT-----LVGAKQVLPG-- 251
DhbE_bacsu --YSLKRSVE---VCWLD-HSTVYLAALPMAHNYPLSSPGVVG---VLYAGGRVVL-- 256
EntE_ecoli --YSVRSVE---ICQFT-QQTRYLCAIPAAHNYAMSSPGSLG---VFLAGGTVLA-- 256
BeCoA_burxe WTA-ELYAKP---ILGIA-ENDVVFSAAKLFAYGLGNLTFP-----LSVGATAILM-- 257
MenE_staa AMPbp_metac -YASAIGCKE---SLGFD-RDTNWSLVLPYHISGLSVLLRAV-----IEGFTVRIV-- 233
ACS_salty -LG-HILTAK---YWQNV-EDDLHYTV---ADSGWKGCVWKGKLYGQWIAAGCAVFDVY-- 279
FACS_strco -LVYAATTFK---YVFDYHPGDIYWCTA---DVGWVTGHSYLLYGPLACGATLMFEGV 333
CBAL_alcsp -ATTLDALAD---AWQWT-GEDVLVQGLPLFHVHGLVLGILGP-----LRRGGSVRHL-- 208
ACS_yeast SRVLFMSTQV---GLRHG-RHNVVGLMPLYHVGVFFAVLVA-----LALDGTYYVVV-- 226
DltA_bacce -LLGALLTMR---YTFDTHQEDVFFTAG---DIGWITGHTYVYVYGPPLYGCATLVFEGT 389
DltA_strp1 --VSFTKWAVED---FNLQ-TGQVFLNQAPPFSFDLSVM--DIY---PSLVTGGTLWAI 218
DltA_strp6 --LSFTNWMIEDAAFDVP-KQPQMLAQPPYSFDLSVM--YWA---PTLALGGTLFALPK 220
PheA_anemi --LSFTNWMIEDAAFDVP-KQPQMLAQPPYSFDLSVM--YWA---PTLALGGTLFALPK 220
DltA_bacsu --SNLKVFFENS--LNVT-EKDRIGQFASISFDASVW--EMF---MALLTGASLYIILK 256
--QSFTDWICAD--FPVS-GGKIFLNQAPPFSFDLSVM--DLY---PCLQSGGTLHCVTK 217

4CL1_soybn -QKFEITLLELIEKYKVTVASFVPPIVLALVKSG---ETHRYDLSIRAVVTGAAPLG 316
4CL1_popto -PKFEIGSLLGLIEKYKVSIAFVPPVPMMSIAKSP---DLKHDLSLRMKSGGAPLG 310
Luci_lucrr -TKFDEETFLLKTLQDYKCTSVILVPTLFAILNKSE---LLNKYDLSNLVEIASGGAPLS 322
Luci_phopy -YRFEELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAKST---LIDKYDLSNLHEIASGGAPLS 320
Luci_lantu -YRCEELFLRSLQDYKIQSALLVPTLFSFFAKST---LVDKYDLSNLHEIASGGAPLA 320
LCFACS_arcfu -GMFNQEMLAENIEKYKGTFSWAVPALNVLVNTLES--SNKTYDWSYLVKVFATGAWPVA 307
FACS_myctu -PQFDATKVSLLIVEERVICIGAVPALNFM---RQVPEFAELDADPFRYFTTGGAMP 283
MaCoA_rhopa -PKFDPPKI-LDLMARATVLM-GVPTFYTRLLQSP---RLTKETGTHMRLFISGSAPLL 281
LCFACS_rhopa -AKFDPAQAARDIEAHKVTVMFAEFAFMLGNILDQA-----APAQLASLRV--TGLDTP 284
LCFACS_theth -PRLDPASLVELFDGEGVTFAGVPTVWALADYL---ESTGHRKTLRRLVVGGSAA 306
DhbE_bacsu -PSPSPDDAFLPLIEREKVTITLVPPLAMVWMDAAS---SRDDLSSLRQLVQGGAKFS 311
EntE_ecoli -ADPSATLCFPLIEKHQVNVNTALVPPAVSLWLQALIE--GESRAQLASLKLQVGGARLS 313
BeCoA_burxe AERPTADAI FARLVEHRPTVYGVPTLYANMLVSP---NLPARADVATRICTSAGALP 313
MenE_staa -DKFNAEQILTMKNERITHISLVPQLTNWLMQQGLH-----EPYNLQKILLGGARLS 285
AMPbp_metac YDRFEAKNMLEKASKYGVTTFCAPPTIYRFLIKED---LSHYNSTLKYAVVAGEPLN 334
ACS_salty PNWPTPARMCQVVDKQVNIYTAPTAIRALMAEGDK--AIEGTRDSSLRILGSVGEPI 391
FACS_strco -GRFSTEGAARELNDGATMLF-GVPTMYHRIAETLPADPELAKA-LAGARLLVSGSAA 265
CBAL_alcsp -EEFRPVDALQLVQEQVTSLFTPHLDALAAAHAHAG---SSLKLDLSLRHVFAGATMP 282
ACS_yeast PAYPNYSRYWDI IDEHKVTQFYVAPTALRLLKRAKGS--YIENHSLKSLRCLGSVGEPI 447
DltA_bacce DMIARPKDLFASLEQSDIQVWSTSPFAEMCLMEA---SFSESMPLPNMKTFLFCGEVLP 274
DltA_strp1 ELVADFKQLFTTIAQLPVGWITSTSPFADMAMLSD---DFCQAKMPALTHFYFDGEELT 276
DltA_strp6 ELVADFKQLFTTIAQLPVGWITSTSPFADMAMLSD---DFCQAKMPALTHFYFDGEELT 276
PheA_anemi DTINDFKFEQYINQKEITVITLPPTYVVHLDPE-----RILSIQTLITAGSATS 306
DltA_bacsu DAVNKPKVLFELKKSGLNVWSTSPSFVQMLMDP---GFSQDLLPHADTFMFCGEVLP 273

4CL1_soybn GELQEAVK---ARL--PHATFGQGYGMTEAGPL-AIS-----MAFAKVPSKIKPGACG 363
4CL1_popto KELEDTVR---AKF--PQARLGGQGYGMTEAGPVLAMC-----LAFAKEPFPIKPGACG 358
Luci_lucrr KEVGEAVA---RRF--NLPQVVRQGYGLTETTSAILI-----TPEGDDKPGASG 365
Luci_phopy KEVGEAVA---KRF--HLPQIRQGYGLTETTSAILI-----TPEGDDKPGAVG 363
Luci_lantu KEVGEAVA---KRF--KLPQIRQGYGLTETTSAILI-----TPEGDDKPGACG 363
LCFACS_arcfu PALVEKLLKLAEEKCNPNRHRNQHIGMTEACPMVTTN-----PPLRLDKSTTQG 357
FACS_myctu EALIKIYA---A---KNIEVVQYALTESCGGGTLL-----LSEDALRKGASAG 326
MaCoA_rhopa ADTHREWS---A-K--TGHAFLERYGMTEETNMNTSNP-----YDGRVPGAVG 323
LCFACS_rhopa E-TIERFE---ATC--PNATFWATFGQSETSGSTFA-----PYRDRPKSAG 325
LCFACS_theth RSLIARFE---R---MGVEVRQGYGLTETSPPVVQNFVKSHLESLSSEEKILTKAKTG 358
DhbE_bacsu AEAARRVK---A-V--FGCTLQVFGMAEGLVNYTRL-----DDPEEIVNVTQG 354
EntE_ecoli ATLAARIP---A-E--IGCQLQVFGMAEGLVNYTRL-----DDSAEKIIHTQG 356
BeCoA_burxe REIGERFT---A-H--FGCEILDIGSTEMLHIFLSN-----RAGAVEYGTG 355
MenE_staa ATMJETAL---Q---YNLPIYNSFGMTEETCSQFLTA-----TPEMLHARPDVTG 328
AMPbp_metac PEVFNRF--E-F--TGIKLMEGFGQTETVVTIATF-----PWMEPKPGSIG 376
ACS_salty PEAWEWY---KKIGKEKCPVVDTWQTEGGFMITP-----LPGAI--ELKAGSAT 438
FACS_strco VHDHERIA---A-A--TGRRVIERYGMTEETLMNTSVR-----ADGEPRAFTVG 307
CBAL_alcsp DAVLETVH---Q-H--LPGEKVNIGTTEAMNSLYMR-----HAKGTGM 321
ACS_yeast AEVWEWYS---EKIGKNEIPIVDTYQTESGSHLVTP-----LAGGVTPMKPGSAS 495
DltA_bacce NEVARKLI---ERF--PKATIMNTYGPTEATVAVTGIHV-----TEEVLDQYKSLPVG 322
DltA_strp1 VSTARKLF---ERF--PSAKIINAYGPTEATVALSAIEI-----TREMVDNYTRLP 324
DltA_strp6 VSTARKLF---ERF--PSAKIINAYGPTEATVALSAIEI-----TREMVDNYTRLP 324
PheA_anemi PSLVNKW-----K--EKVTYINAYGPTEATTICATTVA-----TKETIG--HSVPIG 349
DltA_bacsu VSAKALL---ERF--PKARIFNTYGPTEATVAVTSVEI-----TNDVISRSSESFPVG 321

.*

Anhang

4Cl1_soybn TVV-RNAEMKIVDTETG--DSLPRNKHGEICI-----IGTKVMKGYLNDPEATERT---- 411
4Cl1_popto TVV-RNAEMKIVDPETG--ASLPRNQPEICI-----RGDQIMKGYLNDPEATSRT---- 406
Luci_luccr KVV-PLFKAKVIDLDTK--KSLGPNRRGEVVCV-----KGPMLMKGYVNNPEATKEL---- 413
Luci_phopy KVV-PFFEAKVVDLDTG--KTLGVNQRGELCV-----RGPMMISGYVNNPEATNAL---- 411
Luci_lantu KVV-PFFSAKIVDLDTG--KTLGVNQRGELCV-----KGPMMMKGYVNNPEATSAL---- 411
LCFACS_arcfu VPM-SDIELKVISLEDG--RELGVGSEGEIVI-----RGNPIFKGYWKRKENQECWWDYD 409
FACS_myctu RAT-MFTDVAVRG-DDG---VIREHGEGEVVI-----KSDILLKEYWNRPEATRDA---- 372
MaCoA_rhopa PAL-PGV SARVTDPETG--KELPRGDIGMIEV-----KGNVFKGYWRMPEKTKSE---- 371
LCFACS_rhopa RPL-FWRTVAVVDAEDR---PLPPGVEGEIVL-----RGPVTFKGYWNNAAATQHA---- 372
LCFACS_theth LPI-PLVRLRVADEEGRPV-PKD GKALGEVQL-----KGPWITGGYVNEEATRSA---- 407
DhbE_bacsu KPMSFYDEMVRVDDHDR--DVKPGETGHLLT-----RGPYTIIRGYKAEHNAAS---- 402
EntE_ecoli YPMC PDDEVVADAEGN---PLPQGEVGRMLT-----RGPYTFRGYKSPQHNASA---- 404
BeCoA_burxe RPV-PGYEIELRDEAGH---AVPDGEVGDLYI-----KGPSAAVMYWNNEKSRAT---- 402
MenE_staa u MPS-ANVDVKIKPNK-----EGHGELMI-----KGANVMNGYLYPTDL-TGT---- 369
AMPbp_metac KPT-PGYKIELMDRGR---LCEVGEEGEIVINTMEGKPVGLFVHYGKDPERTEET---- 428
ACS_salty RPF-FGVQPALVDNEGHP---QEGATEGNLVI---TDSWPGQARTLFGDHERFEQTYFST 491
FACS_strco VPL-PGVELRLVEEDGTPIAALDGEVSGVEIQV-----RPNLFTYELNRPDATAAAA---- 357
CBAL_alcsp APG-FFSEVRIVRIGGGVDEIVANGEEGELIVA---ASDSAFVGYLNQPAQAEK---- 372
ACS_yeast PFP-FGIDAVVLDPNTGEE-LNTSHAEGVLAV---KAAWPSFARTIWKNDHRYLDTYLNP 550
DltA_bacce YCK-SDCRLLIKEDGT---IAPDGEKGEIVI-----VGPSVSVGYLGSPELTKAFTM- 372
DltA_strp1 YPK-PDSPTYIIDEDGK---ELSSGEQGEIIV-----TGPAVSKGYLNNPEKTAEAFFT- 374
DltA_strp6 YPK-PDSPTYIIDEDGK---ELSSGEQGEIIV-----TGPAVSKGYLNNPEKTAEAFFT- 374
PheA_anemi API-QNTQIYIVDENLQ---LKS VGEAGELCI-----GGEGLARGYWKRPELTSQKFVDN 400
DltA_bacsu FAK-PDMNIFIMDEEGQ---PLPEGEKGEIVI-----AGPSVSRGYLGEPELTKAFFS- 371

: * :

4Cl1_soybn --VDKEGWLHTGDIGFIDDDDELFI VDRL--KELIKYKGFQVAPAELEALLIAHPNISDA 467
4Cl1_popto --IDKEGWLHTGDIGYIDDDDELFI VDRL--KELIKYKGFQVAPAELEALLIAHPNISDA 462
Luci_luccr --IDEEGWLHTGDIGYIDDEKHFFI VDRL--KSLIKYKGYQVPPAELESILLQHPISFDA 469
Luci_phopy --IDKDGWLHSGDIAYWDEDEHFFI VDRL--KSLIKYKGYQVAPAELESILLQHPNIFDA 467
Luci_lantu --IDKDGWLHSGDIAYYDKDGHFFI VDRL--KSLIKYKGYQVPPAELESILLQHPPIFDA 467
LCFACS_arcfu --EKGRKFFRTGDVGFIDEEGFLHFQDRV--KEVIKYKGYTIAPFELEALLMKHEAVMDV 467
FACS_myctu --F-DNGVSWRTGDIGEIDDEGYLYIKDRL--KDMIISGGENYVPAEIESVIIGVPGVSEV 425
MaCoA_rhopa --FRDDGFFITGDLGKIDERGYVHILGRG--KDLVITGGFNVPKIEIESEIDAMPGVVES 427
LCFACS_rhopa --F-RNGWHHTGDMGRFDADGYLFYAGRAPEKELIKTGGENYVPAEVEGALKQHPAIDA 429
LCFACS_theth --LTPDGFRTGDIADVDEEGVVEIKDRL--KDLIKSGGEWISSVDLENALMGHPKVEA 463
DhbE_bacsu --FTEDGFYRTGDIVRLTRDGYIVVEGRA--KDQINRGGEKVAAEEVENHLLAHPAVHDA 458
EntE_ecoli --FDANGFYCSGDLISIDPEGYITVQGRE--KDQINRGGEKIAAEEIENLLLRHPAVIYA 460
BeCoA_burxe --F-LGEWIRSGDKYCRPLNGCYVYAGRS--DDMLKVSQQYVSPVEVEMVLVQHDVLEA 457
MenE_staa u --F-ENG YFNTGDI A EIDHEGYVMIYDRR--KDLIISGGENIYPYQIEVTAKQFPGISDA 424
AMPbp_metac --W-HDGYHYTGDMAMWDEDGYLWVFVGRA--DDIIKTSYKVGPPFEVESALIQHPAVLEC 483
ACS_salty ----FKNMYFSGDGARDEDGYWI TRGV--DDVLNVSGHRLGTAEIESALVAHPKIAEA 545
FACS_strco --FTEDGFRTGDMAVRDPDGYVRIVGRK--ATDLIKSGGYKIGAGIEIENALLEHPEVREA 414
CBAL_alcsp --L-QDGWYRTSDVAVWTPPEGTVRI LGRV--DDMIISGGENIHPSEIERVLTGAPGVAEV 427
ACS_yeast ----YPGYFTGDGA AKDKDGYIWI LGRV--DDVNVSGHRLSTAEIEAAI IEDPIV AEC 604
DltA_bacce --IDGERAYKTGDAGYV--ENGLLFYNGRL--DFQIKLHG YRMELEEIEHHLRACSYVEGA 427
DltA_strp1 --FKGQPAYHTGDIGSLTEDNILLYGGRL--DFQIKYAGYRIELEDVSQLNQSPMVASA 430
DltA_strp6 --FKGQPAYHTGDIGSLTEDNILLYGGRL--DFQIKYAGYRIELEDVSQLNQSPMVASA 430
PheA_anemi PFVPG EKLYKTGDQARWLS DGNIEYLGRI--DNQVKIRGHRVELEEVESILLKHYMIS E T 458
DltA_bacsu --HEGQWAYRTGDAGFI-QDGQIFCQGR L--DFQIKLHG YRMELEEIEFHVRQSQYVRS A 426

::* : * : * : * : * :

4Cl1_soybn AVVGMK-DEAAGEIPVAFVVRN-NG--SEIAE-----DEIKYIIS-QQVVFYKRIC-R 514
4Cl1_popto AVVGLK-DEDAAGEVPVAFVVKSEK--SQATE-----DEIKQYIIS-QQVIFYKRIC-R 509
Luci_luccr GVAGVP-DPVAGELPGA VVVLE-EG--KNMTE-----KEVMDYVA-SQVSNAKRLRGG 517
Luci_phopy GVAGLP-DDDAGELPAAVVVLE-HG--KTMT E-----KEIVDYVA-SQVTTAKKLRGG 515
Luci_lantu GVAGIP-DPDAGELPAAVVVLE-EG--KTMT E-----QEVMDYVA-GQVTTASKRLRGG 515
LCFACS_arcfu AVIGKP-DEEAGEVPKAFIVLK-PEYRGK VDE-----EDIEWVR-ERISGYKVRV-E 514
FACS_myctu AVIGLP-DEKWEIAAAIVVAD-QNEV---SE-----QQIVEYCG-TRLARYKLPK-K 473
MaCoA_rhopa AVIGVP-HADFGEGVTAVVVRD-KGATI--DE-----AQVLHGLD-GQLARFKMPK-K 474
LCFACS_rhopa VVIGVP-DPQWSEAIKAVCVCK-PGESI--AA-----DALAEFVA-SLIARYKPK-H 476
LCFACS_theth AVVAIP-HPKQWERPLAVVVRP-GEKPT--PE-----ELNEHLLK-AGFAKWQLP-A 510
DhbE_bacsu AMVSMP-DQFLGERSCVFIIPR-DEAP---KA-----AELKAF LRERGLAAYKIPD-R 505
EntE_ecoli ALVSME-DELMGEKSCAYLVVK-E-PL---RA-----VQVRRFLREQGIAEFKLPD-R 506
BeCoA_burxe AVVGVD-HGGLVKTRAFVVLKR-EFAPSEILA-----EELKAFVK-DRLAPHKYPR-D 506
MenE_staa u VCVGHP-DDTWGQVPKLYFVSE-----SDISK-----AQLIAYLS-KHLAKYKVPK-H 469
AMPbp_metac AITGVP-DEVRGQVIKATIVLTKDYTPSDSLK-----NELQDHVK-NVTAPYKYPR-I 533
ACS_salty AVVGIP-HAIKGQAIYAYVTLNHGEEPS-----ELYAEVRNVRV-KEIGPLATPD-V 595
FACS_strco AVTGEP-DPDLGERIVAVVPA-DPAAP-PAL-----GTLADHVA-ARLAPHKRPR-K 462
CBAL_alcsp VVIGLA-DQRWQSVTACVVRP-LGETL--SA-----DALDTFCRSSELADFKRPK-R 475
ACS_yeast AVVGFN-DDLTGQAVAAVFLVKNKSSWSTATDDELQDIKHLVFTVR-KDIGFAAPK-L 661
DltA_bacce VIVPIK-GKEGYDYLLAVVVP---GEH---SFEKEFKLTSAIKKELN-ERLPNMIPR-K 478
DltA_strp1 VAVPRYNKEHKVQNL LAYIVVKDGVKE---RFDRELELTKAIKASVK-DHMMSYMPK-K 485
DltA_strp6 VAVPRYNKEHKVQNL LAYIVVKDGVKE---RFDRELELTKAIKASVK-DHMMSYMPK-K 485
PheA_anemi AVS-VHKDHQEQPYLCAYFVSEKHIPL-----EQLRFQSS-EELPTYMIPS-Y 503
DltA_bacsu VVIYPQ-PNGTVEYLIAAIVP---EEH---EFEKEFQLTSAIKKELA-ASLPAYMIPR-K 477

4CL1_soybn	VFFTDSPKAPSGKILRKVLTARLNEGLVVAN-----	546
4CL1_popto	VFFIEAIPKAPSGKILRNKLEKLAGI-----	536
Luci_luccr	VRFVDEVPKGLTGKIDGRAIREILKKPVAKM-----	548
Luci_phopy	VVFVDEVPKGLTGKLDARKIREILLKAKKGGK--SKL-----	550
Luci_lamtu	VKFVDEVPKGLTGKIDARKIREILMMGKKSCL-----	547
LCFACS_arcfu	VEFVEELPRTASGKLLRRLREKEAEKG-----	542
FACS_myctu	VIFAEAI PRNPTGKILKTVLREQYSATVPK-----	503
MaCoA_rhopa	VIFVDDLPRNTMGKVQKNVLRRETYKDIYK-----	503
LCFACS_rhopa	VVFVEALPKDAKGAIDRAAVKTAHGQA-----	503
LCFACS_theth	YVFAEEIPRTSAGFLKRALREQYKNYYGGA-----	541
DhbE_bacsu	VEFVESFPQTGVGKVSKKALREAISEKLLAGF--KK-----	539
EntE_ecoli	VECVDLPLTAVGKVDKKQLRQWLASRASA-----	536
BeCoA_burxe	IVFVDDLPKTATGKIQRFLREQS-----	530
MenE_staa	FEKVDTLPYTSTGKLRNKLYRG-----	492
AMPbp_metac	IEFVPELPKTI SGKIRRV EIRDKDQSQ-----	560
ACS_salty	LHWTDLSPKTRSGKIMRRI LRKIAAGDTSNLGDTSTLADPGVVEKLLLEEKQ--AIAMPS	652
FACS_strco	VRYLDAVPRNDMGKIMKRALNRD-----	485
CBAL_alcsp	YFILDQLPKNALNKVLRHHVQQVSS-----	501
ACS_yeast	IILVDDLPKTRSGKIMRRI LRKILAGESDQLGVDVSTLSNPGIVRHLIDSVK-L-----	713
DltA_bacce	FMYQSSIPMTPNGKVD RKKLLSEVTA-----	504
DltA_strp1	FLYRDSLPLTPNGKIDIKTLINENNR-----	512
DltA_strp6	FLYRDSLPLTPNGKIDIKTLINENNR-----	512
PheA_anemi	FIQLDKMPLT SNGKIDRQKLPEDLTFGMRVDYEA--PRNEIEETLVTIWQDVLGI--	557
DltA_bacsu	FIYQDHIQMTANGKIDRKRIGEEVLV-----	503

Abb. A-2: Sequenzalignment verwandter adenylat-bildender Enzyme mit bekannter Struktur.

Das Alignment wurde mit ClustalO [Sievers *et al.*, 2011] durchgeführt. Ein * (Stern) bedeutet eine vollständig konservierte Aminosäure, ein : (Doppelpunkt) zeigt die starke Konservierung von Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften an und ein . (Punkt) stellt die schwache Konservierung von ähnlichen Aminosäuren dar. Striche (-) bedeuten Lücken, die zu einem besseren Sequenzalignment führen. Die Abkürzungen stehen für folgenden Proteine (siehe auch Tab. A-1): 4CL1_soybn - 4CL1 [*Glycine max*], 4CL1_popto - 4CL1 [*Populus tomentosa*], Luci_luccr - Luciferase [*Luciola cruciata*], Luci_phopy - Luciferase [*Photinus pyralis*], Luci_lamtu - Luciferase [*Lampyrus turkestanicus*], LCFACS_arcfu - Long-chain-fatty-acid-CoA ligase [*Archaeoglobus fulgidus*], FACS_myctu - Fatty-acid-CoA ligase [*Mycobacterium tuberculosis*], MaCoA_rhopa - Malonyl CoA synthetase [*Rhodopseudomonas palustris*], LCFACS_rhopa - Long-chain-fatty-acid CoA ligase [*Rhodopseudomonas palustris*], LCFACS_theth - Medium-chain-fatty-acid-CoA ligase [*Thermus thermophilus* HB8], DhbE_bacsu - 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase [*Bacillus subtilis*], EntE_ecoli - 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase [*Escherichia coli* str. K-12], BeCoA_burxe - Benzoate-coenzyme A ligase [*Burkholderia xenovorans*], MenE_staa - O-succinylbenzoic acid--CoA ligase [*Staphylococcus aureus*], AMPbp_metac - AMP-binding protein [*Methanosarcina acetivorans*], ACS_salty - acetyl-CoA synthetase [*Salmonella enterica*], FACS_strco - Fatty acid synthase [*Streptomyces coelicolor*], CBAL_alcsp - 4-chlorobenzoyl CoA ligase [*Alcaligenes sp.*], ACS_yeast - Acetyl-coenzyme A synthetase 1 [*Saccharomyces cerevisiae* S288c], DltA_bacce - D-alanine ligase subunit 1 (DltA) [*Bacillus cereus*], DltA_strp1 - D-alanine ligase subunit 1 (DltA) [*Streptococcus pyogenes* M1], DltA_strp6 - D-alanine ligase subunit 1 (DltA) [*Streptococcus pyogenes* M6], PheA_anemi - ATP-dependent D-phenylalanine adenylase (D-PheA) [*Brevibacillus brevis*], DltA_bacsu - D-alanine protein ligase (DltA) [*Bacillus subtilis*]

Tab. B-1: Liste sequenziell mit LivB verwandter Enzyme

UniProt Entry	Protein names	Organism	Length	Identity	Score	Gene names
Q2MF60	Putative 6'-aminotransferase	<i>Streptomyces lividus</i>	416	100,00%	2151	livB
Q2MFN0	Putative paromomycin 6'-aminotransferase	<i>Streptomyces rimosus</i>	417	79,00%	1740	parB
Q53U08	Aminotransferase (Putative bifunctional neomycin 6'-and 6'''-aminotransferase, NeoB)	<i>Streptomyces fradiae</i>	416	71,00%	1538	neoN neoB
Q4R0X2	Putative glutamate-1-semialdehyde aminotransferase (Putative ribostamycin 6'-aminotransferase)	<i>Streptomyces ribosidificus</i>	416	68,00%	1492	rbmH ribB
Q70KD9	Gentamicin (Hexosaminyl-6-) aminotransferase I (GntW)	<i>Micromonospora echinospora</i>	417	55,00%	1142	gacK genB1 gntW
C9W371	Aminotransferase	<i>Micromonospora inyonensis</i>	417	54,00%	1142	sis5
F5LRC5	Aminotransferase, class III	<i>Paenibacillus</i> sp, HGF7	432	32,00%	532	HMPREF9413_2344
Q4H4F5	Possible aminotransferase (Putative hexosaminyl-6'-aminotransferase)	<i>Bacillus circulans</i>	432	32,00%	530	btrB
C4YVL7	Putative aminotransferase	<i>Rickettsia endosymbiont of Ixodes scapularis</i>	420	29,00%	528	REIS_1503
Q70KE6	Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase-like protein (GntL) (Putative gentamicin aminotransferase II)	<i>Micromonospora echinospora</i>	414	37,00%	522	gacE genB2 gntL
Q6QVT7	GntH (Putative gentamicin aminotransferase IV)	<i>Micromonospora echinospora</i>	445	30,00%	373	gntH genB4
Q70KE2	Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase-like protein	<i>Micromonospora echinospora</i>	444	30,00%	372	gacB
Q70IX9	Putative aminoglycoside 6'-aminotransferase, TobB	<i>Streptoalloteichus tenebrarius</i>	395	33,00%	356	tobB
Q70KE4	Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase-like protein (GntJ)	<i>Micromonospora echinospora</i>	450	30,00%	351	gacC gntJ
Q2MG50	Putative gentamicin aminotransferase III	<i>Micromonospora echinospora</i>	490	30,00%	351	genB3
Q0X0F8	Putative aminotransferase	<i>Streptoalloteichus hindustanus</i>	395	34,00%	347	alloD
Q6L741	Aminotransferase (Putative glutamate-1-semialdehyde 2,1 aminomutase)	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	392	33,00%	344	kanB kacL
Q2UZE0	Putative AGA 6'-aminotransferase	<i>Streptomyces tenjimariensis</i>	448	28,00%	337	istB
C9W384	Aminotransferase	<i>Micromonospora inyonensis</i>	451	29,00%	330	sis18
Q2MG01	Putative fortimicin 6'-aminotransferase	<i>Micromonospora olivasterospora</i>	442	28,00%	328	forB
Q2J7L8	Aminotransferase (EC 2,6,1,-)	<i>Frankia</i> sp,	444	28,00%	300	Franci3_3369
C4RFU1	Aminotransferase	<i>Micromonospora</i> sp,	412	29,00%	293	MCAG_00530
E7QX19	Aminotransferase class-III	<i>Haladaptatus paucihalophilus</i>	438	31,00%	289	ZOD2009_16788
Q73SQ3	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase (GSA)	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	445	31,00%	288	hemL MAP_4020

Anhang

F7P687	Glutamate-1-semialdehyde-2,1-aminomutase	Mycobacterium avium	445	31,00%	288	MAPs_40210
A0QLG2	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase (GSA)	Mycobacterium avium	445	31,00%	283	hemL MAV_4621
F9QJP0	Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase	Mycobacterium colombiense	449	30,00%	272	MCOL_08823
D1C8D4	Aminotransferase class-III	Sphaerobacter thermophilus	429	28,00%	270	Sthe_2663
D3FEK1	Aminotransferase class-III	Conexibacter woesei	427	31,00%	268	Cwoe_1246

Tab. B-1: Liste sequenziell mit LivB verwandter Enzyme

Die Liste wurde durch eine Blast-Suche [Altschul et al., 1990] mit der Aminosäuresequenz von LivB aus *Streptomyces lividus* ermittelt. Die Proteine sind absteigend nach dem Score bzw. der Sequenzidentität geordnet. UniProt Entry – Eintrag in die UniProt-Datenbank, length – Länge der Aminosäuresequenz, Identity – Sequenzidentität.

Abb. B-1: Sequenzalignment von LivB mit den 15 nächsten Verwandten

LivB	-----MTRNSSTLAE---KP	12
ParB	-----MTQNFATLAE---TP	12
neoB	-----MTKNSSLAE---FP	12
RibB	-----MTENSSLAE---FP	12
GacK	-----MTIDIGACKLLAQ---EP	15
sis5	-----MTIDIGACKLLAQ---EP	15
HMPR	-----MKQDLVENSEKLLAVLGTHI	20
BtrR	-----MKQETVKSSEQLLSVLGTYI	20
REIS	-----MDYQDLLVQ---KS	11
GacE	-----MIIAN---AD	7
GntH	-----MN-YRELIERARRTT	14
GacB	-----MN-YRELIERARRTT	14
TobB	-----MTRTNETIATITDWSRS-----AEHLRRSHEVT	28
GacC	-----MDSANLT-NRGLVERARRVT	19
GenB3	MAVADHRSSSEPSWRAGRTARRRSRWHSWARVKSAREGSQDMSANLT-NRGLVERARRVT	59
AlloD	-----MTQTNEISATTGDWSRS-----AEHLRRSHEVT	28
: . ** : * . * : . : : * : : :		
LivB	TCP-KD-ADGNPRIFTAARGARLTDRAKWEIDEDNARGSVVLGHADPEIAEAVARAA-S	69
ParB	TCP-RN-AEGNPRVFSASGAYVTDAGKRWIDEDNTRGSVLLGHGDPEVAEAVGRAA-T	69
neoB	TCP-RD-EKDRPRVFTAASGAWLTDESFRWIDEDNARGSILLGHGDPVVAEAVARAA-T	69
RibB	TCP-RD-VQDRPRVFTSASGAYVTDKSGFCWIDEDNARGSIVLGHGDPVVEAVGRAA-T	69
GacK	TCP-RD-ADGRPRVFEVGSAYLTDPDGRRWIDEDNARGSVVLGHGDEEVAEAIARAA-R	72
sis5	TCP-RD-ADGRPRVFEVGSAYLTDPDGRRWIDEDNARGSVILGHGDEEVAEAIARAA-R	72
HMPR	DSP-VDPFRNERVMFSGAYLFDYNGGNYIDLMMNGKGSII LGHNDPHLNAALRNFL-E	78
BtrR	DSP-VDPFRKERVMSRSGAYLFDYDGGNYIDLMMNGKGSII LGHNDPSVNAALRNFL-E	78
REIS	IYP-SE-SDDYPIVFKYGGAFLYDINGNKYIDEMNGKGNII LGHNPKHLIAELIDEL-K	68
GacE	GCT-PY-EVARGVTIVRGEVYDAEGRGLIDLNSFGSVMLGHQDPVVEAVLKTIV-R	64
GntH	AAEEYDISGRYPSVIAHAEGAWMTDLGSRNYVDLTGADAAVILGYRHPAVNEAITRQIRD	74
GacB	AAEEYDISGRYPSVIAHAEGAWMTDLGSRNYVDLTGADAAVILGYRHPAVNEAITRQIRD	74
TobB	TNPRPDEDGQYPCVLRGSGARVHMDGNAYDLTCSFGTVLIGHAEREVTDAIRACL-D	87
GacC	AAENYDIGTRFSAMIQSGEGAWLTDVEGNRYVDLTASSGTII LGHRNQAVTEAITRQIRD	79
GenB3	AAENYDIGTRFSAMIQSGEGAWLTDVEGNRYVDLTASSGTII LGHRNQAVTEAITRQIRD	119
AlloD	TNPRPDQDQGFPCVLSRGAGARVYDLDDNAYFDLTCFSGTVLIGHAEPVTDAIRASL-D	87
: . * : * . * : . : : * : : :		
LivB	GAAGTATGWSPLVDTVADRL--LALCGGEVVGLFERTGTSAVRAAVLAVRESVGRPLVLSS	127
ParB	GALGTATGWSPLLDTVTSRL--LELCGGEVVGLFERTGTSAVRAAVLAVREAVGAPVLSS	127
neoB	GADGTATGWSRRVDAVLERL--HALCGGEVVGLFRSGTAAVRAAVLAVREATGRPLLSA	127
RibB	GADGTATGWSPRVDAVLERL--HALCGGEVVGLFRSGTAAVRAAGLAVREATGRPLLSA	127
GacK	GRSGVGTAWSPVLDSSLGQL--QEVCGGDVVGLYRTGTAALRSVTCAVRDARDRSIVLSS	130
sis5	GRSGVGTAWSPVLDSSLGQL--QEVCGGDVVGLYRTGTAALRSVTCAVRDARERSIILSS	130
HMPR	QDREIVTGPSKPIVELAERIKKDSALPDAKVSEYATGTAAACRAAVYAARDYSGKKIVLSS	138
BtrR	QDREIVTGPSKPIIDLAERIKKDSALPDAKVSEYTTGTAAACRAAVYAARDYSGKKIVLSS	138
REIS	LGMDVRTGFTEVMFKFTHQI--NKALGYDKIAYFKSGTEAVKAAMLSAKTYNSKKIILSC	126
GacE	SGVFAAASLDLQNHLEQIA--GDLPGDQVAFEFKGTAAATRAAASAARQVTGKRLIASC	122
GntH	YGTTFASTLSVPRVELAERMCERYEC-AEKVVEHKTGTEGTAMAVRLARAATGRELVLSS	133
GacB	YGTTFASTLSVPRVELAD-GCERYEC-AEKVVEHKTGTEGTAMAVRLARAATGRELVLSS	132
TobB	EGNLFYTGSPRRLALAERLLDWFPPW-ADQALFYRTGSCAVSSVARLSQHVTRTAVLTS	146
GacC	FGTAFASTLSVPRVELAERLCERYEC-AEKVVEHKTGSEGTAMAARLARAATGRELILSC	138
GenB3	FGTAFASTLSVPRVELAERLCERYEC-AEKVVEHKTGSEGTAMAARLARAATGRELILSC	178
AlloD	DGNLFYTGSPRRLALAERLLDWFPPW-ADQALFYRTGSCAVSAVARLTQHVTRTTVLTS	146

Anhang

```

****;. *                                ; . . . . . : : : *
LivB  GYHGYDPMWYPPHEPL-EPNADGIVDFFYDLDLLAGLLRD-RDRIAAVVISPDMHMLTPG 185
ParB  GYHGYDPMWYPAKAPF-EPNADGIVDFFFDLDVLAGLLRDGRERVAAVVSPDHMHLSPR 186
neoB  GYHGYDPMWYPSAPL-EPNADGVVDFFDLGLLRELLRA-PERVAAVVSPDHMHLSPG 185
RibB  GYHGYDPMWYPSADAPL-VPNADGVVDFFDLGLLAELLAA-PERVAAVVSPDHMHLSAA 185
GacK  GYHGYDPMWH-CDEPF-TPNQHGIVEFLFDLDVLAEWLSR-PEQVAAVVISPDMHMLGER 187
sis5  GYHGYDPMWH-CDEPF-APNQHGIVEFLFDLDVLAEWLSR-PEQVAAVVSPDHMHLGER 187
HMPr  GYHGWDPMWRQQGALL-EPNEDGVIEFYFIPPELLERALTAHKDQVALVLFSPDYTYLSAS 197
BtrR  GYHGWDPMWRQQGPLL-EPNEDGVIEFYFIPPELLERALTAHKDQVALVIFSPDYTYLSAS 197
REIS  GYHGYDPIWKFSGNLE-EFNKNGTINFFDLELLEKLINKYKEQISAIISPDPLYLTKE 185
GacE  GYHGYDLMWE-FTPPG-QPNSEDVLHCYHLELIDQVLDKHAHELAAVIIPDYIHVSPE 180
Gnth  GYHGWHE-WOMAGEEFGYQQSTGVVGFYNEKALAKMLEAFGEQVAGVIVSPEVLYFDLD 192
GacB  GYHGWHE-WOMAGEEFGYQQSTGVVGFYNEKALAKMLEAFGEQVAGVIVSPEVLYFDLD 191
TobB  GYHGWHD-WHLEAVPEAKLFFSYATEFHDDLDVYRAYLDRHADEIAAVVVTPEPTRHPLE 205
GacC  GYHGWHE-WQLAGETFGYQQTGVVGFYNEKALAKMLEAFGNEVAGVLISPELLYFDVE 197
GenB3 GYHGWHE-WQLAGETFGYQQTGVVGFYNEKALAKMLEAFGNEVAGVLISPELLYFDVE 237
AlloD GYHGWHD-WHLEAVPEAKLFFSYATEFHEDLDVYRAYLERHADEIAAVVVTPEPTRKPVG 205

```

```

*:* * * *                                .* : : * * : :
LivB  WYARARALLADAGVPLIVDEVKVGRLRYGPGGLSTAD--LLDADVWVVAKGMANGYPTAAVG 243
ParB  WYERARALLAEAAVPLIVDEVKVGRLRYGPGGLSTAG--LLDADVWVTAKGVANGFPTAAVG 244
neoB  WYRELRLCSAAGVVLVADDEVKVGRLRYAPGLSTAE--LLAPDVWVVAKGMANGHAVSAVG 243
RibB  WYRELRLCSAAGVVLVADDEVKVGRLRYSPGLSTAE--LLNPDVWVVAKGMANGHAVSAVG 243
GacK  WYTEFTRLTKEADVPLVADDEVKVGRLRYRAGLST-P--LLDPAVWIVAKCLANGSEVAAVG 244
sis5  WYTEFTRLTKEADVPLVADDEVKVGRLRYRAGLST-H--LLDPAVWIVAKCLANGSEVAAVG 244
HMPr  TIERILGICRAHGVLVCCDDVKQGYRHRQSSSLEMVTAEKADMYVFSKGLSNGHRISCLV 257
BtrR  TMERILGICRAHGVLVCCDDVKQGYRHRQSSSLELVTTTEKADMYVFSKGLSNGHRISCVV 257
REIS  WFDKLNLSLIKESNVVMIMDEVKVGFRYNGFLYTSRY-GLKPDIAITISKGIANGFPISVVC 244
GacE  YTADLFCERCERVGVVTIADDEVKHGRLRQASVTEA-SVVADMYTYAKGISNGWPLSCVA 239
Gnth  HYRRMSALCARYDVPFMLDEVYTGFRAGPKGVHGL--GVPADVVLGKGLANGHSLAAVM 250
GacB  HYRRMSALCARYDVPFMLDEVYTGFRAGPKGVHGL--GVPADVVLGKGLANGHSLAAVM 249
TobB  HYRTLRLDAAEAGCLFVLDDEVKTGMRAGKGLSARA-GLEPDAVTVSKGLANGHSISAVV 264
GacC  FYQRMALCARYDVPFMMDEVYTGFRAGPKGVHGL--GVPADVVLVSKGLANGHSLAAVM 255
GenB3 FYQRMALCARYDVPFMMDEVYTGFRAGPKGVHGL--GVPADVVLVSKGLANGHSLAAVM 295
AlloD HYRVLRELAAEHGCLFVLDDEVKTGMRAGKGLSALA-GLEPDAVTVSKGLANGHSISAVV 264

```

```

. : * : : . . : :
LivB  GSRTLLKPLREVSF--TSFFEPTVLAQAERTLARVATGAPQRTVREAGERELTHARKSLA 301
ParB  GSRTLLKPLREVSF--TSFFEPTVLAQAERTLARVATGEPQRTVRETGDLFVEHARSALA 302
neoB  GSRLLKPLKEVSF--TSFFEPTVLAQAADAARVATGEPQRAVREAGDRFLRHARKALD 301
RibB  GPRALLRELKEVSF--TSFFEPTVLAQAADAVLSRVATGEPQRALREAGDRFLCHARKALQ 301
GacK  GDAHLLAALEDVSF--TSYFEPTAMAAATTLRRMATGEPQQAIRAAGDRFIAHTRAAFA 302
sis5  GDAHLLAALEDVSF--TSYFEPTALAAATTLRRMATGEPQQAIRAAGDRFIAHTRAAFA 302
HMPr  STDEIMAEKTEHTY--TAYYQMLPILSSLETLLKMETGKGYDLIRFYGHALTGNLKEFLA 315
BtrR  SSDEIMAEKTEHTY--TAYYQMLPILSSLETLLKMETGKGYDLIRSYGQTLTGNLKEFLV 315
REIS  GYKEMMEGCSNLNY--TCFFDAITFFVATKVMETLSKDFYKVLNQLVSLNINTISSLIE 302
GacE  GDERFLKPLAEFVS--TLTFFEAPSFAAASATLDRLAELDVAQLAIDGARFVSEAKMIS 297
Gnth  GRRDIIDAYDVSGIQGTYTREVPPMAAALAVFEVLDTPGVYEHAEAMGRRLADGMREILT 310
GacB  GRRDIIDAYDVSGIQGTYTREVPPMAAALAVFEVLDTPGVYEHAEAMGRRLADGMREILT 309
TobB  GSRRITEGLAEAHVWSTYQNEQVGYAAALSTVDLFLREDVAGVVERTGRTVERAERSAFA 324
GacC  GRRDIIDAYDVSGIQGTYTREVPPMAAAMAVLDVLDTPGVYEHAEAMGRRLADGMREILT 315
GenB3 GRRDIIDAYDVSGIQGTYTREVPPMAAAMAVLDVLDTPGVYEHAEAMGRRLADGMREILT 355
AlloD GSRRITEGLDEAHVWSTYQNEQVGFAAALATVDLFLESQDVAAVVGRTRGRVVEQAERSAFA 324

```

	: * ; * ; : ; * ; :	
LivB	GAGLPVELAGDGEFFQFVAATRELE--KALWATEDEGLLFYRGNQAVSAAFDPDVL-D	358
ParB	AASLPLEVAGNGTFFQFVPATREVK--KAFYKATEEEGLLFYRNDNQAVSAAFDPDVL-D	359
neoB	DASLPVEIAGDGTFFQFVPATEELE--EALYGAANAEGLLFYAGDNQGVSAAFDEAVL-G	358
RibB	DAALPVEIAGDGTFFQFVPASEELE--YAFYAAANTEGLLFYAGDNQGVSAAFDDAVL-T	358
GacK	NAGVPIDLAGNGNLFQFVCADEVA--DAFHAAAAAEGLLFFEGDNQTPSAAFTDEVV-E	359
sis5	GAGVPIDLAGNGNLFQFVCADEVQ--DAFHAAAAAEGLLFFEGDNQTPSTAFTDEVV-E	359
HMPR	QSALPIEVNGS-SIFQLVFGDEELE--EAFYREAFNQGLILFEGDNQSLSLCMDKDVQ-V	371
BtrR	QSSLPIEVNGS-SIFQLVFGDEELE--EAFYREAFIQGLILFEGDNQSLSLCMDKDVQ-V	371
REIS	QFELPIQIKHNGSIFQFIFPDQEAS--DVFFYESIQHGLIFYPGDNQCFSYAFNDQKVHL	360
GacE	TRDLPITEMAGTGAAQFVCAE-EVE--EVLLPHALAEGLILEPSDQQYPSACFRGEVV-D	353
GntH	GEGIPNWVGGPALMFDVVLPNDDLGW--EIKYTAHDFGVYFEDSGTQLVTTAAFDAAV-D	367
GacB	GEGIPNWVGGPALMFDVVLPNDDLGW--EIKYTAHDFGVYFEDSGTQLVTTAAFDAAV-D	366
TobB	ERGLPVEVHGWGPMFDLDFSAAEEDLPERLQLALLRHGVFC-DVGDDFNLMYRMADHL-D	382
GacC	GEGIPNWVGGPALMFDVVLPNDDLGW--EIKYTAHDFGVYFEDSGTQLVTTAAFDAAV-D	372
GenB3	GEGIPNWVGGPALMFDVVLPNDDLGW--EIKYTAHDFGVYFEDSGTQLVTTAAFDAAV-D	412
AlloD	ERGLPVEVHGWGPMFDLDFSAAEGLADRLQLAFLRHGVFC-DIGDDFNVMYRTADHL-D	382
	. . :	
LivB	DAEARFTRVCDRLA---PYA---SDAPVSEEARYLAAWNVIDGLRDAARDRTT--REWI	410
ParB	DARARFSRVCDRLA---PFA---AAGPVGEEARYQAANVMDGLREAERDARET--REWV	411
neoB	EAERRFARVCERLA---PYA---GGEFVGDAAARYRVAWNVMGLRQAPRDREET--TGLL	410
RibB	DAEQRFTRVCDRLS---AYA---GGEFVDEAARYRVAWNVMGLREAERDRAAT--DGML	410
GacK	DACGRIDRVSAALT---GRF---TDRELTEESWYASAWGAMGLADRPRTREET--TAIV	411
sis5	DACGRIDQVAATLA---GLF---TGRELTEESWYASAWGAMGLADRPRTREET--TAIV	411
HMPR	DLRRFANVTDVLSAQFKHL---RGKEVTTEQTFRTAWNMDGASDLLPYEKQL---KLL	425
BtrR	DLIRRFANVTDVLSAQFKHL---RGKEVTTEQTFRTAWNMDGASDLLPYEKQL---KLL	425
REIS	ELKRFINLKFVIKKNPLFQ---KGRKPTLEWEIKTAWYLMGGLPSIQINKELK--ESIL	415
GacE	DAERLDRALTMAAARPDL---VGREVTQLDRVNAAFQCMDGLPGRPDGWSLDQCVYV	410
GntH	HALTAFRKATRQVADRPDIAPTSGGELTEERKLDFAEEAFGGLL---RDDERT--NALI	422
GacB	HALTAFRKATRQVADRPDIAPTSGGELTEERKLDFAEEAFGGLL---RDDERT--NALI	421
TobB	ELLERVTAATASV-----	395
GacC	HALTAFRKATRQVIADRPDIAPTSGGELTEERKLDFAEEAFGGLL---RDDERT--NALI	427
GenB3	HALTAFRKATRQVIADRPDIAPTSGGELTEERKLDFAEEAFGGLL---RDDERT--NALI	467
AlloD	ELTGRVTAATASV-----	395
LivB	SRLDD-----	416
ParB	DRFLDD-----	417
neoB	ARLDD-----	416
RibB	ARLDD-----	416
GacK	ERLWED-----	417
sis5	ERLWED-----	417
HMPR	DNLIGGG-----	432
BtrR	DNLIGGG-----	432
REIS	MSLPE-----	420
GacE	TAQL-----	414
GntH	DETIEKVNRDRSIKPVLIPAQN	445
GacB	DETIEKVNRDRSIKPVLIPAQN	444
TobB	-----	
GacC	DETIEKVNRDRSIKPVLIPAQN	450
GenB3	DETIEKVNRDRSIKPVLIPAQN	490
AlloD	-----	

Abb. B-1: Sequenzalignment von LivB mit den 15 sequentiell nächsten Verwandten

Es sind die nächsten 15 sequentiell mit LivB verwandten Enzyme dargestellt, siehe auch Tab. B-1. Markiert sind die Positionen der an der Bindung des Kofaktors PLP beteiligten Aminosäuren von LivB, das konservierte Lysin (LivB Lys231) in grün, sowie weitere für die PLP Bindung wichtige Reste in hellblau. Desweiteren sind die Positionen von an der Bindung des Paromomycin beteiligten Aminosäuren in orange gekennzeichnet. Das Alignment wurde mit ClustalO [Sievers *et al.*, 2011] durchgeführt. Ein * (Stern) bedeutet eine vollständig konservierte Aminosäure, ein : (Doppelpunkt) zeigt die starke Konservierung von Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften an und ein . (Punkt) stellt die schwache Konservierung von ähnlichen Aminosäuren dar. Striche (-) bedeuten Lücken, die zu einem besseren Sequenzalignment führen.

Abb. B-2: Sequenzalignment der fünf nächsten verwandten Enzyme mit LivB

LivB	---MTRNSSTLAEKPTCPKADGPNRIFTAARGARLTDKAGKEWIDFDNARGSVVLGHAD	57
ParB	---MTQNFATLAEIPTCPRNAEGNPRVFSASGAYVTDGAKRWIDFDNTRGSSVLLGHGD	57
NeoB	---MTKNSSLLAEFPTCPKDEKDRPRVFTAASGAWLTDESDFRWIDFDNARGSI LLGHGD	57
RibB	---MTENSSLLAEFPTCPKRDVQDRPRVFTSASGAYVTDKSGFCWIDFDNARGSI VLGHGD	57
GacK	MTIDIGAGKLLAQEPTCPKADGPRPRVFEVSGAYLTDPDGRRWIDFDNARGSVVLGHGD	60
Sis5	MTIDIGAGKLLAQEPTCPKADGPRPRVFEVSGAYLTDPDGRRWIDFDNARGSVILGHGD	60
	:*: . .***: * . ** : ** * *****:****:***:*	
LivB	PEIAEAVARAASGAAGTATGWSPLVDTVADRLLALCGGEVVGLEFRTGT SAVRAAVLAVRE	117
ParB	PEVAEAVGRAATGALGTATGWSPLLDVTVSRLLLELCGGEVVGLEFRTGT SAVRAAVLAVRE	117
NeoB	PVVAEAVARAATGADGTATGWSRRVDVAVLERLHALCGGEVVGLEFRSGTAAVRAAVLAVRE	117
RibB	PRVVEAVGRAATGADGTATGWSPRVDVAVLERLHALCGGEVVGLEFRSGTAAVRAAGLAVRE	117
GacK	EEVAEAIARAARGRSVGTAWSPVLDLQLQEVCGDVVGLYRTGTAAALRSVTCVARD	120
Sis5	EEVAEAIARAARGRSVGTAWSPVLDLQLQEVCGDVVGLYRTGTAAALRSVTCVARD	120
	:.***:*** * *..*.* ** :*: : * :****:****:***:***: . ***:	
LivB	SVGRPLVLSSGYHGYDEPMWYPPEPLEPNADGIVDFFFDLDDLGLLRD-RDRIAAVVIS	176
ParB	AVGAPLVLSSGYHGYDEPMWYPAKAPFEPNADGIVDFFFDLDDLGLLRDGRERVAVVVS	177
NeoB	ATGRPLLLSAGYHGYDEPMWYPSEAPLEPNADGVVDFFDLGLLRELLRA-PERVAVVVS	176
RibB	ATGRPLLVSAAGYHGYDEPMWYPSDAPLPNADGVVDFFDLGLLAELAA-PERVAVVVS	176
GacK	ARDRSIVLSSGYHGYDEPMWH-CDEPFTPNQHGIVEFLFDLVLAEWLSR-PEQVAVVIS	178
Sis5	ARERSIILSSGYHGYDEPMWH-CDEPFAPNQHGIVEFLFDLVLAEWLSR-PEQVAVVVS	178
	: :*:****:****: . * : ** .*:*:***:***: * * :*:****:***:	
LivB	PDHMLTPGWYARARALLADAGVPLIVDEVKVGRLYGPGLSTADLLDADVWVAKGMANG	236
ParB	PDHMLSPRWYERARALLAEAAVPLIVDEVKVGRLYGPGLSTAGLLDADVWVAKGVANG	237
NeoB	PDHMLSPGWYRELRLCSAAGVVLVADEVKVGRLYAPGLSTAEELLAPDVWVAKGMANG	236
RibB	PDHMLSAAWYRELRLCSAAGVVLVADEVKVGRLYSPGLSTAEELLNPDVWVAKGMANG	236
GacK	PDHMLGERWYTEFTRLTKEADVPIADEVKVGRLYRAGLST-PLLDPAVWIVAKCLANG	237
Sis5	PDHMLGERWYTEFTRLTKEADVPIADEVKVGRLYRAGLST-HLLDPAVWIVAKCLANG	237
	***** ** . * * * * :*:****:****: **** ** ***:** :***	
LivB	YPTAAVGGSSRTLLKPLREVSFTSFFFEPTVLAQAERTLARVATGAPQRTVREAGERFLTHA	296
ParB	FPTAAVGGSSRTLLKPLREVSYSFFFEPTVLAQAERTLARVATGEPQRTVRETGDLFVEHA	297
NeoB	HAVSAVGGSSRTLLKPLKEVSFTSFFFEPTILAAADAALRVATGEPQRAVREAGDRFLRHA	296
RibB	HAVSAVGGPRALLRPLKEVSFTSFFFEPTILAAADAVLSRVATGEPQRALREAGDRFLCHA	296
GacK	SPVAAVGGDAHLLAALEDVSFTSYFEPTAMAAATTLRRMATGEPQQAIRAAGDRFIAHT	297
Sis5	SPVAAVGGDAHLLAALEDVSFTSYFEPTALAAATTLRRMATGEPQQAIRAAGDRFIAHT	297
	:**** ** * :*:***:****:*** * * :*** ***:** :*: * : *	
LivB	RKSLAGAGLPVELAGDGSFFQFVAATRELEKALWATEDEGLLFYRGNQAVSAAFDPDV	356
ParB	RSALAAASLPLEVAGNGTFFQFVPATREVKKAFYKATEEEGLLFYRNDNQAVSAAFDPDV	357
NeoB	RKALDDASLPVEIAGDGTFFQFVPATEELEEALYGAANAEGLLFYAGDNQGVSAAFDEAV	356
RibB	RKALQDAALPVEIAGDGTFFQFVPASEELEYAFYAAANTEGLLFYAGDNQGVSAAFDDAV	356
GacK	RAAFANAGVPIDLAGNGLFQFVCADDEVADAFHAAAAEGLLFFEGDNQTPSAAFTDEV	357
Sis5	RAAFVAGVVPIDLAGNGLFQFVCADDEVQDAFHAAAAEGLLFFEGDNQTPSTAFTEDEV	357
	* : : * :*:***:***:**** * * : * : * : *****: *** * : ** *	
LivB	LDDAEARFTRVCDRLAPYASDAPVSEEARYLAAWNVIDGLRDAARDRTTREWISRLDLD	416
ParB	LDDARARFTRVCDRLAPFAAGPVGEEARYQAAWSVMDGLREAERDARETREWVDRFLDD	417
NeoB	LGEAERRFARVCDRLAPYAGGEPVGDAAARYVAVNVMDGLRQAPRDREETTGLLARLLDD	416
RibB	LTDAEQRFTRVCDRLSAYAGGEPVDEAARYRVAVNVMDGLREAERDRAATDGMLARLLDD	416
GacK	VEDACGRIDRVSAALTGRFTDRELTEESWYASAWGAMDGADRPRTRETTAIVERLWED	417
Sis5	VEDACGRIDQVAATLAGLFTGRELTEESWYASAWGAMDGADRPRTRETTAIVERLWED	417
	: * * : : * : * : : * * * :****: * * * : * : * :	

Abb. B-2: Sequenzalignment der fünf nächsten verwandten Enzyme mit LivB

Alignment der fünf nächsten Verwandten von LivB (siehe Tab. B-1). Das Alignment wurde mit ClustalO [Sievers et al., 2011] durchgeführt. Farbgebung wie in Abb. B-1. Ein * (Stern) bedeutet eine vollständig konservierte Aminosäure, ein : (Doppelpunkt) zeigt die starke Konservierung von Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften an und ein . (Punkt) stellt die schwache Konservierung von ähnlichen Aminosäuren dar. Striche (-) bedeuten Lücken, die zu einem besseren Sequenzalignment führen.

Abb. B-3: Strukturelles Sequenzalignment von LivB mit den Ergebnissen der DALI-Suche

LiVB	-----STLA-----EKTPCPKA-----DGNPR-IFTA-A-RGARLFDL-R-A-----GREWIDFDNARGSVVLG-H-ADPEIAE-----AVARAASGAAG-TA-----	70
GSAM	-----FKTIKSEIFAQAQKLMPG-----GVSSPVRAFKSVGGQPI-VFDR-V-KDAYAVDV-D-----GNRYIDVYGTWGPALCG-H-AHEPVIE-----ALKVAMEKG-T-SF-----	87
AO AT	-----TFDEVIL-----PVY-APAD-----F-IPVK-G-KGSRVMDQ-Q-----GREYIDFAGGIAVTALG-H-CHPALVE-----ALKSQGE-TLM-HT-----	66
O AT	-----GPFPSDDIFEREYKGA-----HNY-HPLP-----V-ALER-G-KGIYLWDV-E-----GRKYFDLSSYSAVNQG-H-CHPKIVN-----ALKSQVDK-L-TL-----	75
GABA	-----NSNKELMORRQSOAIP-----RGVQIH-----PI-FADR-A-ENCRVMDV-E-----GREYLDFAGGI AVLNTG-H-LHPKVVA-----AVEAQLKK-L-SH-----	74
PG AT	SILNDYKRKTEGVSFWAQRARSVM-----PD-----GAFD-PH-GL-FISD-A-QGARKTDV-D-----GNVYLDFFGGHAGLVLG-H-GHPRVNA-----ALAEALSHG-V-QY-----	85
AC_racemase	-----KALYDRDGAAG-----NLQKLRFFP-----L-AISG-G-RGARLTEE-N-----GRYLDLSCAGAAASLVG-Y-GHPAIVA-----AVSAAA-NPA-GATIL-----	76
DA_DC	-----LNDDATFWNRQHLV-----RYGG-----TFPEMIER-A-KGSFVYDA-D-----GRAILDFTSGQMSAVLG-H-CHPEIVS-----VIGEYAG-KLD-HL-----	76
bac_AT	-----MTTDLAFADEHRI-----WHPY-----TSMTPSPFVY-PVVS-A-EGCELLS-D-----GRKLDVGMSSWRAIHG-Y-NHPQLNA-----AMKSQIDAMS-HV-----	62
DAPA	-----RTTSQWRELDAAHML-----LHPFDTASLNQAGAR-VMTR-G-EGVELLWS-E-----GNKIIDMAGLVCNVVNG-Y-GRDFAE-----AARRQME-ELP-FY-----	78
omega_TA	-----TTPDRVHEVLGRSML-----VDGLDVLDLTRS-----GGSYLWDAIT-----GRRYLDMTFVASSALG-M-NPPALVDREFHAELMQAAL-N-KP-----	81
Lysin_AT	-----ADLLSKDFLIAEAEALLATGVR-----DPYAI-VMDK-V-ISPTEAMI-N-----GRKTIILGT-----YNYMGMT-FDEPVA-----AGQALDEFGS-GT-----	78
SPT	-----GSHXRGEFYQQLTNDLETARAEGLFKEER-IITS-A-QOADIIVA-D-----GSHVINFCA-----NNYLGLA-NHPDLIA-----AAKAGXDSHG-F-GX-----	79
KBL	-----MDYNLALDKAI-----QKLHDEGRYRFFI-DIER-EKGAFFPKAQN-RDPGGKQDITVWCGN-----DYLGMG-QHPVVLA-----AMHEALEAVGA-GS-----	80
ALAS	-----SWQEKINAALDAR-----RAADALRRRY-PVAQ-G-AGRWLVAD-----DRQYLNFSNN-----DYLGLS-HHPQIIR-----AMQQGAEQFGI-GS-----	72
KAPA	-----IKPYRDRFSSH-ARLPRAGLPRAEILAE IAAMGAE-SPAWRDG-----YASGA-----VYHG-DEHHIAFLNE-----VYALQS-QS-NP-----	71
SPL	-----KFTPPPASLR-----NPLIIP-E-----KIMMG-PGPS-N-C-SK-RVLT-----AMTN-----TVL-SN-----	43
3-HKT	-----MRYPEH-AD-----PVITLF-AGPV-N-A-YP-EVLR-----GLGR-----TVL-YD-----	35
A AT	-----QLNPPS-----RLLMG-PGPI-N-A-DP-RVLR-----AMSS-----QLI-GQ-----	38
UG AT	-----DITQFS-----KAPEF-----PAWP-Q-YDDAERN-----GLVRALEQ-GQ-WW-----	29
AHBA	-----MIEFID-----LK-N-QQARIKD-----KIDAGI-QRVLRHGQ-----	30
WbpE	-----MINYPLAS-----S-T-WDDLEYK-----AIQSVLDSKMF-----	28
CoLD	-----SPLVDTVADRLL-ALC-G-G-----EYVGLF-RTGTSAVRAAVLAVR-----ESVG-----RPLVLS-----G-YHG-YD-PM-----	130
LiVB	-----CALENVLAEMVN-DAV-P-SI-----EMRVFV-NSGTEACMAVLRIMR-----AYTG-----RDKLIKF-----EGC-YHG-HA-DM-----	150
GSAM	-----NEPALRGRKLI-DAT-F-A-----ERVLFM-NSGTEANETAFLKAR-----HYAC-----VRHSPFKTIIAF-----HNA-FHG-RS-LF-----	136
AO AT	-----NNVLGEYEYIT-KLF-N-Y-----HKVLPM-NTGVEAGETACKLAR-----KWYG-----TVKGIQYKAKIVFA-----AGN-FWG-RT-LS-----	148
O AT	-----YEPYLECEIMN-QKV-P-G-----DFAKTLLV-TTGSEAVENA VKIAR-----AATK-----RSGTIAF-----SGA-YHG-RT-HY-----	143
GABA	-----HPLFVWRABRIV-AAF-P-SI-----RKLRFT-GSGTETLLALRVAR-----AFTG-----RRMLLR-----E-G-----	140
PG AT	-----NAPAVTLBERLL-ASF-P-G-----EGTHKIWF-G-HSGSDANEAAIRAIV-----KATG-----RSGVIAF-----AGA-YHG-CTVGSMA-----	144
AC_racemase	-----SRPVDLAPRLA-NIT-PPGL-----DRALLL-STGAENEAAIRMAK-----LVTG-----KYETVGF-----AQS-WHG-MT-GA-----	142
DA_DC	-----SDVLEEYAGRLA-RFV-G-L-----PTRFWAV-SGGSEAPESAVKLAR-----QYHV-----ERGEDRDRFLTF-----V-P-----	127
bac_AT	-----HAPAIELCRKLV-AMT-PQPL-----ECVFLA-DGSVAVEVAMKVAL-----QYWD-----AKGEARDRFLTF-----RNG-YHG-DT-FGAMS-----	153
DAPA	-----HPAVVELSLLA-EVT-PAGF-----DRVFT-NSGSEVDTIMRVR-----RYWD-----VOGRPEKTLIGR-----WNG-YHG-ST-IG-----	155
omega_TA	-----SVAMARFVETFAVLG-DPAL-----PHLFFV-EGGALAVENALKAAF-----DWKSRHQAHGIDPALQTQVHL-----RGA-FHG-RS-GY-----	159
Lysin_AT	-----YOGHKACDALK-EFY-G-T-----EHALVF-STGYANLGMISTLA-----G-K-----GDYIILD-----ADS-HAS-IY-DG-----	144
SPT	-----QDSHKELEQKLA-AFL-G-X-----EDAILY-SSCFDANGLLETLL-----GA-----EDALISD-----ALN-HAS-IID-GV-----	146
KBL	-----TAYHRRLEAELIA-GLH-Q-K-----EALALVF-SSAYNANDATLTLR-----VLPF-----GLIISD-----SLN-HAS-MIE-GI-----	149
ALAS	-----SVVQALBEELA-EWL-C-Y-----SRALLF-ISCFAANQAVIAMM-----AK-----EDRIAAD-----RLS-HAS-LLE-AA-----	139
KAPA	-----PDLWPFSTAKFEAEVAVMTA-HML-G-G-----DAAAGTVCQTVT-SGGTESILLAMKTYR-----DWAR-----ATKGTAPAVVP-----VSA-HAA-FD-KA-----	151
SPL	-----FRMDEVKDLGR-YIFQTE-N-----RATMVCVSGSAHAGMEAMLSNLI-----E-----EGDRVLLIA-----VNGIWAEE-R-AVEM-----	110
3-HKT	-----QLLYKVVDKAQ-KAM-RL-S-----RKPVLGHSEPVLGLEAAAASLI-----S-P-----DDVVNLNLSGVY-----KGF-----GYW-----	101
A AT	-----THYMEVNMALYR-GVFRTE-N-----RWTMLVDGTSRAGIEALIVSAI-----R-P-----GDKVLPVFRGF-----HLL-----CEI-----	105
UG AT	-----D-PAM-----GDEVNSFEFEFA-AHH-G-A-----AHALAV-TNGTHALELALQVMG-----VGPETEIVP-----AFT-----FISSQA-----AQ-----	92
AHBA	-----I-L-----GPEVTELDRLA-DFV-G-A-----KCIISC-ANGTALQIVOMALG-----V-----GPGDREVITP-----GFT-----YVATAET-----VA-----	93
WbpE	-----T-M-----GEYVKQYEQFA-KTF-G-S-----KYAVMV-SSGSTANLIMTAAALFFTKPRUK-----KGDELIIV-----AVS-----WST-TYY-----PL-----	95

LiVB ---Y--- PPHEPLEP---NADGIVDF-F---Y---D---D---LDLLAGLIR--DR---D---RIAADVISP---H--- 174
 GSAM ---S--- ANLTT-P---LEAVKALFA--ENP---G---EIAGVILEFI--V-G 185
 AO_AT ---SDG---FGPKPADIHV-P---F---D---HTCAVVVEPI--Q-G 186
 O_AT ---S---SSTDPTSYDGFPMFGFDII-P---Y---D---LPAALERALQ--D---P---NVAAFMVEPI--Q-G 199
 GABA ---L---ALTKVNPYSAGMGLMGPVYRA-L---Y---PCPLHGISEDDA---E---DIAAIVIEPV--Q-G 209
 PG_AT ---T---TANTLLI-R---P---P---IEGMREVA--NHG---S---DIAAFIAEPV--G-S 177
 AC_racemase ---S---GULLL-P---P---PDPYRNDPTGDAL---G---SIGAAFIEPI--Q-S 195
 DA_DC ---A---GPAAVGSFAI-P---P---APFYRPRERNGAYDYLAEL---D---VAFDLIDR--QS---SG---NLAFAIEPI--L-S 212
 baC_AT ---K---SRELYTFLMRPEAWPKL-P---P---PDPARNGAED---E---EGLRALLE--REGP---E---TVAAAFMVEPI--VGA 183
 DAPA ---D---NSHMLKGYLPENLFA-P---A---Q---PQSRMDGEWDERMVGFAARMA--AHR---H---EIAAVIIIEPI--VOG 216
 omega_TA ---HEQ---GDLPIFGMAHI-E---Q---PWWYKHGKDMTDFEGVVA---D---KVAAFVGEFI--Q-G 226
 Lysin_AT ---S---LNTKPTITARFPKFDWPRI-D---A---P---PMPRGLDEPAMAALAEABA---H---LRQARAATF--TRP---H---DIACFVAEPI--Q-G 228
 SPT ---W---LGDAEIVFRH---N---S---VEDLDRKRLG--RU---PAEAGKLVVLEGV--Y 184
 KBL ---R---LCKAKRYRYAN---N---D---XQLEEARLK--EAREAGA--RHVLIATDGV--F 187
 ALAS ---R---NAGPKRFRH---N---D---VAHLRELLA--AD---DPA--APKLIATFESV--Y 188
 KAPA ---L---SPSQRFRFAH---N---D---VTHLARLLA--SP---C---PGQMVVTEGV--F 177
 SPL ---Q---YFGIKIVRT-P-LDADYRA---D---VAMREAI--T---P---NTVVVAGSAPGYPH-- 195
 3-HKT ---E---RYGADVRTI-E-GPDRPF---S---LETLARAI--LH---D---OPKCLFLHIG--D 152
 A_AT ---K---RYSHPILLEI-E-VPYNEAI---D---POAVADMLK--AH---P---EITVSVCHHDTPS-- 147
 UG_AT ---R---RCRAEVHTI-E-VPWGEVF---T---PDQVEDAVK--RI---RPRLLLTVOG--D 147
 AHBA ---R---LGAVTPV-DVDAATFNL---D---PEAVAAAV--T---P---RTKVIMPVHM--A 132
 WbpE ---L---LGAKPVYV-DIDPRYNL---D---POLLEAAI--T---P---RTRKAIIPVSL--Y 133
 Cold ---Q---YGLRVKVV-DIDINTLNI---D---IESLIKEAV--T---D---STRAILITVNL--L 136

*

LiVB ---MHLTPGWARARALLADAGVPLIVDEVKVLG-L-R-Y-G-PGLS---TA-DL---LD---ADVWVVA---K-GMA--NG-YPTAAVGG--SR-T-LL---K--- 245
 GSAM ---NSGFIVPDAGLEGLREITLEDHALLVDFEVMTCF-R-I-A-YGGV---QE-KFG---VT---PDLITLIG---K-IIG--GG-LPVGAYGG--KR-E-IM---Q--- 261
 AO_AT ---EGGVQAATPEFLKGLRDLCDHEQALIVDFEVOCGM-GRT-G-DLFA---YM-HYG---VT---PDLITSA---K-ALG--GG-FPVSAMLT--TQ-E-IA---S 263
 O_AT ---EAGVVVDPDGYLMGVRELCTRHQVLFDAEIQTL-ART-G-RWLA---VD-YEN---VR---PDIVLLG---K-ALS--GGLYFVSAVLC--DD-D-IM---L 277
 GABA ---EGGFYASSPAPMQRALRCDEHGIMLTADEVQSGA-GRT-G-TLFA---ME-QM---GVA---PDLITFA---K-SIA--GG-FPLAGVTG--RA-E-VM---D 286
 PG_AT ---HFGVTPVSDSFLREGAELARQYGALFVILDEVISGF-R-V-G-NHGM---QA-LL---DVQ---PDLITCLA---K-ASA--GG-LPGGILGG--RE-D-VM---G 253
 DA_DC ---SGGIIHELPGYMAALRKRKCEARGMLLILDEAQTG-V-GRT-G-TMFA---CQ-RDG---VT---PDLITLIS---K-TLG--AG-LPLAAIVT--SA-A-IE---E 289
 baC_AT ---SDAALAPAPGYERYERDICEAGIIFTADEVMSGM-GRC-G-SPLA---LS-RWS--GVT---PDIIVLG---K-GLA--AGYAPLAGLLA--AP-Q-VY---E 262
 DAPA ---AGGMRMYHPWLKRIRKICDREGILLIATDEIATG-F-G-R-TG-KLFA---CE-HA---EIA---PDILCLIG---K-ALT--GGTMTLSATLT--TR-E-VA---E 294
 omega_TA ---AGGVIVPATYWFETERICRYDVLVVADEVICGF-GRT-G-EWFG---HQ-HFG---FQ---PDLITFAA---K-GLS--SGILPIGAVFV--GK-R-VA---E 304
 Lysin_AT ---EGGDRHFRPEFFAAMBELCDFDALLIFDEVOTGC-GLT-G-TAWA---YO-QLD---VA---PDIVAFG---K-KT---QVCGVMA--GR-R-VDEVADN-- 305
 SPT ---SMDGDI--PLOEMVAVSKKHGAMLIIVDEAHG-M-G-F-FGEHGRGV---FE-EAG---VEADVDFVGT---FSX-SVG---TVGFCVCS--NH-P-KF---E 261
 KBL ---SXDGVIA--NLKGVCDLADKYDALVYDDESHAVG-F-VGEN---GRGS---HEYCDV---XG-RVDIITGT--LKG-ALG--G-ASGYTAA--RK-E-VV---E 265
 ALAS ---SMDGDFG--PIKEICDIAEFGALTYIDEVHAVG-M-Y-G-PRGAGV---AERDGL---MH-RIDIFNGT--LAK--AYG---VFGYIAA--SA-R-MV---D 265
 KAPA ---SMDGDSA--PLAEIQVTOQHNGWMLVDDAHGTG-V-I-G-EQGRGS---CW-LQK---VK--PELLIVT---F-GKGF--G--VGSAAVLC--SS-T-VA---D 252
 SPL ---GVV--DPIPEIAALAAEHGIGCHVDACLGFF-I-L-P-WAERLGPVPPFD-FR---LE-GVTSVAD--THA--YGY--GA-KGTSVILY--RRP-D-LL--H 275
 3-HKT ---SSSGULLQ--PLEGVQICHQHDCLLIVDAVASLC-G-V-P---F---YM-DK---WE--IDAVTIG---A-QVILG--AP-PCITPISI--SP-K-AL---D 222
 A_AT ---GTI--NPIDAGALVSAHGAYLIVDAVSSFG-G-M-K---T---HP--ED---CK--ADIVVTG---P-NKCLGAP-PGLTMMGV--SE-R-AW---A 215
 UG_AT ---TSTTMLQ--PLAELGEICRYDALTFTDASLIG-G-N-P---L---ET--DV---WG--LDVASAG---MQXCLG--GP-SGISPITL--SA-R-ME---EAIPT 205
 AHBA ---GLMADMALAKISADTGVPLIQDAAHAGH---A---RW--QGRVGEI--DSIATFS-FONGK--LMT---A-GEAGVIVFPDGET--E-KY---E 222
 WbpE ---GQCADFDALINAISKYGIPIVEDAQAQSF---A---SY--KGRKSNL--STVACTSFFPSKP--LGC---Y-GDGGAIPT--ND-DELA---T 205
 Cold ---GNPNNFDEINKIIGGRDIILEDNCESMG-A---TFNNKCA---GT---F--GLMGTF-SFNX--HIA---T-MEGGCIVT--DDEE-IY---H 207

LivB	PL	R	E	V	S	FWS	FFPEPTVLAABERTLA-RV 271
GSAM	LV	APAGPMY	Q	A	GTL	SGNPLAMTAGIKTLE-LL 292	
AO_AT	AF					GSTYCGNPLACAVAGAAFD-II 286	
O_AT	TI	K	PGE	H	G	STY	GGNPLGCRVAIAALE-VL 305
GABA	AV	A	PGG	L	G	GTY	AGNPIACVAALEVLK-VF 314
PG_AT	VL	S	R		GSF	TGNPITAAATAAID-TI 277	
AC_racemase	C	ASA	F	A	M	QTL	HGNPISAAAAGLAVLE-TI 299
DA_DC	RA	HELGY	L	F	Y	TTT	VSDPLEFAAAGLEVID-VV 319
bac_AT	T	VMGGF	M	H	G	FTY	AGHPVSVAAAGLSVLD-IV 291
DAPA	TTSDGEACGF	M	H		G	PTF	MGNPLACAAANASIA-IL 327
omega_TA	GLIAGGDF	N	H		G	FTY	SGHPVCAAVAHANVA-AL 335
Lysin_AT	VF	A	VPSR	L	N	STW	GGNLTDMVRARRILE-VI 334
SPT	VL	R	L	VCRPY	V	FMA	SLPPSVVATAATSIR-KL 291
KBL	WL	R	Q	RSRPY	L	FSN	SLAPAIVAASIKVLE-XV 295
ALAS	AV	R	S	YAPGF	I	FST	SLPPATAAGAQAASIA-FL 295
KAPA	FARHL	L	Q	FARHL	I	YST	SMPPAQOALRASLA-VI 282
SPL	YQ	Y	FIADWPGLYFSP	F	AGS		R-PGALSATAWAAMLUG 314
3-HKT	VIRNRRTKSKFVWDL	L	L	LGNYWGCYDEPKRYHHT			V-ASNLI FALREALA-QI 273
A_AT	KKANPLAPRMSI	V	D	WENAWSRDKPF	FFT		P-SVSEINGLDVAID-LY 263
UG_AT	RKCVREGIRDHRDGEDEMYSNYFDL	G	M	V	MDYWGPERLNHHT		E-ATTALFGARECAR-LI 282
AHBA	TA	FL	R	H	S	C	GRPRDRRYFHKTAGSNMRLNEFSASVLRQAOLA-RL 248
WbpE	AI	RQ	I	A	R		HQDRRYHHIRYGVNSRLDTL-QAAILLPKLE-IF 245
Cold	IL	LC	I	R	A	HGWTNRNLPKKNKVTGKSDDQFEESFKVFLPGYVNRPLEMSGAIGIEQLK-KL 266	
LivB	AT	GA	PORTVR	EAGERFLTHARKSLAGALP-V-E-LA	G	D	R-ELEK-ALMWATE-D- 330
GSAM	RQ	PG	TYEYLD	QITKRLSDGLLAIAQETHA-A-C-GG	Q	V	L-QEKS-RFRGML-E- 364
AO_AT	NT	PE	VLQGIH	TKROQFVQHLQAIIDEQDFI-F-S-D-IR	G	M	K-GRAR-DFLYAGA-E- 347
O_AT	EE	EN	LAENAD	KLGIILRNELMKLPS--DVV-T-A-VR	G	K	TKWDAM-KVCLIRL-R-D- 364
GABA	EQ	EN	LLQKAN	DLGQKLDGLLAIATAEK-HPE-IGD-VR	G	L	A-KLTA-EIVARAR-D- 381
PG_AT	LE	DD	VCAKIN	DLGQFAREAMNHLFARKGLN-W-L-AY	G	R	V-KMTA-AMRMALI-L- 355
AC_racemase	DR	DD	LPAMAE	RKGRLLRDGLSELAKR-HPL-IGD-IR	G	R	R-AETA-KLIYRAY-Q- 366
DA_DC	QR	DG	LVARAN	VMGDRLRRLRGLDLMERDCI-G-D-VR	G	R	D-GLGA-KITRECM-N- 386
bac_AT	ER	ED	LTGAAK	ERGAQLLAGLQALQAR-FPQ-MMQ-VR	G	T	LIAS-RIGAAAL-K- 349
DAPA	ES	GD	WQQOVA	DIEVQREQLAPA-RDAEMV-A-D-VR	V	L	H-PVNMAALQKFFV-E- 385
omega_TA	RD	EG	IVQVRKDDIGP	TMQKRWETFSR-FEH-V-DDVR	G	V	KNKAKRELFDPFG-EIGT-LCRDIFF-R- 406
Lysin_AT	EA	EG	LFERAV	OHGKYLRLARLDELAADFPVAVL-D-PR	G	R	T-ADRD-ELIRQLW-Q- 394
SPT	MH	AGDKRAHLW	KNSRRHLHQLRDMG	Y-K-LG	TETAQ		M-AQAV-ALMQGLL-E- 348
KBL	EA	GSELRDLRW	ANARQPREQXSAAG	F-T-LA	G-AD	HAIPVX-LG	A-VVAQ-KFARELQ-K- 350
ALAS	KTAEQK	LRDAQ	MHAKVILKMLKALGM	P-II	D-HG	SHIVPVV-IG	P-VHTK-AVSDMLL-SD 353
KAPA	RSDEGDA	RREKLA	ALITREFRAGYQDLP	F-T-LA	DS-C	SALQPLI-VG	N-SRAL-QLAELKLR-Q- 339
SPL	EE	GYLD	ATPRIL	QAADRILKAGVRAIP	S-L-K-IL	GMVIAVA-SD	LNLY-OVMEMA-G- 370
3-HKT	AEEGLEN	QIKRRI	ECAQILYELGKMG	L-D-IFVKDPRR	L-L	PTVTGIM-IP	G-VDWW-KVSYAMNN- 336
A_AT	LINEGPEA	VWARHA	LTKAMRAGVTAMG	L-S-VMAASDSTA	S	PTTAVR-TP	G-VDEK-ALRQAARAR- 326
UG_AT	LQEGLDY	GIARHK	LHGDDALVKGIQAMG	L-E-TF-GDLKHK	M	NNVLGVV-IP	G-INGD-QARKLMLED- 344
AHBA	DE	QIARV	ERWTLISRLGAID	G-V-V-PQ	G	GDVADRNSHYMAMFRIPG	T-EERN-ALVDRIV-E- 310
WbpE	EE	EIALRQ	KVAAEYDLSLKQVG	IG-TP	F	IEVNISVYAQYTVR-MD	NRE-SVQASLK-A- 300
Cold	PR	FISVRR	KNAEYFLDKFKDH	PY-L-D-VQ	Q	ETGES	SWFGSFI-IK- 325
							G-VIRK-QLVENLN-S- 325

LivB	EGLLYR	-----D-----	-----NQAVS--AAF-GPDVLDAAEARTRVCDRLA-	367
GSAM	QGIVLAP	-----S-----	-----AGFTS--LAH-TEEDIDATLAARTVMSAL--	402
AO_AT	AGVMVLN	-----A-----	-----ADVMPAPS--LVV-EAD IHEGMQRFQAGVKV-V-	388
O_AT	NGLLAKP	-----T-----	-----RFAPP--LVI-KEDELRRESIEIINKTILSF--	404
GABA	KGLLILS	-----C-----	-----RILVP--LTI-EDAQIRQGLEIISQCFDEA-K-	424
PG_AT	EGVDIGG	-----R-----	-----SVFLS--AQH-EREHVEHLVTTFDRLDRLA-	392
AC_racemase	LGLVVYV	-----V-----	-----EFTPP--LTI-TETD IHKALDLDRAFSEL-SA	410
DA_DC	LGLSMNI	-----V-----	-----RIAPP--LTV-SEDEIDGLSLLGQAIERA-L-	431
bac_AT	RGLITY	-----DH-----	-----LLGPP--LSI-TAAEVDGLLALAGALEDV-L-	386
DAPA	QGVWIRP	-----F-----	-----GKLIYMPP--YII-LPQQLRQLTAAVNRV--Q-D-	423
omega_TA	NNLIMRA	-----C-----	-----VSAPP--LVM-TRAEVDEMLVAERCEEFEQ-	447
Lysin_AT	RAVIVLP	-----A-----	-----RFRPP--LTV-STAE IDAAIAAVRSALPVV-T-	435
SPT	AGLYVNT	-----A-----	-----RPPATPAGMELL-----RCSLC-AEH-SDEQVQILGMFESAGRAT-G-	396
KBL	EGIYVTG	-----F-----	-----FYVVPKQARI-----RTQXS-AAH-TPEQITRAVEAFTRIGQL-G-	398
ALAS	YGYVQP	-----I-----	-----NFPVPRGTERL-----RFTPS--PVH-DLKQIDGLVHAMDLLWAR----	399
KAPA	QGCWVTA	-----I-----	-----RPPTVPAGTARLRLT--AAH-EMQDIDRLLEVLHNG-----	383
SPL	RGWRLNG	-----L-----	-----HRPPAF-----HVALT--LRHTEPGVDRFLADQDAVAQV-R-	413
3-HKT	FSLEVQG	-----G-----	-----LGPTFGKAWRVMGECST-VQ-KIQFYLYGFKESLKAT-H-	382
A_AT	YGVVFPSS	-----G-----	-----RGETLGLKTRIGHM--GPTAQPIYATAALTAGGAMNAA-G-	372
UG_AT	FGIEIGT	-----S-----	-----FGPLHGKVV-----RIGTM-GYNA-RKDCVMTTLSALEAVNLV--	389
AHBA	AGLPAPA	-----A-----	-----AFRAIYRTDAFWELGAPDESVDIAIRCPNTDAISDCV-----	384
Wbpe	AGVPTAV	-----Q-----	-----M-----SLPMH--PYL-DTASIKIICAALTN----	359
Cold	AGIECRPIVTGNFLKNTDLKFDYTVHNNVDNAEYLDKNG	-----L-----	-----FVGNH--QIE-----LFDEIDYLRVLEVK-----	388
LivB	-----PY-----	-----A-----S-----	-----DAPVSEARYLAAMNVIDGLRDAARDRTTREWISRL--	409
GSAM	-----AO_AT-----	-----	-----	402
AO_AT	-----A-----	-----	-----	389
O_AT	-----O_AT-----	-----	-----	404
GABA	-----Q-----	-----	-----	425
PG_AT	-----DENTL-----	-----L-----S-----	-----WQG-----	401
AC_racemase	VSNEEIAQFAGW	-----	-----	422
DA_DC	-----X-----	-----	-----	432
bac_AT	-----ET-----	-----FFCO-----	-----	386
DAPA	-----TL-----	-----KARGL-----	-----	429
omega_TA	-----K-----	-----	-----	454
Lysin_AT	-----VIP-----	-----	-----	436
SPT	-----VIA-----	-----	-----	399
KBL	-----ALAS-----	-----	-----	401
ALAS	-----KAPA-----	-----	-----	399
KAPA	-----AH-----	-----P-----E-----	-----KATGMAPVYGMAAAAPPELVQVLTGTFIDLLYEVH	383
SPL	-----PD-----	-----Y-----I-----	-----FX-----	452
3-HKT	-----RKLAIKGIEAALAVIDADADA-----	-----	-----	388
A_AT	-----KF-----	-----P-----TTQGAAMQAAMDHYRSEB-----	-----	392
UG_AT	-----AHBA-----	-----	-----	410
AHBA	-----Wbpe-----	-----	-----	384
Wbpe	-----Cold-----	-----	-----	359
Cold	-----	-----	-----	388

Abb. B-3: Strukturelles Sequenzalignment von LivB mit den Ergebnissen der DALI-Suche

Dargestellt sind die Enzyme: LivB, Glutamate-1-semialdehyde 2,1 aminomutase (GSAM, 2hoy.pdb), Acetylnithine Aminotransferase (AO_AT, 2pb0.pdb), Ornithine Aminotranferase (O_AT, 1oat.pdb), 4-Aminobutyrate Aminotransferase (GABA, 1sf2.pdb), D-Phenylglycine Aminotransferase (PG_AT, 2cy8.pdb), α -Amino- ϵ -Caprolactam Racemase (AC_racemase, 3dxv.pdb), 2,2 Dialkylglycine Decarboxylase (DA_DC, 1ds7.pdb), bakterielle Aminotransferase Klasse III aus *Deinococcus sp.* (bac_AT, 3i4j.pdb), 7,8-Diamino-pelargonsäure Aminotransferase (DAPA, 1dty.pdb), ω -Transaminase (omega_TA, 4a6t.pdb), Lysine- ϵ Aminotransferase (lysine_AT, 2cjd.pdb), Serin Palmitoyltransferase (SPT, 2x8u.pdb), 2-Amino-3-Ketobutyrat Coenzym A Ligase (KBL, 1fc4.pdb), 5-Aminolevulinat Synthase (ALAS, bwo.pdb), 8-Amino-7-Oxonanoat Synthase (KAPA, 1bs0.pdb), Sphingosin-1-phosphat Lyase (SPL, 3mau.pdb), 3-Hydroxykynurein Transaminase (3-HKT, 2ch1.pdb), Aspartat Aminotransferase (A_AT, 2z9w.pdb), Ureidoglycin Glyoxylat Aminotransferase (UG_AT, 3nnk.pdb), 3-Amino-5-Hydroxybenzoesäure Synthase (AHBA, 1b9h.pdb), Aminotransferase WbpE (WbpE, 3nu7.pdb) und GDP-4-keto-6-deoxymannose-3-dehydratase (CoID, 3gr9) (siehe auch Tab. 3-8). Das Alignment wurde mit der DALI Server [Holm *et al.*, 2010] durchgeführt. Striche (–) bedeuten Lücken, die zu einem besseren Sequenzalignment führen. Ein * (Stern) bedeutet eine vollständig konservierte Aminosäure, ein : (Doppelpunkt) zeigt die starke Konservierung von Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften an und ein . (Punkt) stellt die schwache Konservierung von ähnlichen Aminosäuren dar.

Abb. B-4: Strukturelles Sequenzalignment von LivB mit den 11 strukturell verwandtesten Enzymen des Aminotransferase Faltungstyps III

```

LivB      -----STLA--EKPTCPKDA--DGNPR-IFTA--ARGARL 28
GSAM      -----FKTIKSDEIFAAAQKLMPPGGVSSPVRAFKSVGGQPI-VFDR--VKDAYA 46
AO_AT     -----TFDEVIL--PVY--APAD-----F-IPVK--GKGSRV 25
O_AT      -----GPPTSDDIFEREYKYGA--HNY-HPLP-----V-ALER--GKGIYL 35
GABA      -----NSNKELMQRRSQAIP--RGGVQIH-----PI-FADR--AENCRV 34
PG_AT     SILNDYKRKTEGSVFWAQRARSVM--PD---GAFD--PH-GL-FISD--AQQVHK 44
AC_racemase -----KALYDRDGAAIG-NLQKLRFFP-----L-AISG--GRGARL 32
DA_DC     -----LNDDATFWRNARQHLV--RYGG-----TFEPMIIEER--AKGSFV 35
bac_AT    -----NVF--YR-----SSKPYP-VAVR--GEGVFL 21
DAPA      -----MTTDDLAFDERHI--WHPY--TSMTSPLPVY-FVVS--AEGCEL 37
omega_AT  -----RTTSQWRELDAAHH--LHPFTDTASLNQAGAR-VMTR--GEGVYL 40
Lysin_AT -----TTPDRVHEVLGRSML-----VDGLDIVLDDLTRSGGSYL 33

```

```

* . * *
LivB      TDR-AGKEWIDFDNARGSVVLGHADPEIAE-----AVARAASGAAGTA---T-- 71
GSAM      WDV-DGNRYIDYVGTWGPACGHAHPEVIE-----ALKVAMEKG-TSF---G-- 88
AO_AT     WDQ-QGKEYIDFAGGIAVTALGHCHPALVE-----ALKSQGE-TLWHT---S-- 67
O_AT      WDV-EGRKYFDLSSYSAVNQGHCHPKIVN-----ALKSQVDK--LTL---T-- 76
GABA      WDV-EGREYLDFAAGIAVLNTGHLHPKVVA-----AVEAQLKK--LSH---TCF 77
PG_AT     TDV-DGNVYLDFFGGHGALVLGHHPRVNA-----AIAEALSHG-VQY---A-- 86
AC_racemase IEE-NGRELIDLSGAWGAASLGYGHPAIVA-----AVSAAAA-NPAGATILS-- 77
DA_DC     YDA-DGRAILDFTSGQMSAVLGHCHPEIVS-----VIGEYAG-KLDHL---F-- 77
bac_AT    YDD-AGRRLDGSAGALVANIGHGRAEVE-----RMAAQAAR-LPFV---H-G 64
DAPA      ILS-DGRRLVDGMSSWWAAIHGYNHPQLNA-----AMKSQIDAMS-HV---M-- 79
omega_AT  WDS-EGNKIIDGMAGLWCNVVGYGRKDFAE-----AARRQME-ELPFY---N-- 82
Lysin_AT VDAITGRRYLDMFTFVASSALGMNPPALVDDREFHAEIMQAAL---NKP---S-N 81

```

```

* ;
LivB      --G---WSPLVDTVADRLL-ALCG--G---EVVGLFRITGTSAVRAAVLAVRESV 114
GSAM      --A---PCALENVLAEMVN-DAVP-SI---EMVRFVNSGTEACMAVLRIMRAYT 132
AO_AT     NVF----TNEPALRLGRKLI-DATF--A---ERVLFMNSGTEANETAFLKLARHYA 112
O_AT      --S-RAFYNVNLGEYEEYIT-KLFN--Y---HKVLPMTNGVEAGETACKLARKWG 122
GABA      QVL----AYEPYLELCEIMN-QKVP--GDFAKKTLIVTTGSEAVENAVKIARAAT 125
PG_AT     --A---SHPLEVRWAERIV-AAFP-SI---RKLRFVTSVGGTETLLALRVARAFT 130
AC_racemase --A---SNAPAVTLAERLL-ASFP--GEGTHKIWFHGSGSDANEAAIRAIVKAT 123
DA_DC     SGM----LSRPVVDLATRLA-NITPPGL---DRALLLSTGAESNEAAIRMAKLV 124
bac_AT    SQF----SSDVLEEYAGRLA-RFVG--L-PTFRFWAVSGGSEATESAVKLARQYH 111
DAPA      --F-GEITHAPAIELCRKLV-AMTPQPL---ECVFLADSGSVAVEVAMKALQYW 127
omega_AT  --TFFKTTHPAVELSSLLA-EVTPAGF---DRVFYTNSGSESVDTMIRMVRRYW 131
Lysin_AT SDV----YSVAMARFVETFARVLGDPAL---PHLFFVEGGALAVENALKAADFWDK 129

```

```

:
LivB      G-----RPLVLSS--GYHGYD--PM---W-----Y-----P 133
GSAM      G-----RDKIIKFEQCYHGHHA--DM-----S 150
AO_AT     C-----VRHSPFKTKIIAFHNAFHGRS---LF---TVSVGGQPKY-----S 147
O_AT      Y----TVKGIQKYKAKIVFAAGNEFWGRT---LS---A-----I-----S 151
GABA      K-----RSGTIAFSGAYHGRT---HY---T-----L-----A 146
PG_AT     G-----RRMILRF--EG-----S 140
AC_racemase G-----RSGVIAFAGAYHGCTVGSMA---F-----S 146
DA_DC     G-----KYEIVGFAQSWHGMT---GA---A-----ASATYSAGR 152
bac_AT    V-----ERGEPRFKVITR--VF-----S 127
DAPA      D-----AKGEARDRELFTRNGYHGDT---FGAMSV-----D-----P 157
omega_AT  D-----VQKPEKKTILGRWNGYHGST---IG---GASLGGMKYM-----H 166
Lysin_AT SRHNQAHGIDPALGTQVLHLRGAHFGRS---GY---T-----L-----S 162

```

Anhang

LivB PHEPLEP-----NADGIVDFFY-----D----- 151
 GSAM -----ANTLTFPY-----ND----- 160
 AO_AT DG-----FGPKPADIIHVPF-----ND----- 164
 O_AT -SSTDPTSVDGFGPFMPGFDIIPY-----ND----- 176
 GABA LTGKVNPFYSAGMGLMPGHVYRALY-----PCPLHGISEDDA----- 182
 PG_AT -----TTANTLLIRP-----DD----- 152
 AC_racemase -----GLILLPY----PDPYRPYRNDPTGDAI----- 169
 DA_DC KGV-----GPAAVGSFAIPAPFTYRPRFRERNGAYDYLAEL----- 187
 bac_AT -----SRELYTPLMRPEAWPKLPK-----PDPARNGAED----- 156
 DAPA D-----NSMHSLWKGYLPENLFAPA-----PQSRMDGEWDER 189
 omega_AT EQ-----GDLPIPGMAHIEQ--PWWYKHGKDMTPDEFGVVA----- 200
 Lysin_AT --LTNTKPTITARFPKFDWPRIDA--PYMRPGLDEPAMAALEAEA----- 203

. . * :
 LivB -LDLLAGLLR---DR-DRIAADVISPDPH-----MHLTPGWYARARALLADAGVP 195
 GSAM -LEAVKALFA--ENP-GEIAGVILEPIV-GNSGFIVPDAGFLEGLREITLHEDAL 210
 AO_AT -LHAVKAVM-----D-DHTCAVVVEPIQ--GEGGVQAATPEFLKGLRDLCDHQAL 211
 O_AT -LPALERALQ---D--PNVAAFMVEPIQ--GEAGVVVDPDGYLMGVRLECTRHOVL 224
 GABA -IASIHRIFKNDAAAP-EDIAAIVIEPIVQ--GEGGFYASSPATMQRLRALCDEHGIM 234
 PG_AT -IEGMREVF--NHG-SDIAAFIAEPVG--SHFGVTFVSDSFLREGAELARQYGA 202
 AC_racemase -LTLLEKLA-AVPA-GSIGAAFTIEPIQ--SDGGLIVPPDGFRLKFADICRAHGIL 220
 DA_DC -DYAFDLIDR---QSSGNLAAFFIAEPIL--SSGGIIELPDGYMAALKRKCARGML 237
 bac_AT -AEGLRALLE-REGP-ETVAAFMAEPVVGASDAALAPAGYYERVRDICDEAGII 208
 DAPA DMVGFARLMA--AHR-HEIAAVIIEPIVQAGGMRMYHPEWLKRIRKICDREGIL 241
 omega_AT -ARWLEEKIL-EIGA-DKVAAFVGEPIQ--GAGGVIVPPATYWPEIERICKRYDVL 251
 Lysin_AT -LRQARAAFE--TRP-HDIACFVAEPIQ--GEGGDRHFRPEFFAAMRELCEFDAL 253

. : ** * . . * : * :
 LivB LIVDEVKVGRL-R-Y-GPGLSTA-DL--LDADVWVVAKGMANG-YPTAAVGGSSRTL 243
 GSAM LVFDEVMTGF-R-I-AYGGVQEKFG--VTPDLTTLGKIIGGG-LPVGAYGGKREI 259
 AO_AT LVFDEVQCGM-GRT-GDLFAYMHYG--VTPDILTSAKALGGG-FPVSAMLTQEI 261
 O_AT FIADEIQTGL-ART-GRWLAVDYEN--VREDIVLLGKALSGLYPVSAVLCDDDI 275
 GABA LIADEVQSGA-GRT-GTLFAME-QM-GVAPDLTTFAKSIAGG-FPLAGVITGAEV 284
 PG_AT FILDEVISGF-R-V-GNHGMOA-LL-DVQPDLTCLAKASAGG-LPGGILGGREDV 251
 AC_racemase VVCDEVKVGRLAR-S-GRLHCFE-HE-GFVPDILVLGKGLGGG-LPLSAVIAPAEI 270
 DA_DC LIIDEAQTVG-GRT-GTMFACQRDG--VTPDILTLTKTLGAG-LPLAAIVTSAAI 287
 bac_AT FIADEVMSGM-GRC-GSPLALS-RWSGVTPDIAVLGKGLAAGYAPLAGLLAAPQV 260
 DAPA LIADEIATGF-G-RTGKLFACE-HA-EIAPDILCLGKALTGGTMTLSATLTTREV 292
 omega_AT LVADEVICGF-GRT-GEWFGHQHFG--FQPDLFATAAGLSSGYLPIGAVFVGKRV 302
 Lysin_AT LIFDEVQVTC-GLT-GTAWAYQQLD--VAPDIVAFGKKT-----QVCVMAGRRV 299

:
 LivB L----KPL-----R-----EVSETSFFEPTVLAQAERTLARVATGAPQRTVR- 281
 GSAM M----QLV-----APAGPMYQAGTLSGNPLAMTAGIKTLELLRQPGTYEYLD- 302
 AO_AT A----SAF-----GSTYGGNPLACAVAGAAFDIINTPEVLQGIH- 296
 O_AT M----LTI-----K---PGEHGSTYGGNPLGCRVAIAALEVLEENLAENAD- 315
 GABA M----DAV-----A---PGGLGGTYAGNPACVAALEVLKVFEQENLLQKAN- 324
 PG_AT M----GVL-----S-----R---GSEFTGNPITAAAAIAAIDTILEDVCAKIN- 287
 AC_racemase L----DC-----ASA-----FAMQTLHGNPISAAAAGLAVLETIDRDDLPAMAE- 309
 DA_DC E----ERA---HELGY-----LFYTHVSDPLPAAVGLRVLDDVVQRDGLVARAN- 329
 bac_AT Y----ET---VMGGF-----MHGFTYAGHPVSVAAGLSVLDIVEREDLTGAAK- 301
 DAPA A----ETISDGEAGCF-----MHGFTFMGNPLACAAANASLAILESQDWQQQVA- 337
 omega_AT A----EGL--IAGGDF-----NHGFTYSGHPVCAAVAHANVAALRDEGIVQRVKD 346
 Lysin_AT DEVADNVF-----A--VPSRLNSTWGGNLTDMVRARRRILEVIEAEGLFERAV- 344

LivB	EAGERFLTHARKSLAGAGLP-V-E-LAGDGSFFQFVAA-----	316
GSAM	QITKRSLDGLLAIQAETGHA-A-C-GGQVSGMFGFFFT-----EGPVHNYEDAK	348
AO_AT	TKRQQFVQHLOAIDEQFDIF-S-D-IRGMGLLIGAEIK-----	331
O_AT	KLGIILRNELMKLPS--DVV-T-A-VRGKGLLNAIVIK-----	348
GABA	DLGQKLDGLLAIKAEK-HPE-IGD-VRGLGAMIAIELF-----EDGDHN	365
PG_AT	DLGQFAREAMNHLFARKGLN-W-L-AYGRFSGFHLMPGLPPNTTDTGSITRAEVA	339
AC_racemase	RKGRLLRDGLSELAKR-HPL-IGD-IRGRGLACGMELV-----CDRQSR	350
DA_DC	VMGDRLLRGLLDLMEFDCI-G-D-VRGRGLLLGVEIV-----KDRRTK	370
bac_AT	ERGAQLLAGLQALQAR-FPQ-MMQ-VRGTGLLLGVVLG-----	336
DAPA	DIEVQLREQLAPA-RDAEMV-A-D-VRVLGAIGVVETT-----	371
omega_AT	DIGPYMQKRWRETFSSR-FEH-V-DDVRGVGMVQAFITLV-----	381
Lysin_AT	QHGYLRLARLDELAADFFAVVL-D-PRGRGLMCAFSLP-----	380

:

LivB	--T-----R--ELEK-ALWATEDEGLLFYRG-----D---NQAV	343
GSAM	KSD-----L--QKFS-RFHRGMLEQGIYLAPS-----QFE---AGFT	379
AO_AT	PKY-----K--GRAR-DPLYAGAEAGVMVLNA-----GADVMRFAP	364
O_AT	--E-----TKDWDAW-KVCLRLRDNGLLAKPT---HGDII---RFAP	381
GABA	KPD-----A--KLTA-EIVARARDKGLILLSC--GPYYNVL---RIIV	400
PG_AT	RPD-----V--KMIA-AMRMALILEGVDIGGR-----G---SVFL	368
AC_racemase	EPA-----R--AETA-KLIYRAYQLGLVYYV--GMNGNVL---EFTP	385
DA_DC	EPA-----D--GLGA-KITRECMNLGLSMNIVQLPGMGVVF---RIAP	407
bac_AT	--D-----LIAS-RIGAAALKRGLITYDH-----L---LLGP	362
DAPA	--H-----FVNMAALQKFFVEQGVWIRPF-----GKLIYLMP	401
omega_AT	--KNKAKRELFPDFG--EIGT-ICRDIFFRNLMIRAC-----GDHI---VSAP	422
Lysin_AT	--T-----T--ADRD-ELIRQLWQRAVIVLPA---GADTV---RFRP	411

:

LivB	SAAFGPDVLDAAEARFTRVCDRL-A-----PY---A---SDAPVS	376
GSAM	SLANTEEDIDATLAAARTVMSAL-----	402
AO_AT	SLVVEEADIHEGMQRFAQAVGKV-V-----A-----	389
O_AT	PLVIKEDDELRESIETINKTILSF-----	404
GABA	PLTIEDAQIRQGLEIISQCFDEA-K-----Q-----	425
PG_AT	SAQHEREHVEHLVTTFDRVLDRL-A-----DENL---L---SWQG--	401
AC_racemase	PLTITETDIHKALDLLDRAFSEL-SAVSNEEIAQFAGW-----	422
DA_DC	PLTVSEDEIDLGLSLLGQAIERA-L-----X-----	432
bac_AT	PLSITAAEVDGLLALLAGALEDV-L-----	386
DAPA	PYIILPQQLQRLTAAVNRAV--Q-D-----ETFFCQ-----	429
omega_AT	PLVMTRAEVDEMLAVAERCLEEFEQ-----TL---KARGL-----	454
Lysin_AT	PLTVSTAEIDAAIAAVRSALPVV-T-----K-----	436

LivB	EEARYLAANNVIDGLRDAARDDRTTREWISRL	409
GSAM	-----	402
AO_AT	-----	389
O_AT	-----	404
GABA	-----	425
PG_AT	-----	401
AC_racemase	-----	422
DA_DC	-----	432
bac_AT	-----	386
DAPA	-----	429
omega_AT	-----	454
Lysin_AT	-----	436

Abb. B-4: Strukturelles Sequenzalignment von LivB mit den 11 strukturell verwandtesten Enzymen des Aminotransferase Faltungstyps III

Dargestellt sind die Enzyme: LivB, Glutamate-1-semialdehyde 2,1 aminomutase (GSAM, 2hoy.pdb), Acetylnithine Aminotransferase (AO_AT, 2pb0.pdb), Ornithine Aminotranferase (O_AT, 1oat.pdb), 4-Aminobutyrate Aminotransferase (GABA, 1sf2.pdb), D-Phenylglycine Aminotransferase (PG_AT, 2cy8.pdb), α -Amino- ϵ -Caprolactam Racemase (AC_racemase, 3dxv.pdb), 2,2 Dialkylglycine Decarboxylase (DA_DC, 1ds7.pdb), bakterielle Aminotransferase Klasse III aus *Deinococcus sp.* (bac_AT, 3i4j.pdb), 7,8-Diamino-pelargonsäure Aminotransferase (DAPA, 1dy.pdb), ω -Transaminase (omega_TA, 4a6t.pdb) und Lysine- ϵ Aminotransferase (lysine_AT, 2cjd.pdb) (siehe auch Tab. 3-8). Das Lysin, welches die kovalente Bindung zum PLP eingeht und in allen 11 Enzymen konserviert ist, ist grün dargestellt. In blau sind die Positionen der Aminosäuren markiert, welche bei LivB zur Bindung des PLPs beitragen. Das Alignment wurde mit dem DALI Server [Holm *et al.*, 2010] durchgeführt. Striche (–) bedeuten Lücken, die zu einem besseren Sequenzalignment führen. Ein * (Stern) bedeutet eine vollständig konservierte Aminosäure, ein : (Doppelpunkt) zeigt die starke Konservierung von Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften an und ein . (Punkt) stellt die schwache Konservierung von ähnlichen Aminosäuren dar.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. Milton T. Stubbs für die Möglichkeit, an den interessanten Themen zu arbeiten, für das entgegengebrachte Vertrauen und für die stete Diskussionsbereitschaft.
- Herrn PD Dr. Udo Wehmeier und Frau Dr. Diana Clausnitzer für das Zurverfügungstellen des LivB Proteins, die Überlassung der Plasmide sowie die Hilfe bei der Etablierung der Expression in *Streptomyces* Zellen.
- Herrn Prof. Dr. Frank Bordusa und besonders Frau Dr. Sandra Liebscher für die Ausführung der Ligationsexperimente mit den 4CL1 Varianten.
- Herrn Dr. Christoph Parthier für die Hilfe bei und Einführung in die Prozesse der Datensammlung, Prozessierung und Strukturaufklärung.
- Herrn Dr. Tobias Beck für die Hilfe bei der Lösung des Phasenproblems des LivB-I3C Datensatzes.
- Frau Dr. Constanze Breithaupt-Tham für ihre Anregungen bei der Erstellung der Arbeit sowie die stete Diskussionsbereitschaft.
- allen an dem Projekt „4CL1“ mitwirkenden Personen: Nicole Höfer, Kristin Riedel, Sabrina Pfennig, Gerda Hübner sowie Pia Rosenberg für die Mitarbeit im Labor.
- allen Mitarbeitern sowie ehemaligen Mitarbeitern der AG Stubbs - insbesondere Anita Hoffmann, Anja Menzel und Sabrina Pfennig - für das angenehme Arbeitsklima, die hilfreichen Diskussionen und den Spass im Laboralltag.

Ganz besonders möchte ich mich zudem auch bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre liebevolle Unterstützung und ihre Geduld bedanken.

Lebenslauf

Zur Person

Name: Ulrike Bräuer
Geburtsdatum: 18. September 1981
Geburtsort: Jena
Email: ulrike.braeuer@gmail.com

Ausbildung

seit Okt. 2005: Doktorand / wissenschaftlicher Mitarbeiter, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I, Abteilung Physikalische Biotechnologie
Sept. 2005: Diplomarbeit: „Herstellung von Varianten der 4- Cumarat: Coenzym A Ligase 1 zur Protease-vermittelten Proteinligation“, Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I, Abteilung Physikalische Biotechnologie
Okt. 2000 - Sept. 2005: Diplomstudiengang Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Sept. 1990 - Juli 2000: Abitur, 11. Gymnasium Leipzig

Vorträge und Poster

Sept. 2010 Vortrag "Structural studies of the aminotransferase LivB", 13th Heart of European Bio-Crystallographers Meeting, 2. Preis für Vortrag
März 2009 Poster "Structure based studies of adenylate forming enzymes", 17. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kristallographie

Veröffentlichungen

Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the aminotransferase LivB from *Streptomyces lividans*
Bräuer U, Clausnitzer D, Parthier C, Wehmeier UF, Stubbs MT
Acta Crystallographica Section F (in Vorbereitung)

The O-Carbamoyltransferase TobZ Catalyzes an Ancient Enzymatic Reaction.
Parthier C, Görlich S, Jaenecke F, Breithaupt C, Bräuer U, Fandrich U, Clausnitzer D, Wehmeier UF, Böttcher C, Scheel D, Stubbs MT
Angew Chem Int Ed Engl. 2012 Apr 23; 51(17):4046-52

Leipzig, 20.11.2012

Ulrike Bräuer

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich bisher mit dieser Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, noch an einer anderen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades beworben habe. Ich versichere weiterhin, dass die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Die wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet und angegeben.

Leipzig, 20. November 2012

Ulrike Bräuer

