

**Strukturelle und thermodynamische Charakterisierung der
DltA-DltC-Interaktion und kinetische Analyse der DltA
katalysierten D-Alanylierung des DltC**

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,



vorgelegt von

Diplom-Biochemikerin

Sabrina Pfennig

geboren am 03.02.1985 in Wolfen

Gutachter 1. Prof. Dr. Milton T. Stubbs
 2. PD Dr. Ralph P. Golbik
 3. Prof. Dr. Norbert Sträter

Tag der öffentlichen Verteidigung: 23.06.2015

„Essentially, all models are wrong, but some are useful.“

George E. P. Box

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
1. Einleitung.....	1
1.1. Aufbau gram-positiver Bakterien und Funktion der Teichonsäuren	1
1.2. Proteine des <i>dlt</i> -Operons.....	3
1.3. DltA und verwandte Proteine	4
1.3.1. Substratbindetasche und DltA Reaktionsmechanismus.....	5
1.3.2. Konformationelle Diversität der Adenylat-bildenden Enzyme.....	8
1.4. DltC und verwandte <i>carrier</i> -Proteine	10
1.5. <i>carrier</i> -Protein-Interaktionen	12
1.5.1. DltA-DltC-Interaktion.....	13
1.5.2. PCP-Interaktionen in NRPSs-Komplexen	14
1.5.3. ACP-Interaktionen in Fettsäure- und Polyketid-Synthase-Komplexen.....	17
1.6. Zielstellung.....	19
2. Material und Methoden.....	21
2.1. Materialien	21
2.1.1. Chemikalien	21
2.1.2. Bakterienstämme	21
2.1.3. Plasmide	21
2.2. Molekulabiologische Methoden.....	21
2.2.1. Präparation von Plasmid-DNA.....	21
2.2.2. DNA-Konzentrationsbestimmung.....	22
2.2.3. Ortsgerichtete Mutagenese	22
2.2.4. DNA-Sequenzierung	22
2.3. Mikrobiologische Methoden	23
2.3.1. Nährmedien und Antibiotika	23
2.3.1.1. Herstellung von Flüssigmedien	23
2.3.1.2. Herstellung von LB-Agarplatten	23
2.3.1.3. Antibiotika.....	23
2.3.2. Herstellung chemisch kompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	24
2.3.3. Transformation in chemisch kompetente Zellen von <i>E. coli</i>	24
2.3.4. Herstellung von Glycerinkulturen.....	24
2.3.5. Expression von <i>dltA</i> und <i>dltC</i> in <i>E. coli</i> in LB-Medium	24
2.3.6. Expression von <i>dltA</i> und <i>dltC</i> in <i>E. coli</i> mit M9-Minimalmedium	25
2.4. Reinigung löslicher Proteine	25

2.4.1. Aufschluss von <i>E. coli</i> -Zellen.....	25
2.4.2. <i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i> (IMAC).....	25
2.4.3. Größenausschlusschromatographie.....	25
2.4.4. Herstellung der großen Domäne von DltA	26
2.5. Proteinbiochemische und biophysikalische Methoden	26
2.5.1. UV/Vis-Spektroskopie.....	26
2.5.2. CD-Spektroskopie	27
2.5.3. NMR-Spektroskopie.....	27
2.5.3.1. 1D- ¹ H-NMR-Spektroskopie	27
2.5.3.2. 2D- ¹⁵ N, ¹ H-TROSY-HSQC-Spektroskopie.....	27
2.5.4. Denaturierende Gelelektrophorese	28
2.5.4.1. Coomassiefärbung	29
2.5.4.2. Silberfärbung.....	29
2.5.5. Bestimmung der freien Thiolgruppen	29
2.5.6. Kovalente Verknüpfung des DltA-DltC-Komplexes.....	30
2.5.7. Limitierte Proteolyse	30
2.6. Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)	30
2.7. Bestimmung der Enzymaktivität.....	32
2.7.1. Zeit-Umsatz-Messungen.....	32
2.7.2. v/S-Charakterisierung.....	32
2.7.3. Abhängigkeit von der Enzymkonzentration	33
2.7.4. Detektion des AMP mittels RP-HPLC.....	33
2.8. Massenspektrometrie.....	33
2.8.1. ESI-Massenspektrometrie unter denaturierten Bedingungen	33
2.8.2. Native Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie	34
2.9. Röntgenstrukturanalyse	34
2.9.1. Kristallisation	34
2.9.1.1. Initiales Kristallisations- <i>screening</i>	34
2.9.1.2. Optimierung der Kristallisation	35
2.9.2. Aufnahme und Prozessierung der Diffraktionsdaten	35
2.9.3. Phasierung - <i>molecular replacement</i>	36
2.9.4. Modellbau, Verfeinerung und Strukturvalidierung	36
2.9.4.1. DltA-DltC (P312 ₁).....	36
2.9.4.2. DltA (P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	37
2.9.4.3. DltA-DltC (P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁)	37
3. Ergebnisse	38
3.1. Präparation und Charakterisierung von DltC und DltA.....	38

3.1.1. Präparation von DltA und DltC	38
3.1.1.1. Herstellung der großen Domäne von DltA (DltA _N)	38
3.1.2. Analyse der Konformationen von DltC mittels ¹⁵ N, ¹ H-TROSY-HSQC-Spektroskopie	39
3.1.3. Röntgenstrukturanalyse von DltA	41
3.1.3.1. Kristallisation, Datensammlung und Prozessierung	41
3.1.3.2. Phasierung, Strukturbau, Verfeinerung und Validierung	42
3.1.3.3. Strukturbeschreibung und Vergleich mit anderen DltA-Strukturen	42
3.1.4. Analyse der Liganden-Bindung und Konformationen von DltA	45
3.1.4.1. Konformationelle Analyse mittel nativer Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie	45
3.1.4.2. Konformationelle Analyse durch limitierte Proteolyse	47
3.1.4.3. Liganden-Bindung an DltA	48
3.2. Röntgenstrukturanalyse des DltA-DltC-Komplexes	49
3.2.1. Kristallisation, Datensammlung und Prozessierung	49
3.2.2. Phasierung, Strukturbau, Verfeinerung und Validierung	51
3.2.3. Strukturbeschreibung des DltA-DltC-Komplexes (Kristallform I)	51
3.2.4. Strukturbeschreibung des DltA-DltC Komplexes (Kristallform II)	55
3.2.5. Vergleich der Strukturen beider DltA-DltC-Komplexe	58
3.3. Biophysikalische und biochemische Charakterisierung der DltA-DltC-Interaktion	59
3.3.1. NMR-spektroskopische Titration von DltA zu DltC (¹⁵ N, ¹ H-TROSY HSQC)	60
3.3.2. Kovalente Verknüpfung des alternativen DltA-DltC-Komplexes (Position A)	63
3.3.3. Analyse des DltA-DltC-Komplexes mittels Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie	66
3.4. Thermodynamische Charakterisierung der DltA-DltC-Interaktion	69
3.4.1. Analyse der thermodynamischen Parameter für die Bindung von DltC an DltA	69
3.4.2. Protonierungsreaktionen innerhalb der DltA-DltC-Interaktion	74
3.4.3. Abschätzung der Größe des Interaktionsfläche	76
3.5. Kinetische Charakterisierung der DltA-katalysierten D-Alanylierung des DltC	79
3.5.1. Zeitabhängigkeit der Reaktion	80
3.5.2. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration	81
3.5.2.1. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der DltC-Konzentration	81
3.5.2.2. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der D-Ala und ATP-Konzentration	84
3.5.3. Einfluss der DltA-Konzentration	86
4. Diskussion	88
4.1. Konformationelle Untersuchungen von DltA und DltC	88
4.1.1. Konformationelle Analyse des DltA	88
4.1.2. Vergleich der beschriebenen gelösten DltA-Kristallstruktur mit publizierten DltA Strukturen	89
4.1.3. Ligandenbindung an DltA	91
4.1.4. Konformationelle Analyse des DltC	92

4.2. Kristallstrukturen belegen unterschiedliche DltC-Bindestellen im DltA-DltC-Komplex.....	94
4.2.1. Vergleich der Struktur des produktiven DltA-DltC-Komplexes mit publizierten Strukturen.....	94
4.2.2. Vergleich der Struktur des alternativen DltA-DltC-Komplexes mit publizierten Strukturen.....	96
4.2.3. Konservierungsgrad der Interaktion zwischen DltA und DltC	99
4.2.4. Existiert die alternative Bindung von DltC an DltA in Lösung?.....	100
4.2.5. Kann DltC an DltA in verschiedenen Konformationen binden?.....	103
4.3. Reaktionsmodell der DltA-katalysierten D-Alanylierung des DltC.....	107
4.3.1. Hat der alternative DltA-DltC-Komplex eine Funktion innerhalb der DltA-katalysierten Reaktion?.....	110
4.4. Zusammenfassende Diskussion der erzielten Ergebnisse.....	112
5. Zusammenfassung.....	114
Literaturverzeichnis.....	116
Abkürzungsverzeichnis.....	I
Anhang	III
Eigene Publikationen.....	XVII
Lebenslauf	XVIII
Eidesstattliche Erklärung.....	XIX
Danksagung.....	XXI

1. Einleitung

Im Jahr 1928 wurde von dem schottischen Bakteriologen Alexander Flemming das erste Antibiotikum Penicillin entdeckt, welches die Zellwandsynthese von gram-positiven Bakterien inhibiert. Vertreter dieses Phylum wie *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Streptococcus pneumonia* stellen Humanpathogene dar und sind für die Krankheitsbilder Lungenentzündung, Milzbrand, Tuberkulose und Hirnhautentzündung verantwortlich. Als Antwort auf die Antibiotikagabe haben sich jedoch zahlreiche Resistenzen gebildet. Vor allem Infektionen, die durch den multi-resistenten MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*) verursacht werden, gestalten sich in der Behandlung zunehmend schwieriger, da das Reservoir an verfügbaren wirksamen Antibiotika nahezu erschöpft ist. Aufgrund unsachgemäßer Behandlungen konnten MRSA bereits Resistenzen gegenüber Daptomycin, dem derzeit wirkungsvollstem Bakterizid, entwickeln (Boucher and Sakoulas, 2007). Viele Daptomycin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme sind durch eine verdickte Zellwand mit einem ebenfalls erhöhten D-Alanin-Gehalt gekennzeichnet. Dabei konnte neben einer erhöhten Expression des *tagA*, welches an der Synthese der Wandteichonsäuren beteiligt ist, auch eine Überexpression des *dltA* aus dem *dlt*-Operon beobachtet werden (Bertsche et al., 2013). Die Analyse der Funktion der Proteine des *dlt*-Operons, ihre Interaktion untereinander sowie die Aufklärung der DltABCD-abhängigen D-Alanylierung von Teichonsäuren besitzt demnach eine hohe pharmakologische Relevanz. In dieser Arbeit wurde die Interaktion der Proteine DltA und DltC, welche den ersten Schritt in dem D-Alanin-Modifizierungsweg katalysieren, strukturell, thermodynamisch und kinetisch charakterisiert.

1.1. Aufbau gram-positiver Bakterien und Funktion der Teichonsäuren

Die bakterielle Zellwand ist eine komplexe, hoch geordnete Struktur und ermöglicht Bakterien, sich sowohl gegenüber der Umwelt abzugrenzen als auch über sie mit ihr zu interagieren. Die mehrschichtige Peptidoglykanschicht ist charakteristisch für die Zellwand gram-positiver Bakterien und besteht aus N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure. Neben einer zusätzlichen Polysaccharidhülle, welche die Bakterien gegenüber der Umwelt abgrenzt (Yother, 2011), sind polyanionische Teichonsäuren in die Peptidoglykanschicht integriert. Alle Komponenten bilden eine anionische Matrix, die für die Elastizität, Zugfestigkeit und elektrostatischen Eigenschaften der Zellwand verantwortlich ist (Dijkstra and Keck, 1996; Doyle and Marquis, 1994; Thwaites and Mendelson, 1991). In diese Matrix können Proteine wie Adhäsine und Peptidoglykan-Hydrolasen (Autolysine) integriert werden, denen eine Rolle bei der Virulenz und Zellteilung zugeordnet werden kann (Shockman et al., 1996). Weitere Funktionen beinhalten die Aufrechterhaltung der Metall-Kation-Homöostase und die Kontrolle des Transports von Ionen, Nährstoffe, Proteine und Antibiotika (Neuhaus and Baddiley, 2003).

1.2. Proteine des *dlt*-Operons

Das Vorkommen des *dlt*-Operons (*dlt*: D-Alanylierung der Lipoteichonsäuren) ist eine Eigenschaft aller gram-positiven Bakterien. Zu Beginn der 90er Jahre wurde von der Gruppe von Francis C. Neuhaus die Funktion des D-Ala-aktivierenden Enzyms Dcl sowie des Akzeptors für das aktivierte D-Ala Dcp aus *Lactobacillus casei* beschrieben (Heaton and Neuhaus, 1992; Heaton and Neuhaus, 1994). 1995 konnten fünf Gene des *dlt*-Operons (*dltA*, *B*, *C*, *D*, *E* aus *Bacillus subtilis* und *dltA*, *B*, *C*, *D*, *X* aus *Staphylococcus aureus*) identifiziert werden (Perego et al., 1995; Koprivnjak et al., 2006). DltA (Dcl), mit einer Größe von 57 kDa, ist ein Adenylat-bildendes Enzym und aktiviert D-Ala unter Verwendung eines ATP (Perego et al., 1995; Debabov et al., 1996a). Der Akzeptor für das aktivierte D-Ala ist der kovalent gebundene 4'-Phosphopantethein-Cofaktor des 9 kDa großen *carrier*-Proteins DltC (Dcp) (Debabov et al., 1996a). Die Funktion und Struktur des DltA und DltC wird innerhalb der nächsten Kapitel näher beleuchtet, während die der Proteine DltB, DltD, DltE und DltX bis dato nicht oder nur wenig bekannt sind. Es gibt jedoch Hinweise, dass DltB mit einer Größe von 47 kDa ein integrales Membranprotein darstellt (Neuhaus et al., 1996). Für DltD kann eine N-terminale membraninsertierte Helix vermutet werden (Debabov et al., 2000).

Für die Lokalisation und Funktion von DltD und DltB wurden zwei Modelle beschrieben (Abbildung 1.2). FISCHER vermutete das DltD auf der extracytosolischen Seite (Perego et al., 1995), während im Modell von NEUHAUS und BADDILEY das DltD auf der cytosolischen Seite der Membran vorzufinden ist (Neuhaus and Baddiley, 2003). Darauf aufbauend wurden unterschiedliche Funktionen von DltD und DltB diskutiert. Im FISCHER-Modell wird das D-Ala durch DltB vom DltC auf ein Undecaprenyl-Phosphat (C₅₅-P)-Intermediat übertragen und erfährt anschließend eine Translokation auf die extracytosolische Seite der Membran. Das DltC verbleibt dabei im Cytosol. Des Weiteren wurde für das DltD ein Signalpeptid beschrieben, welches für die Translokation auf die äußere Seite der Membran verantwortlich ist (Perego et al., 1995), wo DltD die D-Alanylierung der Lipoteichonsäuren katalysiert (Koch et al., 1985). Im Modell von NEUHAUS und BADDILEY wurde dem DltD eine Rolle in der Übertragung des D-Ala von dem DltA auf DltC und eine Lokalisation auf der cytosolischen Seite der Membran zugeschrieben (Debabov et al., 2000). DltB fungiert in diesem Modell als *carrier* für den Transport von DltC auf die extracytosolische Seite, wo anschließend durch einen unbekanntem Mechanismus die Übertragung des D-Ala auf die Lipoteichonsäuren erfolgen kann (Neuhaus and Baddiley, 2003). Neuste Studien belegen den Verbleib des DltC im Cytosol und eine Lokalisation des DltD auf der extracytosolischen Seite der Membran und korrelieren damit mit dem Modell von FISCHER und Mitarbeitern (Reichmann et al., 2013).

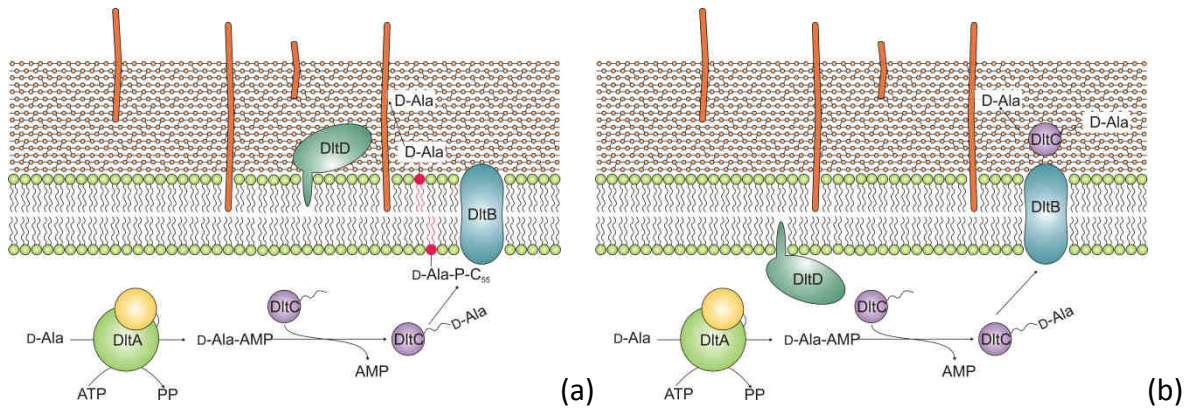


Abbildung 1.2 **Funktion und Lokalisation der Genprodukte des *dlt*-Operons.** Modifiziert nach Reichmann et al., 2013 **(a) Modell nach FISCHER.** DltA aktiviert ein D-Ala unter Verbrauch von ATP. Das gebildete Adenylyat wird anschließend auf DltC übertragen. Durch eine DltB-katalysierte Reaktion wird das D-Ala-Adenylyat auf ein Undecaprenyl-Phosphat (P-C₅₅) übertragen und durchquert darauffolgend die Membran. Im finalen Schritt ist DltD für die Übertragung des D-Ala auf die Teichonsäure verantwortlich. **(b) Modell nach NEUHAUS und BADDILEY.** Das von DltA gebildete D-Ala-Adenylyat wird in einer DltD-abhängigen Reaktion auf DltC übertragen. Das beladene DltC wird anschließend durch DltB auf die extracytosolische Seite der Membran transportiert. Die Übertragung des D-Ala von DltC auf die Teichonsäuren erfolgt durch einen noch nicht bekannten Mechanismus.

1.3. DltA und verwandte Proteine

DltA ist ein Vertreter der Superfamilie der Adenylyat-bildenden Enzyme. Diese kann in drei Subfamilien untergliedert werden, die Acyl- und Aryl-CoA-Synthasen, welche häufig auch als Ligasen bezeichnet werden, die Adenylierungs-Domänen der nicht-ribosomalen-Peptid-Synthasen (NRPSs) und die Leuchtkäfer-Luziferasen. Damit sind die Adenylyat-bildenden Proteine an einer Vielzahl verschiedener biochemischer Prozesse beteiligt. Die NRPS sind für die Synthese von nicht-ribosomalen Peptiden verantwortlich. Die Acyl-CoA-Synthasen katalysieren unter ATP-Verbrauch die Aktivierung von Fettsäuren zu Acyl-CoA. Dieses kann weiter über die Fettsäureoxidation zu Acetyl-CoA abgebaut werden, welches zur Energiegewinnung in den Citratzyklus eingeschleust wird. Die Acetyl-CoA-Synthase ist ein in Bakterien und pflanzlichen Zellen vorkommendes Enzym und katalysiert die Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA unter Verbrauch von ATP. Acetyl-CoA kann in den Glyoxylatzyklus eingeschleust werden und ermöglicht den Pflanzen und Bakterien den Acetat-Anabolismus. Zwischen den einzelnen Subgruppen der Adenylyat-bildenden Enzyme besteht nur eine geringe Sequenzhomologie von 20-40 % (Babbitt et al., 1992). Ungeachtet davon weisen die Mitglieder dieser Superfamilie jedoch eine homologe dreidimensionale Struktur auf und besitzen 10 sequenz-konservierte Regionen (A1-A10) (Marahiel et al., 1997; Reger et al., 2007). Dabei weist DltA die größte strukturelle Ähnlichkeit zu PheA, einer Adenylierungs-Domäne aus dem Multienzym-Komplex Gramicidin-S-Synthase, auf (Yonus et al., 2008; Conti et al., 1997).

Bacillus-subtilis-DltA, bestehend aus 503 Aminosäuren, kann in zwei Domänen unterteilt werden. Die große N-terminale Domäne umfasst die Aminosäuren 1-395 und kann in drei weitere Subdomänen unterteilt werden (Kapitel 1.3.2. Abbildung 1.6, links) (Yonus et al., 2008 ;Conti et al., 1996; Conti et al., 1997). Die Subdomänen A und B weisen dieselbe Topologie, ein von α -Helices umgebenes β -Faltblatt, auf. Die Subdomäne C hingegen bildet

ein in sich verdrehtes β -Fass aus. Die kleine C-terminale Domäne (Aminosäuren 400-503) besteht aus einer gemischten $\alpha+\beta$ -Struktur und ist durch eine *linker*-Region (Aminosäuren 396-399) mit der N-terminalen Domäne verbunden. Die *linker*-Region sowie der sogenannte *P-loop* (Thr151-Lys159) weisen dabei die größte strukturelle Flexibilität auf. Die DltA-Sequenz innerhalb der *Bacillus*-Stämme ist gut konserviert. Die Sequenzidentität zwischen DltA aus *Bacillus subtilis* und *Bacillus atrophaeus* beträgt 81 %, während mit 56 % die geringste Sequenzübereinstimmung zwischen *Bacillus subtilis* und *Bacillus cereus* gefunden werden konnte.

1.3.1. Substratbindetasche und DltA Reaktionsmechanismus

Die Proteine der Adenylierungs-Superfamilie sind in der Lage, unter Verwendung von ATP und unterschiedlicher Substrate eine ähnliche Reaktion zu katalysieren. Dabei können proteinogene, nicht-proteinogene Aminosäuren, Fettsäuren, Carbonsäuren sowie heterozyklische Verbindungen wie das D-Luziferin als Substrate genutzt werden (Abbildung 1.3) (Caboche et al., 2008; Conti et al., 1996; Reger et al., 2007).

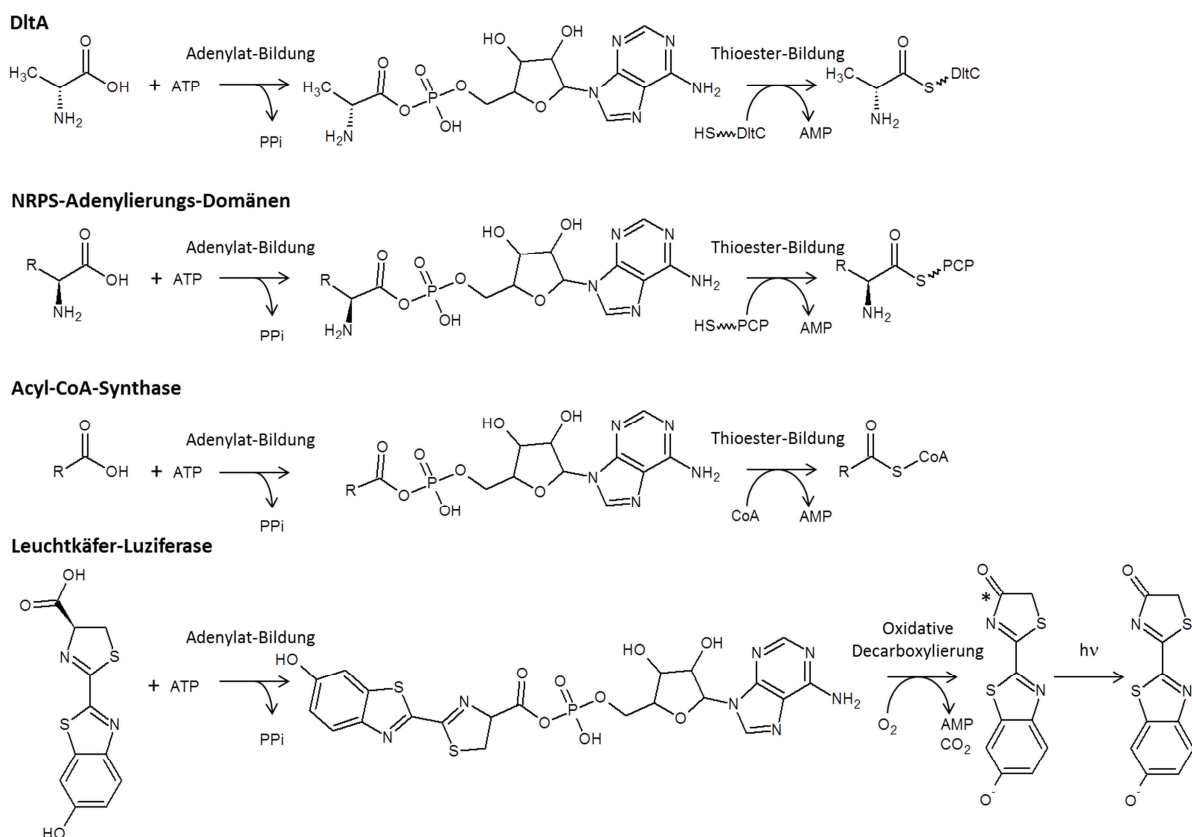


Abbildung 1.3 **Reaktionen, katalysiert von Adenylat-bildenden Enzymen.** Modifiziert nach Gulick 2009. Neben ATP können als Substrate D-Ala (DltA), proteinogene, nicht-proteinogene Aminosäuren und Carbonsäuren (NRPS), Fettsäuren (Acyl-CoA Synthasen) bzw. Luziferin (Luziferasen) verwendet. Die Reaktion kann in zwei Halbreaktionen unterteilt werden. Im ersten Schritt wird unter Verwendung von ATP und des entsprechenden Substrates unter Freisetzung eines Pyrophosphates das Adenylat gebildet. Im zweiten Teil der Reaktion erfolgt entweder eine Thioester-Bildung durch Übertragung des aktivierten Substrats auf eine freie Akzeptor-Thiolgruppe oder eine oxidative Decarboxylierung (Luziferase).

Die von DltA katalysierte Reaktion ist der erste Schritt im D-Alanylierungsweg der Lipoteichonsäuren. Neben dem Vorkommen als Modifikation von Teichonsäuren ist das D-Ala zudem Bestandteil des Peptidoglykans und nicht-ribosomal synthetisierter Peptide. Die dafür notwendigen Mengen werden durch eine Alanin-Racemase generiert (Diven et al., 1964).

Die DltA-katalysierte Reaktion kann in zwei Halbreaktionen unterteilt werden. Zu Beginn wird aus D-Ala mit Hilfe von ATP unter Freisetzung von Pyrophosphat ein D-Ala-Adenylat gebildet. Die Energie des gebildeten Anhydrids wird in der zweiten Teilreaktion genutzt, um D-Ala unter Ausbildung einer Thioester-Bindung auf die freie Thiolgruppe des 4'-Phosphopantethein-Cofaktors des DltC zu übertragen. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 1.4 und Abbildung 1.5 näher beschrieben. Die Substratspezifität wird dabei durch 10 Aminosäuren in der Nähe des aktiven Zentrums definiert (Stachelhaus et al., 1999; Strieker et al., 2010). Dazu gehören sowohl Aminosäuren aus der großen und kleinen Domäne, als auch aus der *linker*-Region.

Ein mögliches Modell für den Reaktionszyklus von DltA konnte bereits beschrieben werden (Abbildung 1.4), (Yonus et al., 2008). Das Modell wurde unter Zuhilfenahme von Röntgenstrukturen des DltA und verwandter Proteine erstellt. Die Leuchtkäfer-Luziferase (Franks et al., 1998) liegt dabei in der offenen Konformation, das DhbE (May et al., 2002) in der Adenylierungs- und das DltA (Yonus et al., 2008) in der Transfer-Konformation vor. Durch die strukturelle Verwandtschaft innerhalb der Superfamilie der Adenylat-bildenden Proteine lässt sich dieses Modell auch auf verwandte Proteine der Acyl- und Aryl-CoA-Synthetasen, der Adenylierungs-Domänen der Nicht-ribosomalen-Peptid-Synthetasen (NRPSs) und die Leuchtkäfer-Luziferase übertragen.

Es wurde postuliert, dass die Domänen-Bewegung während der Reaktion stark durch die Position des Arg396 sowie des *P-loop* beeinflusst wird und diese die für den jeweiligen Schritt wichtigen Aminosäuren in das aktive Zentrum dirigiert. Der Reaktionszyklus beginnt mit der für die Luziferase entdeckten offenen Form. Diese ist durch wenige Kontakte zwischen der N- und C-terminalen Domäne charakterisiert. Die für die Reaktion wichtigen Aminosäuren und Struktur motive sind in einer Konformation, die keine Katalyse ermöglicht (Abbildung 1.4 A). Arg396 aus der *linker*-Region weist eine vom aktiven Zentrum weg gerichtete Konformation auf und wird durch die Aminosäuren Glu411 und Glu414 stabilisiert. Lys491 hingegen ist der Substratbindestelle zugewandt, während der *P-loop* zur kleinen Domäne gerichtet ist und durch Kontakte mit dem Asp382 in dieser Konformation stabilisiert wird. Die Bindung des Mg^{2+} sowie der beiden Substrate D-Ala (für DltA) und ATP bewirkt eine Reorientierung der Position der kleinen im Vergleich zur großen Domäne (Abbildung 1.4 B). Das γ -Phosphat des ATP wird sowohl vom Lys159 als auch von dem Amid-Rückgrat des *P-loops* gebunden, wodurch sich dieser von der kleinen Domäne löst. Lys491 erreicht räumliche Nähe zur α - β -Anhydrid-Bindung des ATP, deren Spaltung zur Freisetzung des Pyrophosphates und Bildung des D-Ala-Adenylats führt (Abbildung 1.4 C). Die entstandene negative Ladung im aktiven Zentrum bewirkt eine konformationelle Änderung des Arg396 in Richtung des ATP.

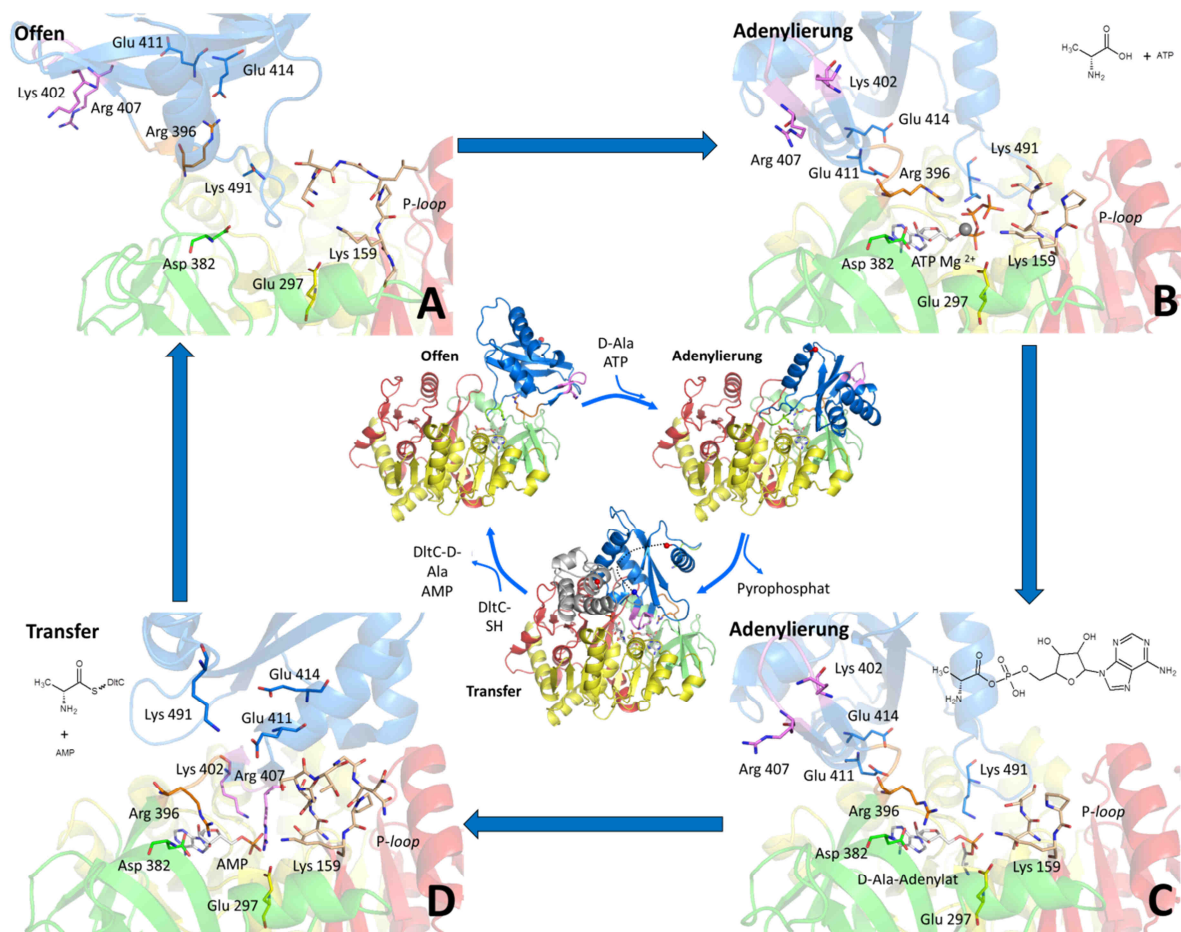


Abbildung 1.4 **Modell des DltA-Reaktionszyklus (Mitte) mit Strukturdarstellungen der aktiven Zentren der jeweiligen Zyklusstufen (außen A-D).** Die Farbgebung des DltA ist analog zu Abbildung 1.6. Die variable *loop*-Region ist in Orange, die katalytisch wichtige Region der kleinen Domäne in Lila und der *P-loop* in Sand dargestellt (pdb-Code 3E7W) (Yonus et al., 2008). In der offenen Konformation (**A**) erfolgt die Bindung der Substrate D-Ala, ATP und Mg²⁺ (pdb-Code 1BA3) (Franks et al., 1998). Dadurch wird eine konformationelle Umorientierung der kleinen Domäne eingeleitet, so dass DltA die Adenylierungs-Konformation einnimmt (**B**) (pdb-Code 3FCC) (Osman et al., 2009). Die Bildung des D-Ala-Adenylats (**C**) (pdb-Code 3DHV) (Du et al., 2008) und die Abspaltung des Pyrophosphats leiten den Übergang zur Transfer-Konformation ein (**D**) (pdb-Code 3E7W) (Yonus et al., 2008). Ausgehend von dieser Konformation erfolgt die Übertragung des aktivierten D-Ala vom DltA auf DltC. Nach Dissoziation des im DltA verbleibenden AMP wird durch eine 140°-Rotation der kleinen Domäne wieder die offene Konformation eingenommen (**Mitte**).

Zusammen mit der Konformationsänderung des *P-loops* wird eine Rotation der kleinen Domäne bewirkt (Yonus et al., 2008; May et al., 2002). Dadurch wird das Hydrolyseempfindliche Adenylat im aktiven Zentrum vom umgebenden Lösungsmittel abgeschirmt. Aufgrund der eingetretenen sterischen Entspannung dreht sich Arg396 weiter zum Asp382 und leitet damit den Übergang zur Transfer-Konformation ein (Abbildung 1.4 D). Lys402 hat nun die richtige Position, um die negative Ladung des AMP zu stabilisieren. Der Ausschluss des Mg²⁺ aus dieser Konformation durch Bildung einer Salzbrücke zwischen Arg407 und Glu297 verhindert die Rückreaktion. Nach Übertragung des D-Ala auf DltC erfolgt dessen Freisetzung sowie des AMP durch einen noch nicht verstandenen Mechanismus. Durch eine Rotation der kleinen Domäne um 140° kann die offene Konformation wieder eingenommen werden.

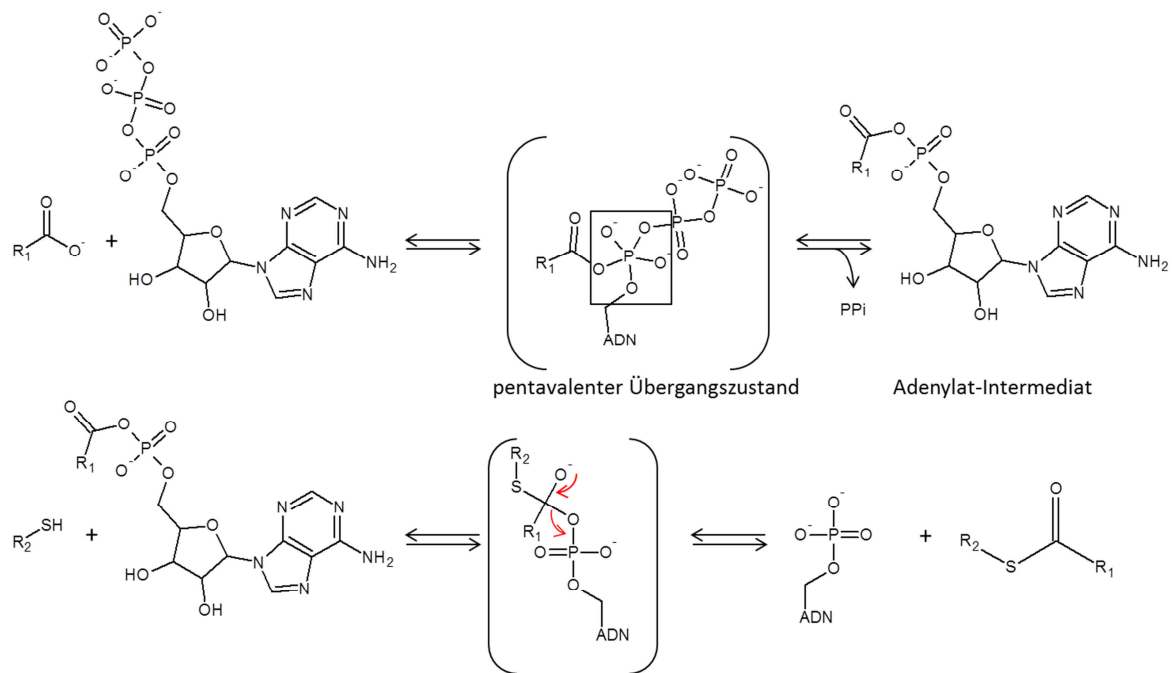


Abbildung 1.5 **Postulierter Mechanismus der DltA-katalysierten Adenylierungsreaktion.** **Oben:** Im ersten Schritt erfolgt ein nukleophiler Angriff der deprotonierten Carboxylatgruppe an das α -Phosphat des ATP. Der pentavalente Übergangszustand wird dabei durch positive geladene Seitenketten (Arg396 und Lys491) des DltA stabilisiert. Durch Abspaltung von Pyrophosphat erfolgt die Ausbildung des Adenylat-Intermediats. **Unten:** Nach Deprotonierung der Sulfhydrylgruppe des DltC-Cofaktors erfolgt ein nukleophiler Angriff am Carbonyl-Kohlenstoffatom. Nach Übertragung des D-Ala auf die Sulfhydrylgruppe wird die negative Ladung des AMP durch Lys402 und Arg407 des DltA stabilisiert. Modifiziert nach (Schmelz and Naismith, 2009).

1.3.2. Konformationelle Diversität der Adenylat-bildenden Enzyme

Die bisher publizierten Röntgenstrukturen von DltA aus *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* sowie von verwandten Adenylat-bildenden Enzymen (A-Domänen) in An- und Abwesenheit von Liganden weisen auf eine konformationelle Flexibilität hin (Tabelle 1.1). Die kleine C-terminale Domäne weist dabei unterschiedliche Orientierungen im Vergleich zur großen N-terminalen Domäne auf. Dabei werden die jeweiligen, für die Teilreaktionen erforderlichen Aminosäuren ins aktive Zentrum dirigiert.

Es können drei Konformationsklassen unterschieden werden, die Transfer- (auch Thiolierungs-), die Adenylierungs- und die offene Konformation. Aufgrund der Flexibilität sind diese jedoch ebenfalls durch eine konformationelle Heterogenität charakterisiert. In der Transfer- oder Adenylierungs-Konformation können dabei leicht abweichende Positionen der kleinen Domäne beobachtet werden (Abbildung 1.6). A-Domänen in der Transfer-Konformation wurden mit AMP (DltA) oder mit einem Adenylat (-Analogon) kristallisiert, während in der Adenylierungs-Konformation hauptsächlich Substrate oder Adenylat (-Analoge) beobachtet werden können. Die A-Domänen in der offenen Form sind durch eine Abwesenheit von Liganden gekennzeichnet und weisen die größte konformationelle Diversität auf.

Protein	Konformation	Ligand	pdb-Code
DltA (<i>Bacillus subtilis</i>)	Transfer	AMP	3E7W/3E7X
EntE (<i>Escherichia coli</i>)	Transfer	DHB-Adenylat-PPant-Analogon	3RG2
PA1221 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1)	Transfer	Valin-Adenylat-PPant-Analogon	4DG9
4-Chlorbenzyl-CoA-Ligase (<i>Alcaligenes sp.</i>)	Transfer	4-Chlorphenyl-CoA+AMP	3CW9
Acetyl-CoA-Synthase (<i>Salmonella typhimurium</i>)	Transfer	Acetyl-Adenylat+CoA	2P2F
Acetyl-CoA-Synthase (<i>Salmonella enterica</i>)	Transfer	Propyl-AMP+CoA	1PG4
Long chain fatty acyl-CoA-Synthase (<i>Thermus thermophilus</i>)	Transfer-ähnlich	AMPPNP	1V25
Long chain fatty acyl-CoA-Synthase (<i>Thermus thermophilus</i>)	Transfer-ähnlich	Myristyl-Adenylat	1V26
DltA (<i>Bacillus cereus</i>)	Adenylierung-1	ATP+Mg ²⁺	3FCC
DltA (<i>Bacillus cereus</i>)	Adenylierung-1	D-Ala-Adenylat	3DHV
DltA (<i>Bacillus cereus</i>)	Adenylierung-1	-	4PZP
Dhbe (<i>Bacillus subtilis</i>)	Adenylierung-2	DHB+AMP	1MD9
Dhbe (<i>Bacillus subtilis</i>)	Adenylierung-2	DHB-Adenylat	1MDB
Dhbe (<i>Bacillus subtilis</i>)	Adenylierung-2	-	1MDF
Leuchtkäfer-Luziferase (<i>Luciola cruciata</i>)	Adenylierung-2	Luziferyl-Adenylat-Analogon	2D1S
Benzoat-CoA-Ligase (<i>Burkholderia xenovorans</i>)	Adenylierung-2	Benzoat	2V7B
Acetyl-CoA-Synthase (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Adenylierung-2	AMP	1RY2
4-Chlorbenzyl-CoA-Ligase (<i>Alcaligenes sp.</i>)	Adenylierung-3	4-CBA-Adenylat-Analogon	3CW8
Acyl-CoA Synthase (<i>Homo sapiens</i>)	Adenylierung-3	CoA	3GPC
Long chain fatty acyl-CoA-Synthase (<i>Thermus thermophilus</i>)	Adenylierung-3 (Kette B)	-	1ULT
SrfA-C A-Domäne (<i>Bacillus subtilis</i>)	Adenylierung-4	Leucin	2VSQ
Leuchtkäfer-Luziferase (<i>Photinus pyralis</i>)	offen-1	-	1BA3
SidN A-Domäne (NRPS) (<i>Neotyphodium lolii</i>)	offen-2	-	3ITE
Acyl-CoA-Synthase (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	offen-3	-	3R44
Long chain fatty acyl-CoA-Synthase (<i>Thermus thermophilus</i>)	offen-4 (Kette A)	-	1ULT

Tabelle 1.1. **Zusammenfassung ausgewählter Strukturen Adenylatbildender Enzyme.** pdb-Codes: 3E7W (I222)/3E7X (P2₁2₁2₁) (Yonus et al., 2008), 3RG2 (Sundlov et al., 2012), 4DG9 (Mitchell et al., 2012), 3CW9/3CW8 (Reger et al., 2008), 2P2F (Reger et al., 2007), 1V25, 1V26, 1ULT (Hisanaga et al., 2004), 1PG4 (Gulick et al., 2003), 3FCC (Osman et al., 2009), 3DHV (Du et al., 2008), 4PZP (Du and Luo, 2014), 1MD9/1MDB/1MDF (May et al., 2002), 2D1S (Nakatsu et al., 2006), 2V7B (Bains and Boulanger, 2007), 1RY2 (Jogl and Tong, 2004), 3GPC (Kochan et al., 2009), 2VSQ (Tanovic et al., 2008), 1BA3 (Franks et al., 1998), 3ITE (Lee et al., 2010), 3R44 (Andersson et al., 2012)

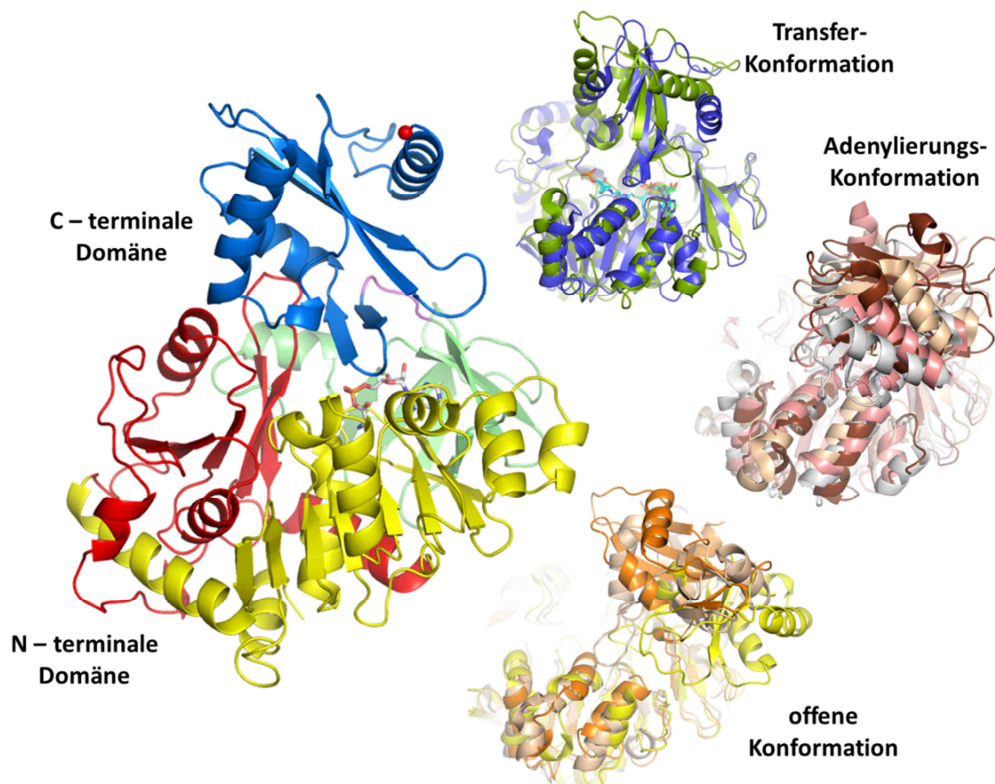


Abbildung 1.6 **Röntgenstrukturen der Adenylatbildenden Enzyme.** (links) *Bacillus subtilis*-DltA. Die große Domäne kann in drei Subdomänen unterteilt werden. Die Subdomäne A ist in Rot, B in Gelb und C in Grün und die kleine C-terminale Domäne in Blau koloriert. Der C-Terminus des DltA ist als rote Kugel gezeigt (pdb-Code 3E7W, (Yonus et al., 2008)) (rechts) **Transfer-Konformationen.** *Bacillus subtilis* DltA (3E7W) grün und EntE (3RG2) blau, **Adenylierungs-Konformationen.** Dhbe (1MD9) rosa, *Bacillus cereus* DltA (3DHV) grau, 4-Chlorbenzyl-CoA Ligase (3CW8) gold, SrfA-C A-Domäne (2VSQ) braun, **offene Konformationen.** Leuchtkäfer-Luziferase (1BA3) orange, SidN A-Domäne (3ITE) gelb, *Mycobacterium tuberculosis* Acyl-CoA Synthase (3R44) sand.

1.4. DltC und verwandte *carrier*-Proteine

Das *Bacillus-subtilis*-DltC weist mit 78 Aminosäuren eine Größe von ~9 kDa auf und trägt eine 4'-Phosphopantethein (PPant) Modifikation am (Abbildung 1.7) am Serin36 am N-terminalen Ende der Helix II. Die Ausbildung der Phosphoesterbindung zwischen dem Cofaktor und dem Serin wird unter Verwendung von Coenzym A als Substrat durch die Phosphopantethein-Transferasen katalysiert (Lambalot et al., 1996; Reuter et al., 1999). Dabei dient die freie Thiolgruppe des Cofaktors als Akzeptor des vom DltA gebildeten D-Ala-Adenylats (Heaton and Neuhaus, 1994; Debabov et al., 1996b). 1996 wurde bereits eine Homologie zu den ACPs (*acyl carrier proteins*) postuliert (Debabov et al., 1996b). 2001 konnte schließlich die NMR-Struktur von apo-Dcp, einem DltC-homologen Protein aus *Lactobacillus casei*, gelöst werden (Volkman et al., 2001). Die Struktur des DltC weist große Ähnlichkeiten zu den NMR- und Röntgenstrukturen der PCPs (*peptidyl carrier proteins*) bzw. ACPs auf (Crosby and Crump, 2012; Weissman and Muller, 2008; Neuhaus and Baddiley, 2003). Das Vorkommen und die Funktion der ACPs und PCPs wird in Kapitel 1.5. näher beleuchtet. 2011 wurden von ZIMMERMANN die Kristallstrukturen des apo- und holo-*Bacillus-subtilis*-DltC beschrieben (Zimmermann, 2011).

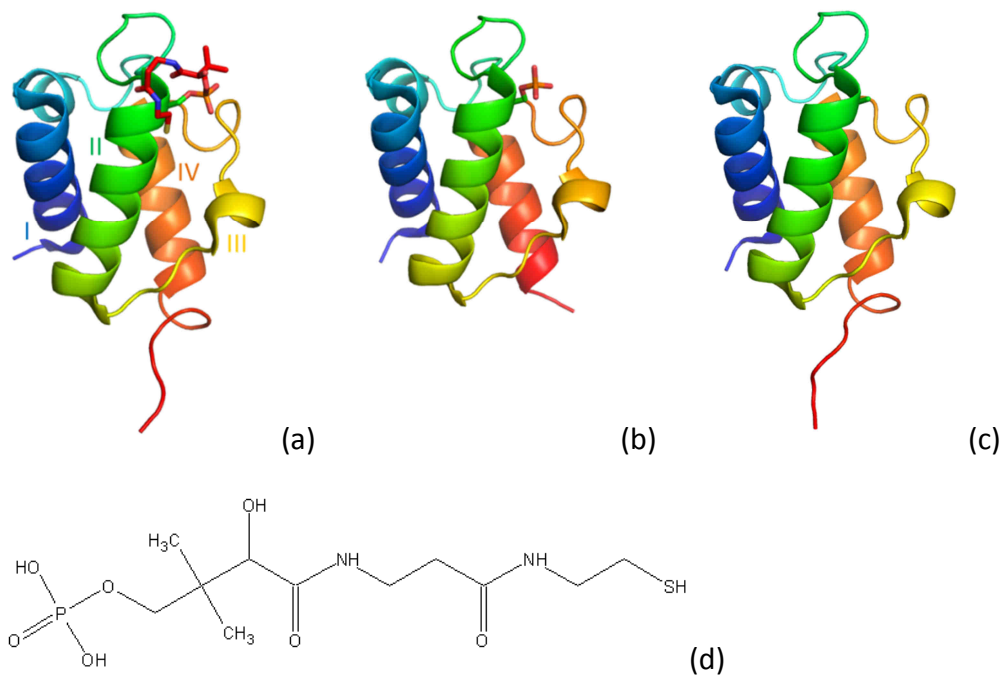


Abbildung 1.7 Röntgenkristallstrukturen des *Bacillus subtilis*-DltC und Struktur des 4'-Phosphopantethein-Cofaktor. (a) *holo*-DltC mit 4'-Phosphopantethein-Cofaktor (b) DltC mit Phosphoserin (c) *apo*-DltC S36A. Der Farbverlauf vom N- zum C-Terminus ist von blau nach rot dargestellt (Zimmermann, 2011). (d) 4'-Phosphopantethein-Cofaktor.

Analog der Struktur des *apo*-Dcp weisen *apo*- und *holo*-DltC die für die *carrier*-Proteine typische 4-*helix-bundle*-Struktur auf. Die ungefähr gleich langen Helices I (Asp2-Gln16), II (Asp35-Asp51) und IV (Thr66-Lys79) bilden dabei ein rechtsgängiges *helix-bundle* mit einer *up-up-down*-Topologie, während die deutlich kürzere Helix III (Pro55-Phe59) rechtwinklig zum Bündel angeordnet ist. In der Struktur des *Bacillus-subtilis*-DltC kann eine zusätzliche Helix innerhalb der *loop*-Region zwischen Helix I und II beobachtet werden, was ebenfalls für das *Lactobacillus-rhamnosus*-Dcp (Volkman et al., 2001) sowie für das *Bacillus-subtilis*-ACP (Parris et al., 2000) beschrieben wurde. Die geringe Größe der *carrier*-Proteine ermöglicht eine Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie. Einige ACPs als auch PCPs weisen eine geringe Dynamik auf (Xu et al., 2001; Ploskon et al., 2008; Johnson et al., 2006). Dazu kann auch die von VOLKMAN beschriebene Struktur des Dcp gezählt werden, während andere NMR-Strukturen von ACPs und PCPs ein Gleichgewicht zwischen zwei Konformeren belegen (Sharma et al., 2006; Holak et al., 1988; Kim and Prestegard, 1989; Weber et al., 2000; Evans et al., 2008; Nguyen et al., 2014; Zornetzer et al., 2006; Findlow et al., 2003; Wong et al., 2002; Li et al., 2003). Die dabei beobachteten Unterschiede beruhen hauptsächlich auf konformationellen Änderungen innerhalb der verschiedenen *loop*-Regionen. Der typische Faltungstyp bleibt davon jedoch unbeeinflusst. Des Weiteren wurde 2006 die Struktur des TycC3-PCP beschrieben, welches in Abhängigkeit vom Vorhandensein des Cofaktors drei Konformationen annehmen kann (Abbildung 1.8) (Koglin et al., 2006).

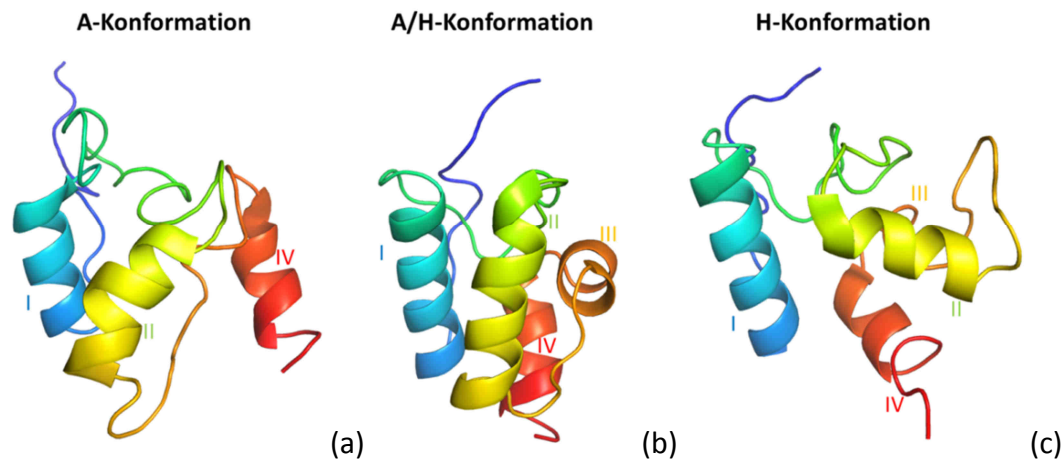


Abbildung 1.8 **Konformationen des Tyc3-PCPs.** Die A-, A/H- und H-Konformationen des Tyc3-PCP sind in *cartoon*-Darstellung gezeigt. Der Farbverlauf vom N- zum C-Terminus ist von blau nach rot dargestellt (Koglin et al., 2006).

Für die *holo*-Form wurden die H- und die A/H-Konformation beschrieben. Letztere kann auch von der *apo*-Form eingenommen werden. Für die *apo*-Form wurde neben der A/H- zusätzlich auch die A-Konformation beobachtet. Die A-Konformation stellt die am meisten flexible und ausgedehnte Form dar. Die kleine Helix III ist dabei nicht vorhanden und wird durch eine große *loop*-Region ersetzt. Die anderen Helices sind teilweise deutlich verkürzt. Interessanterweise kann durch Mutation des Serin45 der Cofaktor-Bindestelle zu einem Alanin die konformationelle Heterogenität aufgehoben werden, so dass nur noch die A-Form beobachtet werden kann. Die Orientierung der Helices in der A/H-Form ähnelt der A-Form, diese sind jedoch deutlich verlängert und weisen eine höhere Stabilität auf. Die expandierte *loop*-Region aus der A-Form bildet hier eine kurze Helix mit einer Windung. Diese wird beim Übergang von der A/H- zur H-Konformation erneut aufgelöst. Zudem kann eine Änderung der Orientierung der Helix IV sowie eine Neuorientierung der Cofaktor-tragenden Helix II beobachtet werden. Das Tyc3-PCP ist bis dato jedoch der einzige *carrier*, für den solche große konformationelle Änderungen beschrieben werden konnten. Im Vergleich der bakteriellen ACPs aus dem Typ-II-FAS wurden die Helices I und IV als stabiles Gerüst beschrieben, während die Helices II und III eine höhere Flexibilität aufweisen (Weissman and Muller, 2008). Zum einen erfolgt die Interaktion mit Bindungspartnern ausgehend von den Helices II und III. Des Weiteren sind sie an der Ausbildung einer hydrophoben Tasche für die Bindung der wachsenden Acylkette beteiligt (Ploskon et al., 2008). Der Hydrolyseschutz der wachsenden Acylkette stellt neben der Funktion als Träger eine weitere Bedeutung der ACPs dar. Erste NMR-spektroskopische Analysen zur Dynamik der DltC-Varianten in Lösung gaben Hinweise auf eine geringe Dynamik und eine konformationelle Homogenität (Zimmermann, 2011).

1.5. *carrier*-Protein-Interaktionen

Carrier-Proteine sind an einer Vielzahl von biochemischen Prozessen beteiligt. Neben dem Transfer von D-Ala durch das *carrier*-Protein DltC spielen PCPs und ACPs eine Rolle in der Synthese von nicht-ribosomalen Peptiden, Polyketiden sowie bei der Fettsäuresynthese.

Aufgrund der geringen Größe von 9~ kDa sowie der geringen konformationellen Änderungen ist die Interaktionsfläche ausgehend von den *carrier*-Proteinen limitiert. Dennoch sind diese Proteine in der Lage für den jeweiligen Schritt spezifischen Interaktionen mit den beteiligten Proteinen / Domänen einzugehen, so dass eine geordnete Synthese des entsprechenden Polymers ermöglicht werden kann. In den folgenden Kapitel werden die Interaktionen zwischen den *carrier* und den beteiligten Proteinen / Domänen näher beleuchtet.

1.5.1. DltA-DltC-Interaktion

In der Arbeitsgruppe konnte bereits eine Kristallstruktur des DltA-DltC-Komplexes gelöst werden (Abbildung 1.9) (Zimmermann, 2011). DltA weist hierbei die Transfer-Konformation und DltC die A/H-Konformation auf. Die Bindung von DltC an DltA erfolgt dabei an der großen N-terminalen Domäne des DltA. Obwohl *holo*-DltC für die Kristallisation verwendet wurde, kann keine Elektronendichte für den 4'-Phosphopantethein-Cofaktor beobachtet werden. Dabei ist unklar, ob dies auf eine Modifikation des *holo*-DltC (z.B. Hydrolyse des Cofaktors) oder auf eine hohe Flexibilität des Cofaktors zurückgeführt werden kann. Zudem beträgt der Abstand des Ser36 zum aktiven Zentrum des DltA ca. 40 Å, so dass diese Distanz nicht durch den Cofaktor (ca. 20 Å) überbrückt werden kann. Um eine Übertragung des aktivierten D-Ala von DltA auf DltC zu ermöglichen, wäre eine Reorientierung des DltC notwendig. Zu erwarten wäre hierbei eine Bindung von DltC in der Nähe des aktiven Zentrums von DltA, wie es bereits für PCP-A-Domänen-Komplexe beschrieben wurde (Kapitel 1.5.2.). Die Funktion des hier beschriebenen Komplexes ist somit unklar. Weitere Studien sind notwendig, um die Relevanz der hier beschriebenen Interaktion näher zu beleuchten.

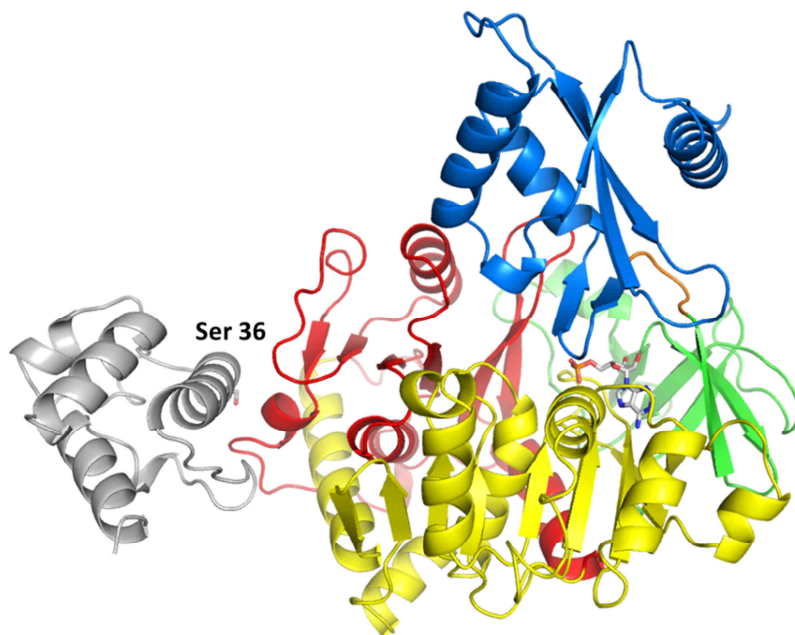


Abbildung 1.9 **Kristallstruktur des DltA-DltC Komplexes.** Die Farbgebung des DltA ist analog zu Abbildung 1.6, DltC ist grau dargestellt. Ser36 sowie AMP sind in *stick*-Darstellung gezeigt. Die Bindung von DltC erfolgt an der N-terminalen Domäne von DltA, weit entfernt vom aktiven Zentrum.

1.5.2. PCP-Interaktionen in NRPSs-Komplexen

Die nicht-ribosomalen Peptidsynthasen (NRPSs) sind große modulare Proteinkomplexe, die für die Synthese biologisch aktiver Substanzen verantwortlich sind. Die nicht-ribosomalen Peptide (NRPs) gehören zum Sekundärmetabolismus der Bakterien und Pilze und finden aufgrund der vielfältigen Eigenschaften unter anderem Anwendungen als Antibiotikum, Fungizid, Immunsuppressor, Zytostatikum und antivirale Mittel (Tabelle 1.2). Neben den proteinogenen Aminosäuren sind zudem nicht-proteinogene Aminosäuren sowie α -Hydroxysäuren am Aufbau der NRPs beteiligt (Strieker et al., 2010).

NRPs	Organismus	beteiligte Proteine	Funktion
Gramicidin S (Hori et al., 1989)	<i>Bacillus brevis</i>	GrsA, GrsB	Antibiotikum
Tyrocidin (Gocht and Marahiel, 1994)	<i>Bacillus brevis</i>	TycA, TycB, TycC	Antibiotikum
Daptomycin (Miao et al., 2005)	<i>Streptomyces roseosporus</i>	DptA, Dpt BC, DptD	Antibiotikum
Surfactin A (Peypoux et al., 1999)	<i>Bacillus subtilis</i>	SrfA, SrfB, SrfC	Antibiotikum, Zytostatikum, Fungizid
Enterobactin (Gehring et al., 1998)	<i>Escherichia coli</i>	EntA, EntB, EntC, EntD, EntE, EntF	Siderophor
Mycobactin (McMahon et al., 2012)	<i>Mycobakterium tuberculosis</i>	MbtA, MbtB, MbtC, MbtD, MbtE, MbtF	Siderophor
Bacillibactin (May et al., 2002)	<i>Bacillus subtilis</i>	DhbB, DhbE, DhbF	Siderophor
Cyclosporin (Bushley et al., 2013)	<i>Tolypocladium inflatum</i>	SimA	Immunsuppressor

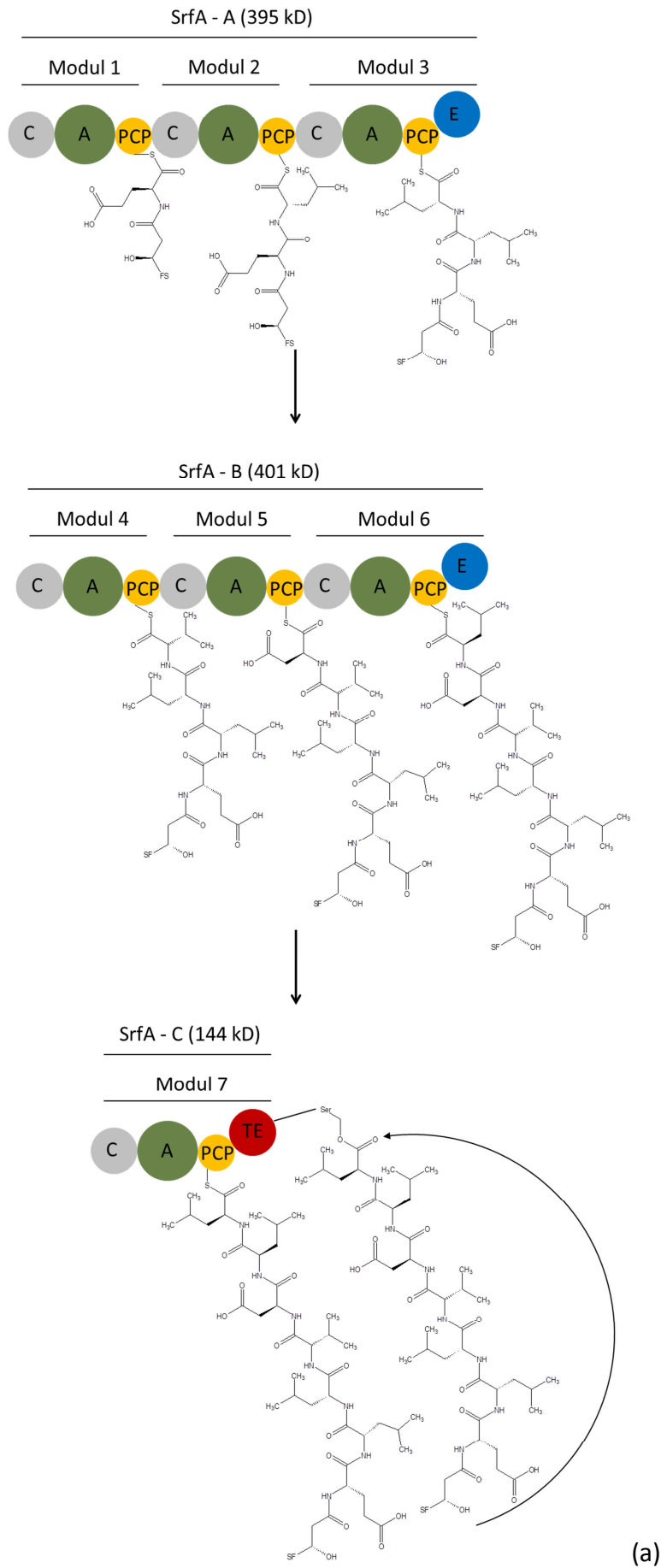
Tabelle 1.2 Nicht-ribosomale Peptide und ihre Funktionen.

Die modularen NRPS-Enzymkomplexe sind verwandt mit den Polyketid-(PKS) sowie Fettsäure-(FAS)-Megasyntase Komplexen, mit dem Unterschied, dass für die Synthese der NRPs Aminosäuren und α -Hydroxysäuren verwendet werden, während bei den PKSs und FASs Acyl-Coenzym A-Monomere als Substrate zum Einsatz kommen (Weissman and Muller, 2008). Es können zwei NRPS-Typen unterschieden werden. Für die Synthese der nicht-ribosomalen Peptide sind vier Domänen notwendig, die entweder als eigenständige Proteine (Typ II NRPS) oder als Domänen eines großen Multidomänen-Proteins (Typ-I-NRPS) vorliegen können. Die Adenylierungs-(A)-Domäne ist für die Aktivierung der Aminosäure und damit einhergehend auch für die Substratspezifität verantwortlich. Analog zu den Proteinen des *dlt*-Operons wird das aktivierte Substrat anschließend auf das *peptidyl-carrier*-Protein (PCP) übertragen. Die Kondensations-(C)-Domäne katalysiert die Ausbildung der Säureamidbindung zwischen zwei aktivierten Substraten. Durch die Thioesterase-(TE)-Domäne wird schließlich das Produkt durch Hydrolyse oder Zyklisierung freigesetzt. Für eine zusätzliche Produktdiversität sind zusätzliche Domänen oder Proteine mit spezialisierten enzymatischen Aktivitäten wie Epimerasen, N- und C-Methyltransferasen sowie Oxidasen verantwortlich (Weissman and Muller, 2008). Im Gegensatz dazu konnte innerhalb des *dlt*-Operons kein Protein mit vergleichbaren Aktivitäten beobachtet werden. Gleichwohl der

spezifischen Substratselektion durch die A-Domänen können PCPs mit falschen Substraten beladen werden. Thioesterasen von Typ II hydrolysieren die Thioesterbindung zwischen dem 4'-Phosphopantethein-Cofaktor und dem Substrat und dienen damit der Generierung von freiem PCP. Bioinformatische Analysen ermöglichen bereits erste Vorhersagen der Substratspezifität der A-Domänen aus der Primärsequenz (Rausch et al., 2005). Die Struktur und Funktion von A- und *carrier*-Domänen gleicht denen von DltA und DltC und wurde bereits in Kapitel 1.3 und Kapitel 1.4 beschrieben.

Die Röntgenkristallstruktur des SrfA-C-Moduls aus dem Surfactin-Biosyntheseweg wurde bereits beschrieben (Tanovic et al., 2008). Dieses Modul ist für die Addition eines L-Leucin an das bereits bestehende Hexapeptid sowie die finale Zyklisierung und Freisetzung des Lipoheptapeptides verantwortlich. Die C-Domäne sowie die große N-terminale A-Domäne bilden hierbei eine Plattform für die Interaktion mit der PCP- sowie der TE-Domäne. Die Konformation der A-Domäne ist anders als die bereits beschriebenen offenen, Adenylierungs- oder Transfer-Konformation. Der kleine C-terminale Bereich der A-Domäne bildet nur wenige Kontakte zum A-C-Komplex aus. Durch die strukturelle Flexibilität behält die A-Domäne auch im A-C-Komplex die katalytische Aktivität, da im Verlauf des Reaktionszyklus die C-terminale Domäne unterschiedliche Orientierungen im Vergleich zur N-terminalen Domäne einnehmen muss. Um einen Fortschritt der Reaktion zu ermöglichen, muss ein PCP mit der A-Domäne, den *upstream* und *downstream* liegenden C-Domänen und der TE Domäne interagieren können. Die Einhaltung der Reihenfolge der Kondensationsschritte ist für die Entstehung eines korrekten Produktes unerlässlich. In der 4'-Phosphopantethein-freien Ser1003Ala-Variante des SrfA-C Moduls (Abbildung 1.10) liegt das PCP im Zentrum des Komplexes. Die Abstände zwischen den katalytischen Zentren sind dabei teilweise zu groß, so dass sie nicht von dem ca. 20 Å langen 4'-Phosphopantethein-Arm überspannt werden könnten. Während der Abstand von ca. 18 Å zwischen dem Alanin1003 des PCP und dem aktiven Zentrum der C-Domäne eine Katalyse ermöglichen würden, ist die Entfernung zum aktiven Zentrum der A-Domäne und der TE-Domäne mit 42 Å und 44 Å zu weit. Eine konformationelle Reorientierung erscheint demnach notwendig.

In allen bekannten Strukturen von PCPs und ihren Interaktionspartnern liegt das PCP in der A/H-Konformation vor (Koglin et al., 2006). Es gibt demnach keine Hinweise auf signifikante konformationelle Änderungen des PCP, um eine Interaktion mit den verschiedenen katalytischen Zentren eingehen zu können. Für die PCP-C-Domänen-Interaktion stellt die Cofaktor-tragende Helix II ein wichtiges Motiv dar (Tanovic et al., 2008). Diese Region ist zudem auch an der Interaktion zwischen dem PCP und der A-Domäne (Sundlov et al., 2012; Mitchell et al., 2012) sowie zwischen dem PCP und der TE-Domäne beteiligt (Liu et al., 2011). Nach Beginn dieser Dissertation wurden zwei Kristallstrukturen der PCP-A-Domänen (EntB-EntE sowie PA1221 A-PCP) gelöst. Die Kristallisation dieser Komplexe erfolgte in Anwesenheit eines Vinylsulfonamid-AMP-Inhibitors. Dadurch kommt es zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem Inhibitor und dem 4'-Phosphopantethein, wodurch dieses im aktiven Zentrum fixiert wird (Sundlov et al., 2012; Mitchell et al., 2012).



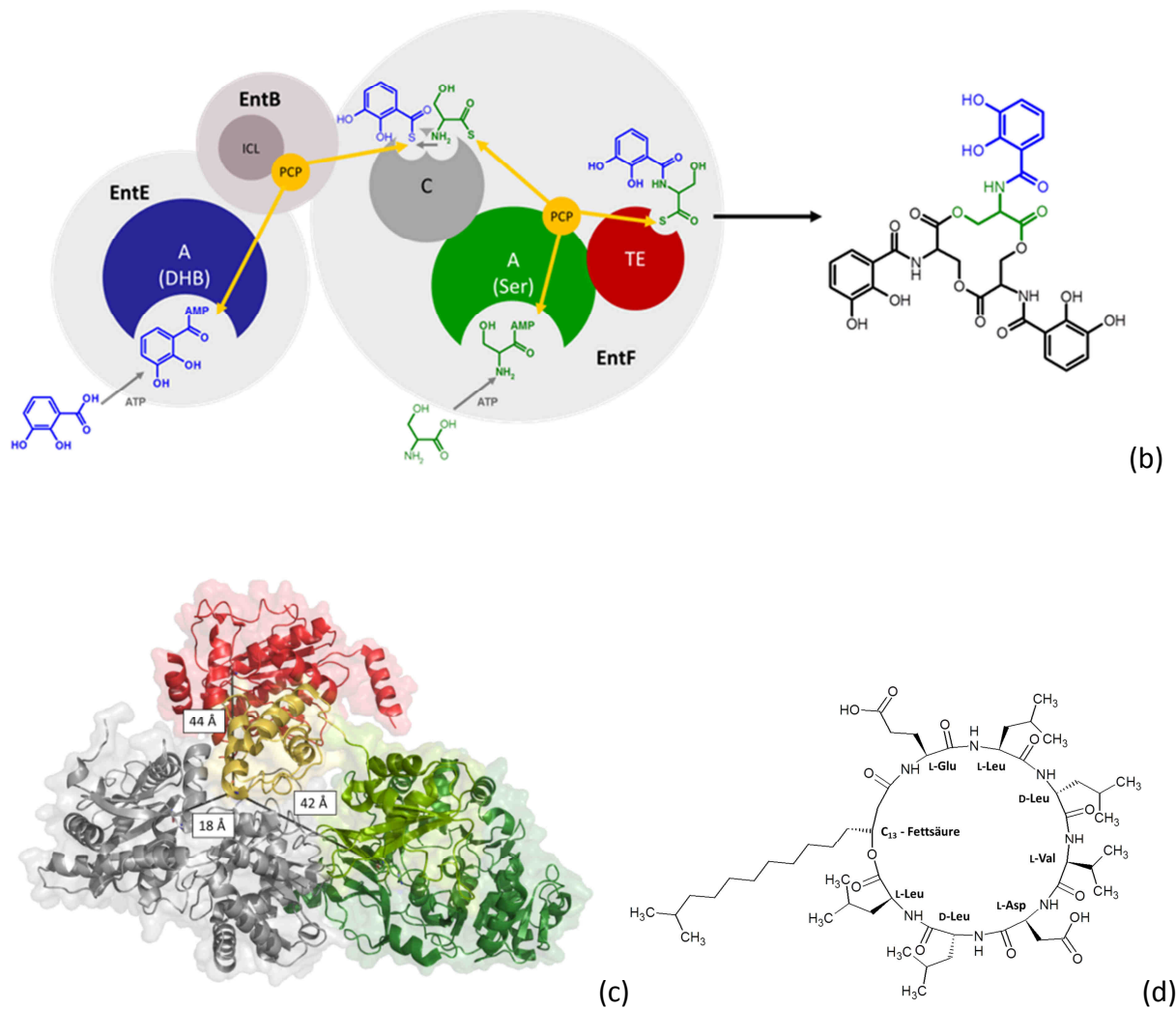


Abbildung 1.10 PCP-Interaktionen innerhalb der NRPS und synthetisierte nicht-ribosomale Peptide. **(a) Schematische Darstellung des Surfactin Biosyntheseweges.** Für die Synthese des Surfactins werden drei Multidomänen-Proteine mit mehreren Modulen benötigt. Jedes Modul besteht mindestens aus einer A-, PCP- und C-Domäne und ist für die Addition eines Substrat-Monomers verantwortlich (Tanovic et al., 2008). **(b) Schematische Darstellung des Enterobactin Biosyntheseweges.** Die EntE-A-Domäne und das EntB-PCP sind eigenständige Proteine, während das EntF eine A-Domäne, ein PCP und eine TE-Domäne als Teil einer Polypeptidkette beherbergt. Modifiziert nach (Pfennig and Stubbs, 2012). **(c) SrfA-C Modul.** Der N-terminale Bereich der A-Domäne ist dunkelgrün und die C-terminale Region hellgrün dargestellt. Die C-Domäne ist grau, die TE-Domäne rot und das PCP S1003A gelb koloriert. Die C α -C α Abstände zwischen Ala1003 und den Aminosäuren aus den katalytischen Zentren (Arg859 der A-, His146 der C- sowie Ser1120 der TE Domäne) sind in Å angegeben, pdb-Code 2VSQ (Tanovic et al., 2008). **(d) Strukturformel des Surfactin.**

1.5.3. ACP-Interaktionen in Fettsäure- und Polyketid-Synthase-Komplexen

Polyketid-Synthasen (PKS) katalysieren die Synthese von Makroliden, Polyethern, Polyenen sowie aromatischen polycyclischen Verbindungen. Polyketide sind somit eine strukturell diverse Klasse von Naturstoffen. Darunter zählen z.B. pflanzliche Flavonoide und Aflatoxine, von Pilzen produziert. Andere Polyketide haben aufgrund von antibakteriellen, fungiziden, immunsuppressiven sowie tumorsuppressiven Eigenschaften ein hohes pharmakologisches Potential. Der Fettsäure-Synthase Komplex (FAS, *fatty acid synthetases*) ist für die

Produktion von gesättigten Fettsäuren verantwortlich. Während innerhalb der Fettsäuresynthese alle Zyklen der Kettenverlängerung von einem Komplex durchgeführt werden, wird bei den PKS, analog zu den NRPSs, jeder Schritt der Kettenverlängerung durch ein unterschiedliches Modul katalysiert. Die Anzahl der vorhandenen Module ist dabei analog zur Anzahl eingesetzter Substrat-Monomere. Bei den FAS- und den PKS-Komplexen können zwei Varianten unterschieden werden. Die Typ-I-FAS kommen im Cytosol von Eukaryoten sowie in einigen Bakterien vor. Die PKS vom Typ I können dabei in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und einigen Meerestieren gefunden werden. Hier liegen alle beteiligten katalytischen Domänen für die Kondensations- und Reduktionsschritte auf ein bis zwei Polypeptidketten innerhalb der multimodularen Megasyntase-Komplexe. Die Hauptprodukte der FAS sind dabei Palmitat oder Stearat (Smith and Tsai, 2007). Im FAS und PKS vom Typ II liegen alle katalytischen Domänen als eigenständige Proteine vor. Typ-II-FAS ist dabei in Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien zu finden. PKS vom Typ II kommen in Prokaryoten vor (Smith and Tsai, 2007).

Die ACPs sind ein zentraler Bestandteil der Fettsäure- und Polyketid- Synthase-Komplexe und für den Transport der wachsenden Acylkette zwischen den beteiligten aktiven Zentren verantwortlich. Jedes katalytisch aktive Zentrum erkennt die spezifische C β -Modifikation des am ACP gebundenen Acylrestes, wodurch eine gerichtete Synthese der Fettsäure erfolgen kann.

ACPs sind kleine saure Proteine/Domänen mit einer Größe von ~ 9 kD. Gleichwohl der geringen Größe und der damit verbundenen kleinen potentiellen Interaktionsfläche sind diese in der Lage, eine Vielzahl spezifischer Interaktionen mit den beteiligten Proteinen oder Domänen innerhalb der FAS- oder PKS-Komplexe einzugehen. Dafür wurden zwei Theorien beschrieben. Im Modell 1 erfolgt die Erkennung des ACPs anhand des am Cofaktor gebundenen Substrates. Dabei werden nur wenige Kontakte mit dem ACP-Protein selbst ausgebildet (Weissman and Muller, 2008). Im Modell 2 hingegen werden subtile konformationelle Änderungen nach Bindung des entsprechenden Substrates für die spezifische Protein-Protein-Interaktion mit den Reaktionspartnern verantwortlich gemacht. Durch Bindung des wachsenden Produktes im Inneren des ACPs wird der reaktive Thioester zwischen der Sulfhydrylgruppe des Cofaktors und dem Acylrest vor Hydrolyse geschützt. Dies erfolgt durch die Ausbildung einer hydrophoben Tasche zwischen den Helices II und III, welche Platz für bis zu 10 Kohlenstoffatome bietet (Rock and Garwin, 1979). Die Bindung der wachsenden Acylkette in der hydrophoben Tasche führt dabei zu konformationellen Änderungen im ACP (Gupta et al., 2009), und die Interaktion des ACP mit der entsprechenden katalytischen Einheit führt erneut zu konformationellen Änderungen, die das Substrat ins aktive Zentrum entlassen (Roujeinikova et al., 2002). Interaktionen der katalytischen Domäne mit der Acylkette sind daher nur eingeschränkt möglich. Es ist bis dato keine PCP-Struktur bekannt, in der die wachsende Peptidkette in einer Tasche des PCP verborgen ist.

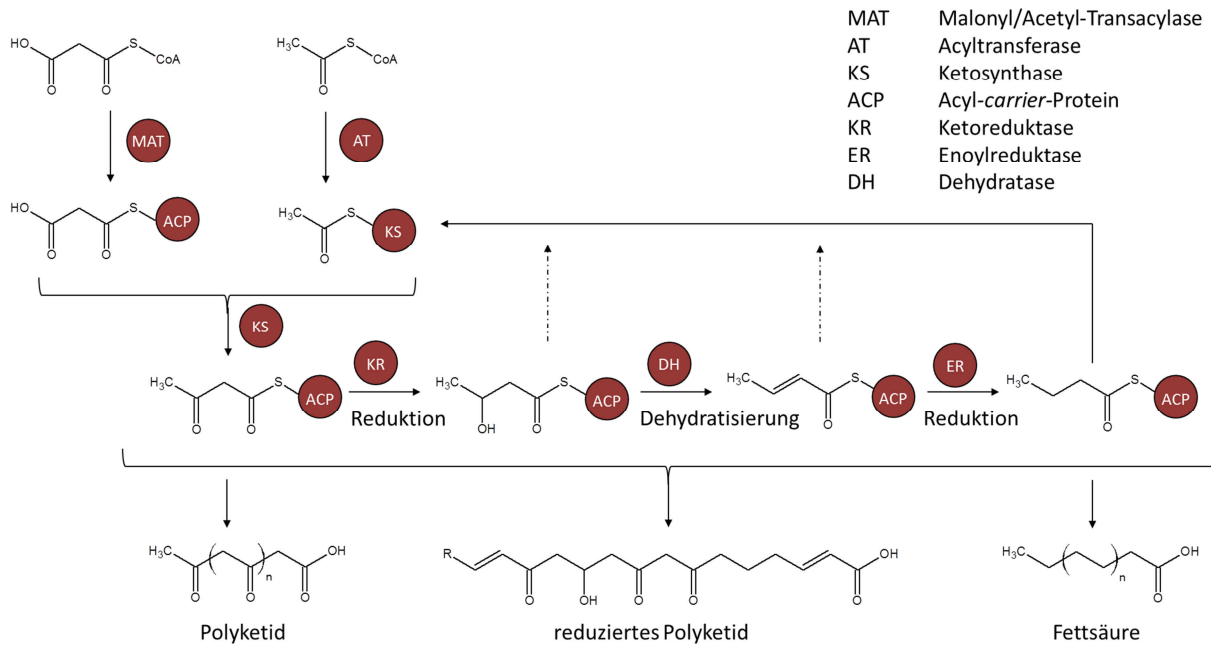


Abbildung 1.11 Allgemeines PKS- und FAS-Reaktionsschema. Im ersten Schritt überträgt MAT die Acetyl- bzw. Malonyl-Gruppe des Acetyl-CoA bzw. Malonyl-CoA auf die freie Thiolgruppe des ACP-PPant-Cofaktors. Die jeweilige Acylgruppe wird durch die AT auf die freie Thiolgruppe der KS übertragen. Die KS katalysiert folgend die Kondensation zwischen der Acyl- und der ACP-gebundenem Acetyl- bzw. Malonyl-Gruppe. Weitere Modifikationen am C β erfolgen anschließend durch die KR, die DH und die ER. Modifiziert nach (Smith and Tsai, 2007).

1.6. Zielstellung

Eine Erhöhung der D-Alanylierung der Teichonsäuren, katalysiert durch die Proteine des *dlt*-Operons, trägt zu einer gesteigerten Resistenz von gram-positiven Bakterien gegenüber Antibiotika bei. Die Inhibierung der Dlt-Proteine stellt somit ein wichtiges Ziel zur Bekämpfung von Infektionen, verursacht durch gram-positive Bakterien, dar. 2005 konnte bereits ein wirkungsvoller DltA-Inhibitor (5'-O-[N-(D-alanyl)-sulfomoyl]-Adenosin), welcher ein Adenylat-Mimetikum darstellt, beschrieben werden (May et al., 2005). In Kombination mit dem Antibiotikum Vancomycin wurde dabei eine deutliche Suppression des Wachstums von *Bacillus subtilis* beobachtet (May et al., 2005). Die Aufklärung der Funktion der Proteine des *dlt*-Operons sowie des vollständigen Mechanismus der Teichonsäure-Modifikation legen die Grundbausteine für die weitere Entwicklung neuer Inhibitoren gegen gram-positive Bakterien. Der erste Schritt im D-Ala-Modifikationsweg wird durch die Proteine DltA und DltC katalysiert. Eine detaillierte Analyse der DltA-DltC-Interaktion sowie die Charakterisierung der DltA-katalysierten D-Alanylierung des DltC sind somit unerlässlich.

Zu Beginn der Arbeit lagen keine strukturellen Informationen über eine produktive Interaktion zwischen DltA und DltC bzw. verwandten Proteinen vor. Aufgrund der Verwandtschaft des DltC zu den PCPs und ACPs sowie des DltA zu den Adenylierungs-Domänen der nicht-ribosomalen Peptidsynthasen, der Leuchtkäfer-Luziferase sowie zu den Acyl- und Acetyl-CoA-Synthasen ergibt sich hierbei zusätzlich ein geeignetes Modellsystem, da die Proteine der NRPSs häufig Teil eines großen kovalent assoziierten Multiprotein-

Komplexes sind. In der Dissertation von Stephan Zimmermann (2011) wurde bereits eine Struktur des DltA-DltC-Komplexes beschrieben, in der die Bindung des DltC weit entfernt vom aktiven Zentrum erfolgt. Die Funktion dieses Komplexes ist bis dato jedoch unklar und soll innerhalb dieser Arbeit näher charakterisiert werden. Die Aufklärung der produktiven Interaktion zwischen DltA und DltC, der Relevanz der bereits beschriebenen DltA-DltC-Interaktion sowie der Übertragung des D-Ala stellen das Hauptziel dieser Arbeit da.

DltA konnte dabei, analog zu den Kristallstrukturen des isolierten DltA aus *Bacillus subtilis* (Yonus et al., 2008), in der Transfer-Konformation beobachtet werden. Die Untersuchung des Einflusses der DltA-Konformation auf die Interaktion mit DltC stellt somit einen weiteren interessanten Aspekt dieser Arbeit dar.

Die Kristallstruktur von DltA aus *Bacillus subtilis* in der Transfer-Konformation wurde bereits mit einer Auflösung von 2,28 Å beschrieben (Yonus et al., 2008). Während für *carrier*-Proteine eine Flexibilität durch NMR-Experimente in Lösung bestätigt wurde, wurden für A-Domänen konformationelle Untersuchungen bis dato nur durch Kristallisation in Anwesenheit verschiedener Substrate, Intermediate und Produkte durchgeführt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Flexibilität von DltA in Lösung.

Unter Verwendung aller erzielten Ergebnisse soll ein geeignetes Modell der DltA-DltC-Interaktion und des DltA-Reaktionsmechanismus erstellt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 0.1 (Anhang) zusammengefasst.

2.1.2. Bakterienstämme

In der Arbeit wurden folgende chemisch-kompetente Stämme von *Escherichia coli* verwendet:

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

Tabelle 2.1 **Verwendete *E. coli* Stämme.**

Für molekularbiologische Arbeiten wurde ausschließlich der Stamm *E. coli* XL1 blue verwendet. Für die Expression der Gene zur Herstellung rekombinanter Proteine wurde *E. coli* BL21 (DE3) verwendet.

2.1.3. Plasmide

Die Plasmide pQE60 DltC, pQE60 DltC S36A, pQE60 DltA, pREP4 bzw. pREP4 Sfp wurden freundlicherweise von Dr. Stephan Zimmermann, Dr. Constanze Breithaupt und Prof. Dr. Henning Mootz zur Verfügung gestellt. pREP4 Sfp enthält zusätzlich zum *lacI* das Gen für die Phosphopantethein-Transferase Sfp. Die Selektion der pQE60 bzw. pREP4-Vektoren erfolgte mittels Ampicillin bzw. Kanamycin. Die Genexpression steht in beiden Vektoren unter Kontrolle des *lac*-Operons. Der pQE60-Vektor weist zusätzlich die Sequenz für einen C-terminalen (His)₆-tag auf.

2.2. Molekulabiologische Methoden

2.2.1. Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation der Plasmid-DNA aus einer Kultur von *E. coli*-XL1-blue erfolgte mittels alkalischer Lyse, Präzipitation chromosomaler DNA, Proteinen und Zellfragmenten sowie Abtrennung dieser von der löslichen Plasmid-DNA nach Protokoll eines Plasmid-Mini-Prep-Kits von Thermo Fischer, mit dem Unterschied, dass die Elution mit 50 µl dd H₂O erfolgte.

2.2.2. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Absorption wurde bei 260 nm an dem Spektrophotometer V-630 (Jasco) bestimmt und die Konzentration anhand der Formel 2.1 ermittelt:

$$c \left[\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right] = A_{260} \cdot v \cdot \frac{1}{k}$$

Formel 2.1 **Berechnung der DNA-Konzentration.** v = Verdünnungsfaktor, k = 20 (Doppelstrang-DNA)

2.2.3. Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Insertion von Mutationen erfolgte mittels PCR nach der *quick-change*-Methode (Stratagene). Die benötigten Primer wurden von Metabion synthetisiert und sind zusammen mit der verwendeten *annealing*-Temperatur in Tabelle 2.2 zusammengefasst. Es wurde, nach dem Protokoll von NEB, 10 ng DNA im 50 µl-Reaktionsansatz unter Verwendung des HF-Puffers (NEB) eingesetzt. Als Polymerase wurde die Phusion (NEB) verwendet und die PCR mit 30 Zyklen unter Verwendung des unten aufgeführten Temperaturprogramms durchgeführt. Der Verdau der methylierten DNA mittels DpnI (NEB) erfolgte nach dem Protokoll von NEB. Nach Transformation in chemisch kompetente Zellen von *E. coli* X11 blue wurden diese auf einer selektiven Agar-LB-Platte kultiviert.

Denaturierung	5 min	98°C
Denaturierung	30 s	98°C
<i>annealing</i>	30 s	56°C-73°C
Verlängerung	2,5 min	72°C
Finale Verlängerung	7 min	72°C

Mutation	<i>forward</i> -Primer	<i>annealing</i> Temperatur
DltA E125R/E128R	5'CAGACAGTTTCTGCGGAACGTCTGCTGCGTAACGAAGGCGGCTC3'	73°C
DltA E125R/E128W	5'CAGACAGTTTCTGCGGAACGTCTGCTGTGGAACGAAGGCGGCTC3'	73°C
DltA E125C	5'CAGTTTCTGCGGAATGCCGTGCTGGAAAACG3'	56°C
DltC S36C	5'GAAGGTTTGCTTGATTGCTTTGGAACAGTAGAATTGC3'	56°C
DltC S36A	5'TTGCTTGATGCTTTTGGAAACAGT3'	65°C
DltC N48A	5'TTGCGATTGAAGCCCCTTTGATATTTAG3'	57°C
DltC Q5A D9A	5'GAAATTAACCATGGATTTAAAGCGGAGGTATTAGCGGTTTTAGCA GAGGTTTGCC3'	70°C

Tabelle 2.2 **Primer und *annealing*-Temperaturen für die ortsgerichtete Mutagenese.**

2.2.4. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde von der Firma GATC durchgeführt.

2.3. Mikrobiologische Methoden

2.3.1. Nährmedien und Antibiotika

2.3.1.1. Herstellung von Flüssigmedien

LB (*Luria Bertoni*)-Medium (Bertani, 1951) und M9 Medium (Harwood and S.M.Cutting, 1990) wurden nach folgendem Rezept hergestellt.

LB-Medium (1 l)

5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, 10 g NaCl

Das LB-Medium wurde anschließend für 20 min bei 121°C autoklaviert.

M9-Minimalmedium (1 l)

M9: 8,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3,4 g KH_2PO_4 , 0,58 g NaCl, 1,1 g $^{14}\text{NH}_4\text{Cl}/^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, ad 975 ml ddH₂O

TS2-Lösung: 10 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 30 mg H_3BO_3 , 20 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 2 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 1 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 90 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 2 mg Na_2SeO_3 , ad 100 ml ddH₂O

M9, 1 M MgSO_4 und 0,1 M CaCl_2 wurden bei 121°C für 20 min autoklaviert. TS2, 10 mM Fe(III)-citrat sowie 20% Glukose wurden steril filtriert. Unter sterilen Bedingungen wurden anschließend 975 ml M9 zusammen mit 2 ml 1 M MgSO_4 , 1 ml 0,1 M CaCl_2 , 1 ml 10 mM Fe(III)-citrat, 2 ml TS2 und 20 ml 20% Glukose gemischt.

2.3.1.2. Herstellung von LB-Agarplatten

Zum LB-Medium wurde Agar bis zu einer Konzentration von 15 g/l zugesetzt und für 20 min bei 121°C autoklaviert. Die Zugabe von Antibiotika erfolgte nach dem Abkühlen. Pro Petrischale wurden 20 ml Medium verwendet.

2.3.1.3. Antibiotika

Die Antibiotika wurden in ddH₂O gelöst und steril filtriert. Die Zugabe von Antibiotika zum entsprechenden Medium erfolgte nach dem Autoklavieren.

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml

Tabelle 2.3 Konzentration der verwendeten Antibiotika.

2.3.2. Herstellung chemisch kompetenter Zellen von *E. coli*

50 ml eines selektiven LB-Mediums wurden mit 50 µl einer 4 ml Vorkultur inokuliert und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 wurden die Zellen für 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend 15 min bei 6000g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml autoklavierter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert, für 5 min auf Eis inkubiert und erneut für 15 min bei 6000g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das erhaltene Pellet in 1 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach Inkubation für 2 h auf Eis wurde 1 ml autoklaviertes 50% Glycerin zugesetzt. Die erhaltene Suspension wurde aliquotiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

2.3.3. Transformation in chemisch kompetente Zellen von *E. coli*

100 µl chemisch kompetente Zellen von *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 100 ng Plasmid bzw. des vollständigen Reaktionsansatzes nach DpnI-Verdau erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten auf Eis. Der anschließende Hitzeschock wurde für 90 s bei 42°C durchgeführt. Nach einer Abkühlphase von 1 min wurden 800 µl LB-Medium zugesetzt und der Ansatz für 45 min bei 37°C bei 600 rpm inkubiert. Bei Einsatz von Plasmid-DNA wurden 200 µl Bakteriensuspension und bei Verwendung des Ansatzes nach DpnI-Verdau die komplette Suspension auf einer selektiven LB-Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.4. Herstellung von Glycerinkulturen

Zum Anlegen einer Glycerinkultur wurden 810 µl Bakteriensuspension in der logarithmischen Wachstumsphase in 190 µl 80%igem Glycerin (15% Glycerin Endkonzentration) suspendiert. Nach Homogenisieren wurde die Kultur in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Folgende Glycerinkulturen wurden hergestellt:

pQE60 DltA (Wildtyp oder DltA E125C, DltA E125R/E128R, DltA E125R/E128W) + pREP4 in
E. coli BL21 (DE3)

pQE60 DltC (S36A, S36C, Q5A/D9A/S36A/N48A) + pREP4 in *E. coli* BL21 (DE3)

pQE60 DltC (Wildtyp oder Q5A/D9A/N48A) + pREP4 Sfp in *E. coli* BL21 (DE3)

2.3.5. Expression von *dltA* und *dltC* in *E. coli* in LB-Medium

Die Expression von *dltA* und *dltC* erfolgte unter den gleichen Bedingungen. Für die Vorkultur wurden 50 ml selektives LB-Medium mit Zellen aus der Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Daraufhin wurden 1,5 l selektives LB-Medium im Verhältnis 1:200 mit den Zellen aus der Vorkultur inokuliert und ebenfalls bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Induktion mit 0,5 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ von 1-2 erfolgte die Expression für 16 h bei 30°C. Die Zellen wurden bei 6000g, 4°C für 30 min pelletiert, in IMAC- (*immobilized metal ion affinity chromatography*)-A-Puffer resuspendiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -20°C gelagert. DltC wurde zusammen mit dem Gen der 4'-

Phosphopantethein-Transferase Sfp co-exprimiert, um eine vollständige Beladung mit Cofaktor zu erhalten.

2.3.6. Expression von *dltA* und *dltC* in *E.coli* mit M9-Minimalmedium

Für die erste Vorkultur wurden 5 ml selektives LB-Medium mit Zellen aus der Glycerinkultur inokuliert. Nach 12 h Inkubation unter Schütteln bei 37°C wurde eine 50 ml M9-Medium-Vorkultur im Verhältnis 1:200 mit Zellen aus der ersten Vorkultur angeimpft und ebenfalls für 12 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 1,5 l selektives ¹⁵N-M9-Medium wurde im Verhältnis 1:200 mit den Zellen aus der zweiten Vorkultur inokuliert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5-1 erfolgte die Induktion der Expression mit 0,5 mM IPTG. Nach 24 h Expression bei 25°C wurden die Zellen bei 6000g, 4°C für 30 min pelletiert, in IMAC-Puffer A resuspendiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -20°C gelagert.

2.4. Reinigung löslicher Proteine

2.4.1. Aufschluss von *E. coli*-Zellen

Für den Zellaufschluss wurden die Zellen im IMAC-Puffer A mit 1 mg Lysozym pro 1 g Zellen versetzt und unter mehrmaligem Schwenken für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss mit 4 x 600 bar mittels Hochdruckhomogenisation am APV (Gaulin). Das Lysat wurde anschließend durch Zentrifugation bei 75600g und 4°C für 30 min geklärt.

2.4.2. Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC)

Der erste Reinigungsschritt erfolgte mittels IMAC unter Verwendung folgender Puffer:

IMAC-Puffer A: 50 mM HEPES/NaOH, 300 mM NaCl, pH 7,8

IMAC-Puffer B: 50 mM HEPES/NaOH, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,8

Eine mit IMAC-Puffer A äquilibrierte 5 ml His-Trap-HP Säule (GE Healthcare) wurde unter einem Fluss von 1 ml/min (bei 8°C oder Raumtemperatur) mit Zellysate beladen. Das Waschen und Eluieren erfolgten durch einen linearen Gradienten von 0 bis 100% IMAC-Puffer B über 110 ml. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf ihre Reinheit analysiert und vereinigt.

2.4.3. Größenausschlusschromatographie

Zur Abtrennung von Proteinverunreinigungen und Aggregaten wurde als zweiter Reinigungsschritt eine Größenausschlusschromatographie (SEC, *size exclusion chromatography*) durchgeführt. Dafür wurden die Proteine mittels Amicon (MWCO von 10 kDa für DltA und 3 kDa für DltC) (Merck Millipore, Schwalbach) konzentriert. Nach Zentrifugation bei 20000g, 4°C für 30 min wurden die Proben mit einem Fluss von 0,8 ml/min auf die in SEC-Puffer äquilibrierte Säule appliziert und isokratisch eluiert. Für DltC

sowie für DltA wurden jeweils die Säulen S75 16/60, S200 16/60, S75 26/60 oder S200 26/60 verwendet.

SEC-Puffer: 50 mM HEPES/NaOH, 150 mM NaCl, pH 7,8

Die Fraktionen wurden anhand einer SDS-PAGE auf ihre Reinheit analysiert. Die entsprechend vereinigten Fraktionen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -20°C gelagert.

2.4.4. Herstellung der großen Domäne von DltA

Die große Domäne von DltA wurde durch einen tryptischen Verdau ausgehend vom Volllänge-Protein gewonnen. DltA mit einer Konzentration von 3 mg/ml wurde für 24 h bei 25°C mit Trypsin (16 µg/ml) in 50 mM HEPES/NaOH, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7,8 inkubiert. Die Protease sowie die gespaltenen Fragmente wurden anschließend mittels SEC (S200 16/60) entfernt.

2.5. Proteinbiochemische und biophysikalische Methoden

2.5.1. UV/Vis-Spektroskopie

Die Konzentration einer in 6 M Guanidinhydrochlorid denaturierten Proteinlösung wurde durch Messung der Extinktion bei 280 nm am UltraSpec 3300 pro (Amersham Biosciences) unter Anwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes (Formel 2.2) bestimmt. Die Extinktionskoeffizienten wurde nach PACE berechnet (Pace et al., 1995). Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

$$A_{280} = c \cdot \epsilon \cdot d$$

Formel 2.2 **Lambert-Beersches-Gesetz.** A_{280} = Absorption bei 280 nm, c = Konzentration in (mol l^{-1}), ϵ = Extinktionskoeffizient in ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), d = Schichtdicke der Küvette in (cm).

Folgende Extinktionskoeffizienten wurden zur Ermittlung der Konzentration verwendet:

Protein	Molekulargewicht (Da)	ϵ_{280} ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
<i>holo</i> -DltC	10415	5690
<i>apo</i> -DltC S36A	10059	5690
<i>apo</i> -DltC S36C	10091	5690
<i>holo</i> -DltC A3 (Q5A/D9A/N48A)	9931	5690
<i>apo</i> -DltC S36A A3 (Q5A/D9A/N48A)	9915	5690
DltA	56874	48930
DltA RR (E125R/E128R)	56929	48930
DltA RW (E125R/E128W)	56959	54620
DltA E125C	56849	48930
DltA _N	44036	41250

Tabelle 2.4 **Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine.** *holo*-DltC: mit 4'-Phosphopantethein-Cofaktor, *apo*-DltC: ohne 4'-Phosphopantethein-Cofaktor

2.5.2. CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden am J-810 CD-Spektrometer (Jasco) mit dem Temperaturregler PTC-4235 (Jasco) bei 25°C aufgenommen. Die Proteine wurden für mindestens 12 h gegen den entsprechenden Puffer dialysiert und vor der Messung für 30 min bei 20000g und 4°C zentrifugiert. Für fern-UV-CD-Spektren wurde eine Küvette mit einer Schichtdicke von 0,1 mm verwendet und jeweils 60 Spektren mit einer Geschwindigkeit von 50 nm/min akkumuliert. Für nah-UV-CD-Spektren wurde eine Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet und es wurden jeweils 20 Spektren mit einer Geschwindigkeit von 10 nm/min akkumuliert. Die Konzentration der eingesetzten Proteinlösungen betrug 1 mg/ml. Als Referenz wurde das CD-Spektrum des jeweils verwendeten Puffers gemessen und von dem Proteinspektrum subtrahiert. Ausgehend von Formel 2.3 wurde für die fern-UV-CD-Spektren die molare Elliptizität pro Aminosäure und für die nah-UV-CD-Spektren die molare Elliptizität berechnet.

$$[\theta]_{AS} = \frac{\theta_{(\lambda)}}{10 \cdot d \cdot c \cdot N_A} \quad [\theta] = \frac{\theta_{(\lambda)}}{10 \cdot d \cdot c}$$

Formel 2.3 **Berechnung der Elliptizität.** $\theta_{(\lambda)}$ = Elliptizität in (grad), c = Konzentration in (mol l⁻¹), d = Schichtdicke der Küvette in (cm), $[\theta]_{AS}$ = molare Elliptizität pro Aminosäure in (grad cm² dmol), N_A = Anzahl der Aminosäuren, $[\theta]$ = molare Elliptizität in (grad cm² dmol).

2.5.3. NMR-Spektroskopie

Alle Messungen wurden in Kooperation mit Dr. Michael Kovermann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jochen Balbach (Fachgruppe Biophysik, Institut für Physik, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt.

2.5.3.1. 1D-¹H-NMR-Spektroskopie

¹H-Spektren von 40-60 μM Protein wurden in 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 2 mM TCEP, 10 mM MgCl₂, pH 7,8, 10% D₂O an einem Bruker Avance III 800 MHz NMR-Spektrometer, ausgestattet mit einem CP-TCI-Kryoprobenkopf, gemessen. ¹H-Spektren wurden von DltA, *holo*-DltC und DltA RR, DltA RW, *apo*-DltC S36A sowie *holo*-DltC A3 aufgenommen.

2.5.3.2. 2D-¹⁵N, ¹H-TROSY-HSQC-Spektroskopie

Zur Identifikation der Kontaktfläche zwischen DltA und DltC wurden ¹⁵N, ¹H-Korrelationsspektren aufgenommen. Dafür wurde unmarkiertes DltA mit einer initialen Konzentration von 900 μM in definierten Schritten (Tabelle 2.5) zu ¹⁵N-markiertem DltC (270 μM initiale Konzentration) titriert. Nach jedem Titrationsschritt wurde ein ¹⁵N, ¹H-TROSY-HSQC-Spektrum am Bruker Avance III 600 MHz Spektrometer, ausgestattet mit einem QXI-Raumtemperaturkopf, aufgenommen. Alle Experimente wurden in 50 mM HEPES/NaOH, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM TCEP, 10% D₂O, pH 7,8 durchgeführt. Titriert wurde DltA

gegen *holo*-DltC oder *apo*-DltC S36A, jeweils in An- und Abwesenheit von 3 mM AMP. Zudem wurden ^{15}N , ^1H -Korrelationsspektren von *holo*-DltC und *apo*-DltC S36A ohne DltA am Bruker Avance III 800 NMR-Spektrometer aufgenommen.

$V_{\text{gesamt}} (\mu\text{l})$	$V_{\text{DltA}} (\mu\text{l})$	$C_{\text{DltC}} (\mu\text{M})$	$C_{\text{DltA}} (\mu\text{M})$	n (DltA:DltC)
500	0	270,00	0	0,00
510	10	264,71	17,65	0,07
530	30	254,72	50,94	0,20
560	60	241,07	96,43	0,40
600	100	225,00	150,00	0,67
750	250	180,00	300,00	1,67
1000	500	135,00	450,00	3,33

Tabelle 2.5 **Titrationsschema.**

Die Prozessierung der Daten erfolgte mittels NMRPipe (Delaglio et al., 1995). Alle ^{15}N , ^1H -Korrelationsspektren wurden mit NMRView (Johnson and Blevins, 1994) dargestellt. Die Zuordnung der Resonanzsignale zu den entsprechenden Aminosäuren von DltC erfolgte bereits von ZIMMERMANN anhand von Tripel Resonanzspektren (HNCA, HNCACAB, HN(CO)CACB) von $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markiertem DltC (Zimmermann, 2011).

2.5.4. Denaturierende Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden nach LAEMMLI hergestellt (Laemmli, 1970). Es wurden 6,5%ige Sammelgele und je nach Anwendung 12 bzw. 15 %ige Trenngele verwendet, die nach Pipettierschema der Tabelle 2.6 hergestellt wurden.

Lösungen	Trenngel 12%	Trenngel 15%	Sammelgel
30% Acrylamid/Bisacrylamid	3,2 ml	4 ml	880 μl
1,5 M Tris/HCl, 0,31% SDS, pH 8,8	2 ml	2 ml	---
0,5 M Tris/HCl, 0,61% SDS, pH 6,8	---	---	800 μl
dd H ₂ O	2,8 ml	2 ml	2,4 ml
10 % APS (w/v)	60 μl	60 μl	50 μl
TEMED	4 μl	4 μl	3 μl

Tabelle 2.6 **Pipettierschema für die Herstellung von SDS Gele.** Die Angaben beziehen sich auf der Herstellung von zwei Gele.

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Proben mit reduzierendem SDS-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Bei der Verwendung von nicht-reduzierendem Ladepuffer wurde die Probe nicht erhitzt. Als Marker wurde der Standard Marker von Bio Rad eingesetzt. Die Laufzeit in Lämmli-Puffer betrug ca. 1 h bei 35 mA. Anschließend erfolgte das Anfärben der Proteinbanden mittels Coomassie- oder Silberfärbung.

Lämmli-Puffer:	25 mM Tris/HCl, 200 mM Glycin, 3 mM SDS, pH 8,9
3 x SDS-LB (reduzierend):	875 mM Tris/HCl, 13% Glycerin, 5% SDS, 5% β -Mercaptoethanol, 0,125% Bromphenolblau
3 x SDS-LB (nicht-reduzierend):	875 mM Tris/HCl, 13% Glycerin, 5% SDS, 0,125% Bromphenolblau

2.5.4.1. Coomassiefärbung

Für die Färbung der Gele mittels Coomassie (Fairbanks et al., 1971) wurden diese für 2 h in Fairbanks I inkubiert und anschließend mittels Fairbanks II bis zum gewünschten Ergebnis entfärbt.

Fairbanks I: 25% Isopropanol, 10% Essigsäure, 0,05% Coomassie Brilliant-Blau R250

Fairbanks II: 10% Essigsäure

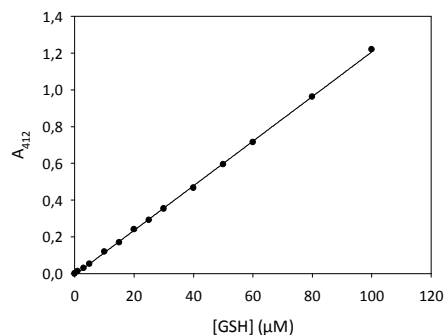
Wenn nicht anders angegeben wurden die SDS-Gele mittels Coomassie gefärbt.

2.5.4.2. Silberfärbung

Die Silberfärbung erfolgte modifiziert nach NESTERENKO (Nesterenko et al., 1994). Das Gel wurde für 5 min in 50% Aceton, 1,5 ml 50% TCA und 25 µl Formaldehyd (auf 60 ml ddH₂O) fixiert. Nach einem Waschschrift für 3x 5 s, 1x 5 min und 3x 5 s mit ddH₂O erfolgte die Vorbehandlung mit 50% Aceton für 5 min. Nach Inkubation für 1 min in 100 µl 10% Natriumthiosulfat (auf 60 ml ddH₂O) wurde erneut für 3x 5 s mit ddH₂O gewaschen. Nach dem Imprägnierungsschritt mit 600 µl 20% Silbernitrat, 600 µl Formaldehyd (auf 60 ml ddH₂O) für 8 min wurde 3x 5 s mit ddH₂O gewaschen und bis zur gewünschten Färbung in Entwicklerlösung (0,8 g Natriumcarbonat, 20 µl Formaldehyd, 20 µl 10% Natriumthiosulfat, auf 60 ml ddH₂O) inkubiert. Zum Abstoppen wurde 100% Essigsäure verwendet.

2.5.5. Bestimmung der freien Thiolgruppen

Die Bestimmung der freien Thiolgruppen des Proteins erfolgte nach der Ellman-Methode (Butterworth et al., 1967). Dafür wurden 1 ml der zu analysierenden Probe mit 50 µl 3 mM DTNB (5',5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure), gelöst in 0,1 M NaH₂PO₄, pH 7,3, versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 25°C wurde die Absorption bei 412 nm gemessen. Für die Auswertung wurde eine Kalibriergerade von 0-100 µM Glutathion (reduziert) verwendet (Abbildung 2.1). Je nach Anzahl der freien Thiolgruppen wurden Proteinkonzentrationen zwischen 5 und 60 µM in 6 M Guanidinhydrochlorid, 75 mM NaH₂PO₄, 1 mM EDTA, pH 7,3 eingesetzt.



$$[-SH] = \frac{A_{412} + 0,00716}{0,01213}$$

Abbildung 2.1 Kalibriergerade für den Ellman-Test.

2.5.6. Kovalente Verknüpfung des DltA-DltC-Komplexes

Für die kovalente Verknüpfung durch Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen DltA und DltC wurden die Varianten DltA E125C und *apo*-DltC S36C verwendet.

Die beiden Proteinvarianten wurden für 12 h bei 8°C mit 5 mM DTT inkubiert. Das Reduktionsmittel wurde anschließend chromatographisch über 5 x 5 ml *desalting*-Säulen (GE Healthcare) entfernt. Alle Ansätze wurden in 50 mM HEPES/NaOH, 150 mM NaCl, pH 7,8 durchgeführt. Für die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen DltA und DltC wurden drei unterschiedliche Versuchsbedingungen getestet:

1. ohne Zusätze

10 µM oder 50 µM DltA E125C wurden mit 50 µM oder 100 µM *apo*-DltC S36C für 2 h oder 20 h bei 25°C inkubiert.

2. redox-shuffle-System

50 µM *apo*-DltC S36C und 50 µM DltA E125C wurden in Anwesenheit von 1 mM GSH und 0,1-10 mM GSSG für 2 h oder 20 h bei 25°C inkubiert. Analog dazu wurde der Ansatz mit 1 mM GSSG und 0,1-10 mM GSH durchgeführt.

3. gemischtes Disulfid

Für die Ausbildung eines gemischten Disulfides wurden 50 µM DltC S36A oder DltA E125C für 18 h bei 25°C mit 50 mM GSSG inkubiert. Das überschüssige GSSG wurde durch extensives Dialysieren gegen 50 mM HEPES/NaOH, 150 mM NaCl pH 7,8 entfernt. Anschließend wurden die Proteine bei 20000g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Daraufhin wurden 30 µM gemischtes Disulfid mit 30 µM des entsprechenden Bindungspartners für 8 h oder 20 h bei 25°C inkubiert.

Die Analyse erfolgte anhand einer nicht-reduzierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

2.5.7. Limitierte Proteolyse

500 µM DltA wurden mit einem 200-fachen molaren Unterschuss an Trypsin versetzt und für 60 min bei 30°C inkubiert. Nach Abstoppen durch Zugabe des SDS-Ladepuffers und Erhitzen für 5 min bei 95°C erfolgte die Analyse von 3 µg DltA anhand einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Alle Ansätze wurden in 50 mM HEPES/NaOH, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM TCEP, pH 7,8 in An- und Abwesenheit von 5 mM AMP, ATP oder AMPCPP durchgeführt.

2.6. Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Die Titration eines Liganden zu einem Protein führt bei Existenz einer Bindestelle für den Liganden zu einer Wärmeaufnahme oder -abgabe, die durch Formel 2.4 definiert ist.

$$dq_b = dq_{app} - dq_v - dq_{us} = v \cdot \Delta H_b \cdot d[PL]$$

Formel 2.4 **Wärmeänderung während der Titration.** dq_{app} = beobachtete Wärmeänderung, q_b = Änderung der Bindungswärme, dq_v = Änderung der Verdünnungswärme, dq_{us} = Änderung der unspezifischen Wärme, v = Volumen der Reaktionszelle, ΔH_b = Änderung der molaren Bindungsenthalpie, $[PL]$ = Konzentration des gebildeten Ligand-Protein-Komplexes.

Die Bestimmung der Parameter ΔH_b und K_a erfolgte mit Hilfe der implementierten Microcal-Origin-Software unter Verwendung eines Modells mit einer Bindestelle für den Liganden (Formel 2.5) (Wiseman et al., 1989).

$$\frac{1}{v} \left(\frac{dq}{d[L]_{tot}} \right) = \Delta H_b \cdot \left(\frac{1}{2} + \frac{1 - \frac{\left(1 + \frac{1}{K_a [P]_{tot}}\right) \frac{[L]_{tot}}{[P]_{tot}}}{2}}{\left(\left(\frac{[L]_{tot}}{[P]_{tot}} \right)^2 - 2 \frac{[L]_{tot}}{[P]_{tot}} \left(1 - \frac{1}{K_a [P]_{tot}} \right) + \left(1 + \frac{1}{K_a [P]_{tot}} \right)^2 \right)^{1/2}} \right)$$

Formel 2.5 **Ligandenbindung mit einer Bindestelle.** dq = Wärmeänderung, v = Volumen der Reaktionszelle, ΔH_b = Änderung der molaren Bindungsenthalpie, $[P]_{tot}$ = Gesamtkonzentration des Proteins in der Zelle, $[L]_{tot}$ = Gesamtkonzentration des Liganden, K_a = Assoziationskonstante

Über die Gibbs-Helmholtz-Gleichung können zudem die Entropie (ΔS) sowie die freie Enthalpie (ΔG) erhalten werden.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_a$$

Formel 2.6 **Gibbs-Helmholtz-Gleichung.** ΔG = Änderungen der molaren freie Enthalpie, ΔH = Änderungen der molaren Enthalpie, ΔS = Änderungen der molaren Entropie, K_a = Assoziationskonstante, R = universelle Gaskonstante ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)

Das Produkt aus der Konzentration des Proteins in der Zelle $[P]_{tot}$ und der Assoziationskonstante (K_a) wird als c definiert. Bei einem 1:1-Bindungsprozess werden Experimente idealerweise in einem Bereich von $c=1-1000$ durchgeführt. Bei Bestimmung der Assoziationskonstanten im niedrigen mikromolaren Konzentrationsbereich wurden die Experimente mit $c > 10$ und einem 10-fachen Überschuss an Liganden durchgeführt (Formel 2.7(a)), während für Affinitäten im hohen mikromolaren Konzentrationsbereich die Titrations unter Berücksichtigung von Formel 2.7(b) mit $c \sim 1$ und einem >10-fachen Überschuss an Ligand durchgeführt wurden (Wiseman et al., 1989; Tellinghuisen, 2008).

$$c = K_a \cdot [P]_{tot} \quad (a) \qquad R_m = \frac{[L]_{tot,i}}{[P]_{tot,i}} = \frac{6,4}{c^{0,2}} + \frac{13}{c} \quad (b)$$

Formel 2.7 **Planung der ITC-Experimente bei (a) hoher Affinität und (b) niedriger Affinität der Bindung des Liganden an das Protein.** K_a Assoziationskonstante, $[L]_{tot,i}$ = Konzentration des Liganden in der Zelle nach dem letzten Titrationsschritt $[P]_{tot,i}$ = Konzentration des Proteins in der Zelle nach dem letzten Titrationsschritt.

Alle Messungen wurden an dem VP-ITC Micro Kalorimeter (MicroCal) durchgeführt. Dafür wurden die Proteine für 48 h gegen den entsprechenden, gut entgasten ITC-Puffer dialysiert.

Anschließend wurden sie für 30 min bei 20000g und 4°C zentrifugiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Bei Verwendung von Nukleotiden oder D-Ala als Liganden wurden diese Substanzen in dem Dialysepuffer gelöst und entsprechend verdünnt. 300 µl des Liganden wurden in 10 µl-Schritten in Intervallen von 6 Minuten zu 1406 µl Proteinlösung in der Zelle unter Rühren (220 rpm) titriert. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Experimente bei 25°C in 50 mM HEPES/NaOH, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM TCEP, pH 7,8 durchgeführt.

Zur Korrektur der entstehenden Wärme durch Verdünnung des Liganden bei der Titration (Formel 2.4) wurde eine Referenzmessung durchgeführt, bei der der Ligand in den Puffer ohne Protein titriert wurde und die erhaltene Verdünnungswärme von der Gesamtwärme subtrahiert wurde.

2.7. Bestimmung der Enzymaktivität

Zur Quantifizierung der DltA-katalysierten Übertragung des D-Ala auf DltC wurde das dadurch freigesetzte AMP chromatographisch detektiert (modifiziert nach (Luo and Walsh, 2001)). Wenn nicht anders angegeben, wurde folgender Reaktionspuffer verwendet: 50 mM HEPES/NaOH, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, pH 7,8.

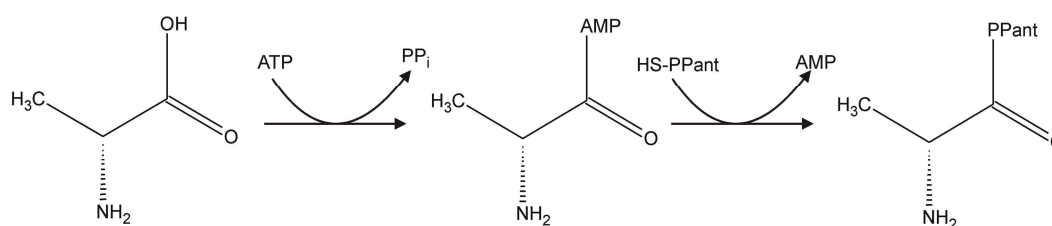


Abbildung 2.2 **Reaktionsmechanismus.** DltA-katalysierte D-Alanylierung von DltC, HS-PPant = freie Sulfhydrylgruppe des 4'-Phosphopantethein-Cofaktors von *holo*-DltC.

2.7.1. Zeit-Umsatz-Messungen

Die Freisetzung von AMP durch DltA allein und in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an DltC wurde über einen Zeitraum von 60 min bei 37°C verfolgt. Die Reaktion wurde in Anwesenheit von 2 mM D-Ala, 1 mM ATP, 0,2 µM DltA sowie 0-50 µM DltC durchgeführt. Als Kontrolle wurde die DltA-katalysierte AMP-Freisetzung in Abwesenheit von D-Ala, sowie die ATP-Hydrolyse in Abwesenheit von DltA gemessen. Alle Komponenten, mit Ausnahme von DltA, wurden für 10 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von DltA gestartet und nach definierten Zeitabständen durch Erhitzen bei 95°C für 5 min abgestoppt. Der lineare Anstieg der Auftragung der AMP-Konzentration in Abhängigkeit von der Zeit ergibt die Reaktionsgeschwindigkeit.

2.7.2. v/S-Charakterisierung

Die Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Konzentration an DltC, D-Ala bzw. ATP wurden innerhalb des linearen Bereiches des Reaktionsverlaufs (Zeit-Umsatz-Kurven, Kapitel 2.7.1.) durch eine Ein-Punkt-Messung bestimmt. Die Reaktionsgeschwindigkeit in

Abhängigkeit der DltC-Konzentration wurde mit konstanten Konzentrationen an D-Ala (2 mM) und ATP (1 mM) mit DltC-Konzentrationen von 0-150 μM durchgeführt. Die Messung der Geschwindigkeit in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration wurde mit 2 mM D-Ala, 0/20 μM *holo*-DltC und 0,02-2 mM ATP und in Abhängigkeit von der D-Ala-Konzentration mit 20 μM *holo*-DltC, 1 mM ATP sowie 0-2 mM D-Ala durchgeführt. Die DltA-Konzentration betrug in allen Ansätzen 0,2 μM . Die Reaktionsansätze wurden für 10 min bei 37°C vorinkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von DltA gestartet, für 1-10 min bei 37°C inkubiert und anschließend durch Erhitzen bei 95°C für 5 min abgestoppt. Es wurden sowohl *holo*-DltC und DltA sowie die Varianten *apo*-DltC S36A, *holo*-DltC A3, DltA RW und DltA RR verwendet.

2.7.3. Abhängigkeit von der Enzymkonzentration

Zudem wurde die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der DltA-Konzentration in An- und Abwesenheit von *holo*-DltC gemessen. Die Messung der Reaktionsgeschwindigkeit erfolgte analog zu Kapitel 2.7.2. Dafür wurden 2 mM D-Ala, 1 mM ATP, 0/10 μM *holo*-DltC und 50-1000 nM DltA eingesetzt. Neben DltA wurde ebenfalls DltA RW verwendet.

2.7.4. Detektion des AMP mittels RP-HPLC

Die Konzentration des freigesetzten AMP wurde chromatographisch an der Ultimate 3000 (Thermo Scientific) oder Gynkotek (Dionex) HPLC-Anlage bestimmt. Ein Probenvolumen zwischen 3 und 70 μl wurde mit einem Fluss von 0,7 ml/min auf eine mit 8,3% Laufmittel B äquilibrierte Supelcosil LC-18-T RP-HPLC-Säule (Sigma Aldrich) appliziert und mit einem Gradienten von 8,3% zu 28,4% Laufmittel B über 24 min eluiert. Die Freisetzung von AMP pro Minute wurde anhand der relativen Peakflächen bestimmt (Formel 2.8).

Laufmittel A: 50 mM KH_2PO_4 , 10 mM Tetrabutylammoniumbromid, pH 7,5

Laufmittel B: Methanol

$$v = \frac{\Delta C_{\text{AMP}}}{\Delta t} = \frac{A_{\text{AMP}}}{(A_{\text{AMP}} + A_{\text{ADP}} + A_{\text{ATP}})} \cdot \frac{C_{\text{ATP},0}}{\Delta t}$$

Formel 2.8 **Berechnung der AMP-Freisetzung pro Zeiteinheit.** $c_{\text{ATP},0}$ = initiale Konzentration von ATP in (μM), c_{AMP} = Konzentration von AMP in (μM), A= Peakfläche in (mAU min), Δt = Zeitänderung in (min), v = Geschwindigkeit der AMP-Freisetzung pro Zeiteinheit in ($\mu\text{M min}^{-1}$).

2.8. Massenspektrometrie

2.8.1. ESI-Massenspektrometrie unter denaturierten Bedingungen

Die Messungen wurden in Kooperation mit Dr. Sabine Herbst und Dr. Christian Ihling aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andrea Sinz (Abteilung Pharmazeutische Chemie und Bioanalytik, Institut für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt.

Für die Messungen wurde 20 μM Protein über C4 oder C18 Zipp Tipps (Merck Millipore, Schwalbach) entsalzt. Die Elution erfolgte in 50-0 % Acetonitril mit 0,1-1% Ameisensäure.

2.8.2. Native Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie

Alle Messungen wurden in Kooperation mit Annika Butterer aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frank Sobott (Biomolekulare und Analytische Massenspektrometrie, Fachbereich Chemie, Universität Antwerpen) durchgeführt.

Für die Messungen wurden 100 μM DltA, 100 μM DltC oder 100 μM DltA+100 μM DltC nach Protokoll über eine SEC-Micro Biospin-Säule (BioRad) ausgehend von 50 mM HEPES/NaOH, 150 mM NaCl, 10 mM Mg-Acetat, 2 mM DTT, pH 7,8 in 100 mM Tetraethylammoniumacetat (TEAA) bei Raumtemperatur umgepuffert. Als Variation wurde vor dem Pufferaustausch zusätzlich 2 mM AMP, 2 mM ATP, 2mM AMPCPP oder 2 mM D-Ala + 2 mM ATP zugesetzt. Die Konzentration der Proben nach dem Pufferaustausch betrug ca. 5 μM . Die Messungen wurden am Synapt 2 (Waters) im Positiv-Modus durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgt mittels MassLynx und DriftScope (Waters).

2.9. Röntgenstrukturanalyse

2.9.1. Kristallisation

2.9.1.1. Initiales Kristallisations-screening

Das initiale Kristallisations-screening nach der Dampfdiffusionsmethode wurde in MRC-2-well-sitting-drop-Platten (2+96 wells) (SWISSCI) bei 15°C mittels Microsys SQ Pipettierroboter (Cartesian) mit 70 μl Reservoirlösung durchgeführt. Für jeden Tropfen wurden 0,2 μl Proteinlösung mit 0,2 μl Reservoirlösung gemischt. Die Platten wurden anschließend mit transparenter Abdeckfolie (Greiner bio-one) verschlossen, Bilder wurden automatisch in definierten Zeitabständen mittels Desktop Minstrel UV-Imager (Rigaku) aufgenommen. Für die Kristallisation kamen verschiedene, kommerziell erhältliche Kristallisationskits zum Einsatz (Crystal screen 1+2 (Hampton Research), JBScreen classic 1-10 (Jena Bio-Science), JBScreen JCSG++ (Jena Bio-Science), Cryo crystallization kit (Sigma Aldrich), Low Ionic Strength crystallization kit (Sigma Aldrich), Morpheus (Molecular Dimensions)).

Die Kristallisation des DltA-DltC-Komplexes erfolgte in 50 mM HEPES/NaOH, 150 mM NaCl, pH 7,8. In der Variante 1 wurden 350 μM (20 mg/ml) DltA und 1,05 mM (11 mg/ml) *holo*-DltC mit 10 mM ATP, 10 mM D-Ala, 50 mM MgCl_2 und 5 mM TCEP eingesetzt. In der Variante 2 wurden 300 μM (17 mg/ml) DltA und 600 μM (6,2 mg/ml) *holo*-DltC in Anwesenheit von 3 mM ATP, 3 mM D-Ala, 5 mM MgCl_2 verwendet. Streuende Proteinkristalle konnten unter folgenden Bedingungen erhalten werden:

DltA-DltC Variante 1:	90 mM NaNO ₃ /Na ₂ HPO ₄ /(NH ₄) ₂ SO ₄ , 100 mM MOPS pH 7,5, 100 mM HEPES pH 7,5, 37,5% MPD/PEG 1K/PEG 3350 (Morpheus, Molecular Dimensions)
DltA-DltC Variante 2:	3 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1% 2-Methyl-2,3-pentandiol (MPD) (Jena Bio-Science)

Die Kristallisation von DltA erfolgte ebenfalls in 50 mM HEPES/NaOH, 150 mM NaCl, pH 7,8 mit 350 µM (20 mg/ml) DltA in Anwesenheit von 100 µM (1 mg/ml) *holo*-DltC. Zusätzlich waren 3 mM AMP, 50 mM MgCl₂ und 5 mM TCEP enthalten. Streuende DltA-Kristalle konnten unter folgenden Bedingungen erhalten werden:

DltA: 90 mM NaNO₃, Na₂HPO₄/(NH₄)₂SO₄, 100 mM MOPS/100 mM HEPES/NaOH, pH 7,5, 40% MPD/PEG 1K/PEG 3350 (Morpheus, Molecular Dimensions).

2.9.1.2. Optimierung der Kristallisation

Ausgehend von den Bedingungen, die bereits streuende DltA-DltC-Proteinkristalle hervorbrachten, wurden folgende Variationen getestet, um die Streueigenschaften der Kristalle weiter zu verbessern:

- (a) das molare Verhältnis von DltA:DltC (1:1-1:6)
- (b) die Gesamtproteinkonzentration
- (c) die Präzipitanzkonzentration
- (d) das Verhältnis von Proteinlösung zu Reservoirlösung (1:1, 1:2, 2:1)
- (e) die Verwendung von 3 mM AMP anstelle von ATP und D-Ala
- (f) die An- und Abwesenheit von 5 mM TCEP
- (g) die Variation des pH-Wertes
- (h) Additive (*additive screen*, Hampton Research)
- (g) neben *holo*-DltC wurde zudem *apo*-DltC S36A verwendet

Die Kristallisation erfolgte bei 20°C in Easy Xtal 15-*well-hanging-drop*-Platten mit 400 µl Reservoirlösung. Die optimierten Bedingungen sind in Kapitel 3.2. beschrieben. Die Streueigenschaften der DltA-Kristalle aus den initialen Kristallisationsbedingungen erforderten keine Optimierung der Kristallisationsbedingungen.

2.9.2. Aufnahme und Prozessierung der Diffraktionsdaten

Die Datensätze wurden an der Beamline 14.1 am BESSY II, Helmholtz-Zentrum Berlin aufgenommen. Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 2.7 zusammengefasst.

Die Prozessierung erfolgte mittels XDS (Kabsch, 2010). Die Bestimmung der Anzahl an Molekülen in der asymmetrischen Einheit erfolgte durch CCP4-Matthews-coef (Matthews, 1968; Kantardjieff and Rupp, 2003). Die Anwesenheit von Verzwilligung wurde mittels Phenix-Xtriage geprüft (Adams et al., 2010).

	DltA	DltA-DltC Kristallform I	DltA-DltC Kristallform II
Kryo-Puffer	-	-	30% Glycerol
Detektorabstand (mm)	156	315	197
aufgenommener Winkelbereich	360°	360°	110°
Oszillation	0,5°	0,5°	1,0°
Wellenlänge (nm)	0,9184	0,9184	0,9184

Tabelle 2.7 Parameter der Diffraktionsdaten-Sammlung.

2.9.3. Phasierung - *molecular replacement*

Die Bestimmung der initialen Phasen erfolgte durch *molecular replacement* mittels Phenix-Phaser (Adams et al., 2010) oder CCP4-Phaser (McCoy et al., 2007) nach der *maximum likelihood*-Wahrscheinlichkeitsmethode für die Rotations- und Translationssuche. Für die Phasierung des DltA wurde die große Domäne von DltA (Aminosäuren 1-395), pdb-Code 3E7W (Yonus et al., 2008) verwendet. Für die Bestimmung der Phasen für den DltA-DltC-Komplex in P312₁ (Kristallform I) wurde die DltA-Struktur aus dieser Arbeit genutzt. Für den DltA-DltC-Komplex in der Raumgruppe P2₁2₁2₁ (Kristallform II) wurde neben dem Volllängen-DltA (pdb-Code 3E7W, (Yonus et al., 2008)) auch DltC (pdb-Code 4BPH, (Zimmermann, 2011)) als Suchmodell verwendet.

2.9.4. Modellbau, Verfeinerung und Strukturvalidierung

Zum Modellbau wurde *coot* (Emsley and Cowtan, 2004) mit den F_o-F_c , als auch den $2F_o-F_c$ Elektronendichtekarten verwendet. Die Validierung der Kristallstrukturen erfolgte mittels MolProbity (Chen et al., 2010; Davis et al., 2004). Alle Strukturabbildungen wurden mit Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC) angefertigt.

2.9.4.1. DltA-DltC (P312₁)

Alle Verfeinerungszyklen wurden mittels Phenix-Refine (Afonine et al., 2012) unter Berücksichtigung des Zwillingsgesetzes (-h,-k,l) durchgeführt. DltA wurde dafür in zwei Domänen (Aminosäuren 1-395 und 396-511) geteilt und zusammen mit dem manuell platzierten DltC (pdb-Code 4BPH) mittels *rigid body refinement* in die durch *molecular replacement* erhaltene Elektronendichte eingepasst. Strukturbereiche mit unzureichend definierter Elektronendichte wurden zu Beginn entfernt. Auf Grund der niedrigen Auflösung von 3,2 Å wurde die Geometrieverfeinerung nur gegen die beobachteten Strukturfaktoramplituden durchgeführt. Dabei wurden DltA und DltC als Referenzmoleküle zur Beschränkung der Torsionswinkelfreiheit verwendet. Während der Verfeinerungszyklen wurden jedoch die Beschränkungen herabgesetzt (von 0,5 auf 1 s und von 30 auf 15 Grad). Abweichungen der Torsionswinkel zwischen den NCS-verwandten Atomen wurden durch Anwendung der NCS-Einschränkung nur in geringem Maße erlaubt. Des Weiteren wurden zu Beginn die B-Faktoren auf 20 Å² fixiert und erst bei späteren Verfeinerungszyklen isotrop und individuell verfeinert. Zudem wurde während der ersten Verfeinerungszyklen die Variabilität der Bindungslängen der Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Sekundärstrukturelemente beschränkt. Die Geometrieparameter des Phosphopantethein-

Cofaktors des DltC sowie dessen Verknüpfung mit Serin 36 wurden mittels JLigand (Lebedev et al., 2012) erstellt. Als weiterer Ligand wurde AMP mittels *coot* positioniert.

2.9.4.2. DltA (P2₁2₁2₁)

Alle Verfeinerungen wurden mittels Phenix-Refine (Afonine et al., 2012) durchgeführt. Die Aminosäuren 396-511 der kleinen Domäne des DltA wurden manuell mittels *coot* gebaut. Die Geometrieverfeinerung wurde sowohl gegen die beobachteten Strukturfaktoramplituden, als auch gegen die Elektronendichte, durchgeführt. Die B-Faktoren wurden individuell und isotrop verfeinert. Alternative Konformationen der Aminosäuren konnten mittels *coot* identifiziert und in die Struktur integriert werden. Anschließend wurde der Besetzungsgrad der Atome mit verfeinert. Wassermoleküle wurden mittels *coot* identifiziert und manuell validiert. Neben dem Liganden AMP konnten zudem die Pufferbestandteile HEPES und 2-Methyl-2,3-pentandiol mittels *coot* identifiziert und eingebaut werden.

2.9.4.3. DltA-DltC (P2₁2₁2₁)

Zu Beginn wurde ein *simulated annealing* mittels CNS (Brunger et al., 1998) durchgeführt. Für die anschließende Geometrieverfeinerung wurde *refmac5* (CCP4) (Murshudov et al., 2011) verwendet. Dabei wurden die B-Faktoren zu Beginn ebenfalls auf 20 Å² fixiert, anschließend jedoch individuell und isotrop verfeinert. Zuletzt wurden alternative Konformationen hinzugefügt und der Besetzungsgrad der Atome mit verfeinert. Wassermoleküle wurden automatisch mittels *coot* positioniert und anschließend manuell überprüft. Zudem wurden AMP sowie der Pufferbestandteil 2-Methyl-2,3-pentandiol mittels *coot* eingebaut.

3. Ergebnisse

3.1. Präparation und Charakterisierung von DltC und DltA

3.1.1. Präparation von DltA und DltC

Die Expression von *dltC* und *dltA* sowie die Reinigung der Proteine erfolgte modifiziert nach (Yonus et al., 2008). Für die lösliche Expression von *dltA* und *dltC* im pQE60-Plasmid wurde der Stamm *E. coli* BL21 DE3 verwendet (Abbildung 3.1 (a)). Durch Co-Expression des Gens der Phosphopantethein-Transferase Sfp während der Expression von *dltC* konnte ein nahezu 100%iger Cofaktor-Beladungsgrad erhalten werden, was mittels ESI-Massenspektrometrie bestätigt wurde (Anhang, Abbildung 0.6). Die Reinigung über eine IMAC (5 ml His-Trap HP, GE Healthcare) sowie Größenausschlusschromatographie (S 75 oder S200 16/60 oder 26/60) lieferte reine, homogene Proteine (Abbildung 3.1(b)). Die Ausbeuten betragen im Durchschnitt 100 mg DltA pro Liter LB-Medium und 20 mg DltC pro Liter LB-Medium.

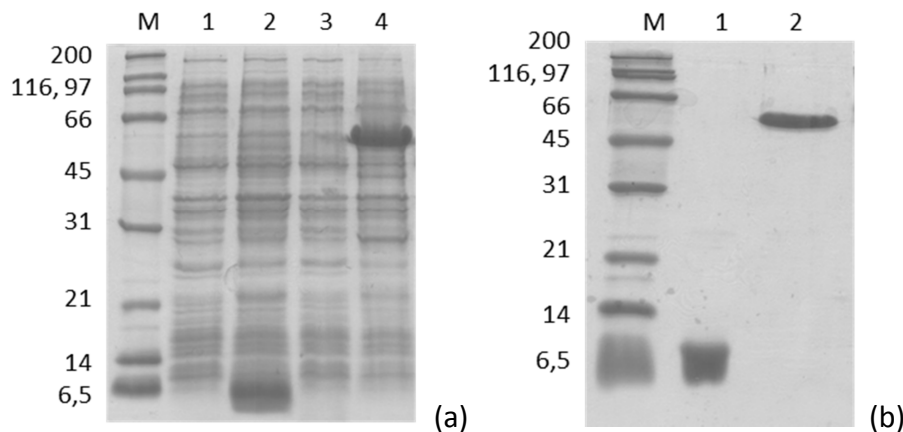


Abbildung 3.1 **(a) Expression von *dltC* und *dltA***. M: Marker (kDa), 1: DltC in *E. coli* BL21 DE3 vor Induktion, 2: DltC in *E. coli* BL21 DE3 16 h nach Induktion mit 0,5 mM IPTG, 3: DltA in *E. coli* BL21 DE3 vor Induktion, 4: DltA in *E. coli* BL21 DE3 16 h nach Induktion mit 0,5 mM IPTG. **(b) Reinigung von DltC und DltA**, M: Marker (kDa), 1: DltC (10,4 kDa) nach Größenausschlusschromatographie, 2: DltA (56,6 kDa) nach Größenausschlusschromatographie

Die Expression der *dltC*- und *dltA*-Varianten und Reinigung der Proteine sowie die Expression von *dltC* in M9-Minimalmedium erfolgte analog und lieferte vergleichbare Ausbeuten und Reinheiten.

3.1.1.1. Herstellung der großen Domäne von DltA (DltA_N)

Die Herstellung der großen Domäne von DltA (DltA_N) erfolgte durch einen tryptischen Verdau des DltA für 24 h bei 25°C mit einem 188 fachen (w/w) Überschuss an Trypsin. Es ist ersichtlich, dass nach 24 h tryptischem Verdau eine vollständige Spaltung des DltA in die große und kleine Domäne erfolgt (Abbildung 3.2). Nach Abtrennung der Protease mittels Größenausschlusschromatographie konnte die große Domäne rein erhalten werden. Massenspektrometrische Analysen ergaben eine Spaltung durch Trypsin nach Lys402

(Anhang, Abbildung 0.5). Die strukturelle Integrität der großen Domäne konnte mittels CD-Spektroskopie (Anhang) bestätigt werden.

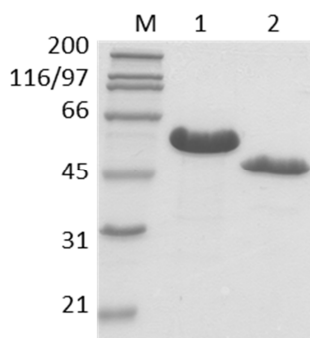


Abbildung 3.2 SDS - PAGE der Herstellung der großen Domäne von DltA, M Marker (kDa), 1 ungeschnittenes DltA, tryptischer Verdau von DltA nach 24 h.

3.1.2. Analyse der Konformationen von DltC mittels ^{15}N , ^1H -TROSY-HSQC-Spektroskopie

Für das DltC-verwandte *carrier*-Proteine TycC3 konnten drei unterschiedliche Konformationen in Abhängigkeit des 4'-Phosphopantethin-Cofaktors beschrieben werden (Koglin et al., 2006), während für andere DltC-verwandte Proteine entweder nur geringfügige oder keine konformationellen Änderungen beobachtet werden konnten (Kapitel 1.4.). Die Ergebnisse von ZIMMERMANN geben Hinweise darauf, dass zwischen *holo*- und *apo*-DltC keine konformationellen Unterschiede bestehen (Zimmermann, 2011). Zur weiteren Charakterisierung der Dynamik und Konformation in Abhängigkeit des DltC-Cofaktors wurden ^{15}N , ^1H TROSY-HSQC-Spektren von *holo*- und *apo*-DltC aufgenommen.

Für den Vergleich der Strukturen von *holo*-DltC und der Cofaktor-freien Variante *apo*-DltC S36A in Lösung wurden 2D ^{15}N , ^1H TROSY-HSQC-Spektren aufgenommen (Abbildung 3.3). Bei Änderungen der chemischen Umgebung, z.B. durch konformationelle Änderungen oder durch Anwesenheit des Cofaktors, können Unterschiede in der chemischen Verschiebung identifiziert werden. Für eine detaillierte Analyse der Unterschiede zwischen *holo*-DltC und *apo*-DltC S36A wurden die Differenzen der chemischen Verschiebungen ($\Delta\omega_{\text{all}}$) der ^1H - und ^{15}N -Dimension nach Formel 3.1 (Grzesiek et al., 1996) ausgewertet und in Abbildung 3.4 dargestellt.

Die Analyse der ^{15}N , ^1H TROSY-HSQC-NMR-Spektren ergab, dass, ausgenommen von der Anwesenheit des Cofaktors im *holo*-DltC, keine signifikanten Unterschiede in den chemischen Verschiebungen zwischen *holo*-DltC und *apo*-DltC S36A detektierbar waren (Abbildung 3.3).

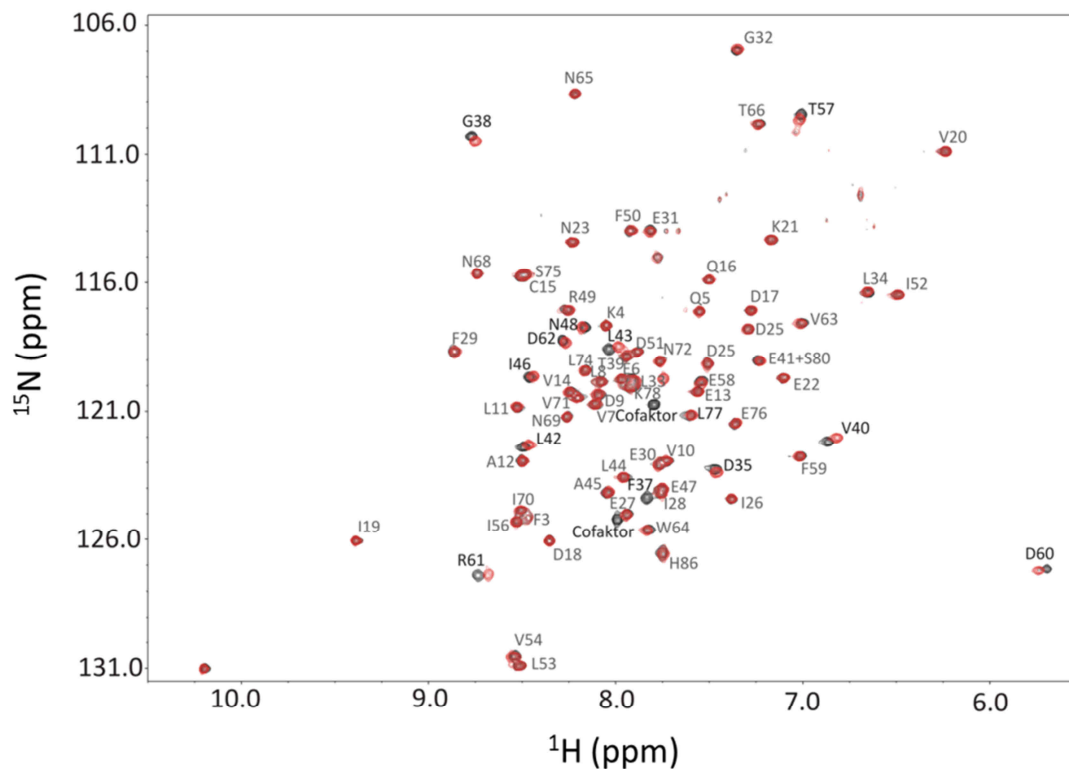


Abbildung 3.3 $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ TROSY-HSQC- Spektrum. Das Spektrum von *holo*-DltC ist schwarz und das von *apo*-DltC S36A rot gezeigt. DltC-Aminosäuren, die Unterschiede in der chemischen Verschiebung im Vergleich zwischen *holo* und *apo* aufweisen, sind fett hervorgehoben. Aufgrund der zwei vorhandenen Stickstoffatome im 4'-Phosphopantethein-Cofaktor sind zwei Signale zu beobachten.

$$\Delta\omega_{\text{all}} = \sqrt{\frac{(\Delta^1\text{H})^2 + \frac{1}{25}(\Delta^{15}\text{N})^2}{2}}$$

Formel 3.1 Berechnung der Differenzen der chemischen Verschiebung der ^1H - und ^{15}N -Dimension.

Lediglich geringe Unterschiede konnten dabei identifiziert werden. Die Aminosäuren Leu33, Phe37, Gly38, Val40, Leu42, Leu43, Ile46, Glu47, Thr57, Asp60, Arg61 und Asp62 wiesen Unterschiede in der Differenz der chemischen Verschiebung auf, die größer sind als die durchschnittliche Differenz von 0,0167 ppm. Diese Aminosäuren liegen innerhalb der Helix II und III sowie in der *loop*-Region zwischen Helix III und IV. Die beschriebenen Abweichungen sind jedoch nicht groß genug, dass sie konformationellen Änderungen zugeordnet werden können. Die chemische Verschiebung eines Atomkerns ist, vor allem in hydrophoben Aminosäuren, sensitiv gegenüber der Änderung der chemischen Umgebung. Somit können Interaktionen mit dem Cofaktor die chemische Umgebung beeinflussen, was sich in einer Änderung der chemischen Verschiebung widerspiegeln würde.

Sowohl für *holo*- als auch für die *apo*-DltC konnte jeweils nur ein Satz an ^{15}N , ^1H -Peaks beobachtet werden. Zudem sind keine Unterschiede der Signalintensitäten zwischen *holo*- und *apo*-DltC zu beobachten. Das lässt die Vermutung zu, dass beide Varianten jeweils nur eine Konformation aufweisen. Diese ist identisch für *holo*- und *apo*-DltC.

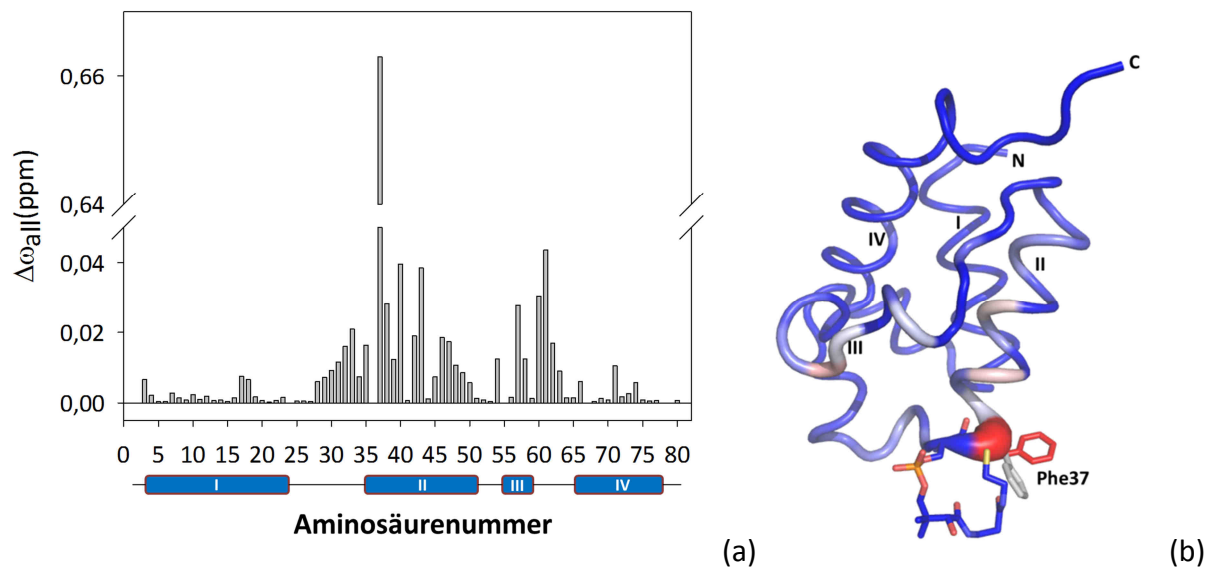


Abbildung 3.4 Strukturelle Unterschiede zwischen *holo*-DltC und *apo*-DltC S36A. (a) Differenz der chemischen Verschiebungen zwischen *holo*-DltC und *apo*-DltC S36A entsprechend der Aminosäurenummer. (b) *sausage*-Darstellung von *holo*-DltC. Die Stärke und Farbe (von blau zu rot) entspricht $\Delta\omega$ zwischen *holo*- und *apo*-DltC. Der DltC Cofaktor, Phe37 von *holo*-DltC (rot) und *apo*-DltC (grau) sind in *stick*-Darstellung gezeigt.

3.1.3. Röntgenstrukturanalyse von DltA

3.1.3.1. Kristallisation, Datensammlung und Prozessierung

Plättchen-förmige DltA-Kristalle im initialen *screening* bei 20°C wurden unter folgenden Bedingungen entdeckt. Das Verhältnis von Proteinlösung zur Reservoirolösung betrug 1 μ l:1 μ l.

Protein-Puffer:	50 mM HEPES/NaOH, 150 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ , 5 mM TCEP, 3 mM AMP pH 7,8
Protein-Konzentration:	350 μ M (20 mg/ml) DltA, 100 μ M (1 mg/ml) <i>holo</i> -DltC
Kristallisations-Puffer:	90 mM NaNO ₃ , Na ₂ HPO ₄ /(NH ₄) ₂ SO ₄ , 100 mM MOPS/100 mM HEPES pH 7,5, 40% 2-Methyl-2,4-Pentandiol (MPD)/PEG1K/PEG 3350

DltA kristallisierte in der orthorhombischen Raumgruppe P2₁2₁2₁. Die Kristalle streuten mit einer maximalen Auflösung von 1,6 Å und Streudaten wurden an der Beamline 14.1 am BESSY II, Helmholtz-Zentrum Berlin, aufgenommen. Die Prozessierung des Datensatzes erfolgte mittels XDS (Kabsch, 2010). Die Zellparameter sowie die Statistik zur Datensammlung sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Datensammlung	
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Elementarzelle	a=47,3 Å b=91,0 Å c=118,4 Å α=β=γ=90°
maximale Auflösung	1,6 Å
Moleküle in der asymmetrischen Einheit	1
R _{merge}	9,3% (56,7%)
I/σI	12,04 (3,59)
Vollständigkeit	99,0% (100%)
Redundanz	5,04
unabhängige Reflexe	67624 (11202)

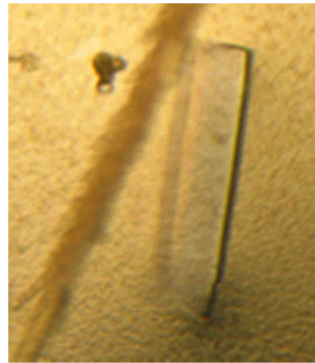


Tabelle 3.1 **Zellparameter und Statistik zur Datensammlung von DltA**. Die Werte in runden Klammern entsprechen der letzten Auflösungsschale, $\sigma I = I_{\text{obs}} - I_{\text{true}}$, $R_{\text{merge}} = \sum_h \sum_{i=1}^N |I_{(h)i} - \bar{I}_{(h)}| / \sum_h \sum_{i=1}^N I_{(h)i}$.

3.1.3.2. Phasierung, Strukturbau, Verfeinerung und Validierung

Die Lösung des Phasenproblems erfolgte durch *molecular replacement* (Phenix-Phaser, (Adams et al., 2010)). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Die Aminosäuren Val300 sowie Asn489 weichen in den ϕ/ψ -Winkelkombinationen (Val300: 79,5°/-71,9°, Asn489: 170,1°/-4,6°) von den im Ramachandran Plot erlaubten Bereichen ab. Während Val300 in einer *loop*-Region im aktiven Zentrum des DltA vorzufinden ist, liegt Asn489 in einer *loop*-Region innerhalb der kleinen C-terminalen DltA-Domäne. Aminosäuren innerhalb des aktiven Zentrums können teilweise Abweichung in den geometrischen Parametern aufweisen um eine Katalyse zu ermöglichen.

Verfeinerung	
R _{work}	17,0%
R _{free}	20,0%
Größe des Testsets	5%

Validierung	Struktur	Ziel
Anzahl der Proteinatome	4040	
Liganden	AMP	
Puffermoleküle	HEPES, 2x MPD	
Anzahl Wasseratome	610	
<i>poor rotamers</i>	5 (1,16%)	<1%
<i>Ramachandran outlier</i>	2 (0,4%)	<0,05%
<i>Ramachandran favoured</i>	493 (97,62%)	>98%
<i>r.m.s.d. Cβ -Abweichung >0,25 Å</i>	1 (0,21%)	0
<i>r.m.s.d. Winkel</i>	1.133	<0,1%
<i>r.m.s.d. Bindungen</i>	0.006	0
<i>MolProbity score</i>	1,22	

Tabelle 3.2 **Ergebnisse der Verfeinerung mittels Phenix-Refine und Strukturvalidierung nach MolProbity**.

3.1.3.3. Strukturbeschreibung und Vergleich mit anderen DltA-Strukturen

Wie bereits von YONUS und DU beschrieben (Yonus et al., 2008; Du et al., 2008), weist DltA eine ähnliche Struktur auf, die bereits für andere Mitglieder der Familie der Adenylat-

bildenden Enzyme beobachtet wurde. Sie besteht aus einer großen N-terminalen Domäne, welche die Aminosäuren 1-395 umfasst und einer kleinen C-terminalen Domäne, die von Aminosäure 400-503 gebildet wird. Beide sind durch eine 5 Aminosäure lange *linker*-Region verbunden. Alle Aminosäuren sind in der Elektronendichte gut definiert. Der *p-loop* (Thr151-Lys159) gehört zu den Regionen, die innerhalb der Familie der Adenylat-bildenden Enzymen den höchsten Konservierungsgrad aufweisen (Yonus et al., 2008) und weist beim Vergleich der hier beschriebenen DltA-Struktur mit der bereits publizierten DltA-Struktur von *Bacillus subtilis* (pdb-Code 3E7W, Raumgruppe I222 und pdb-Code 3E7X, Raumgruppe P2₁2₁2₁, (Yonus et al., 2008)) die gleiche Konformation auf. Die Bindung des AMP im aktiven Zentrum wird sowohl von Aminosäuren aus der N- und C-terminalen Domäne, als auch von Aminosäuren aus der *linker*-Region realisiert und wurde bereits in Kapitel 1.3.1. beschrieben. DltA kristallisierte in der Transfer-Konformation in Anwesenheit des Liganden AMP sowie von einem HEPES- und zwei MPD-Molekülen aus dem Kristallisationspuffer. AMP ist ein Reaktionsprodukt der DltA-katalysierten Reaktion. In den bereits publizierten DltA-Strukturen von *Bacillus subtilis* (Yonus et al., 2008) sowie in den Strukturen des DltA-DltC-Komplexes (in dieser Arbeit) wurden Mg²⁺, ATP und D-Ala für die Kristallisation eingesetzt. Dabei konnte jedoch jeweils nur ein AMP-Molekül im aktiven Zentrum der DltA-Kristallstruktur beobachtet werden. Ausgehend von dieser Erkenntnis erfolgte die Kristallisation von DltA deshalb in Anwesenheit von AMP. Bei der eingesetzten Konzentration von 3 mM AMP kann unter Berücksichtigung der Affinität ($K_D = 529 \mu\text{M}$, Kapitel 3.1.4.3 in dieser Arbeit) eine Sättigung von DltA mit AMP von ca. 84 % angenommen werden. Die Anwesenheit von AMP stellt somit ein geeignetes Mimetikum zur Stabilisierung der Transfer-Konformation des DltA dar. Analog zu den bereits publizierten Strukturen von DltA (pdb-Code 3E7W und pdb-Code 3E7X (Yonus et al., 2008)) wurde DltA in dieser Arbeit ebenfalls in Anwesenheit von *holo*-DltC kristallisiert, welches jedoch nicht Teil der Röntgenkristallstruktur ist.

Eine Überlagerung durch SuperPose (Krissinel and Henrick, 2004) von DltA aus dieser Arbeit mit DltA (pdb-Code 3E7W) resultierte in einer mittleren *r.m.s.d.* der C α -C α -Koordinaten von 0,8776 über 498 Aminosäuren und eine Überlagerung mit DltA (pdb-Code 3E7X) resultierte in einer mittleren *r.m.s.d.* von 0,6703 über 496 Aminosäuren. Aus Abbildung 3.6 (a) wird ersichtlich, dass bei Überlagerung der Vollängen-Proteine die kleine C-terminalen Domäne geringfügig abweichende Orientierungen im Vergleich zur großen N-terminalen Domäne aufweist. Aus diesem Grund wurden die Überlagerungen für die isolierte C-terminale Domäne erneut durchgeführt. Die Überlagerung mit der kleinen Domäne von DltA (pdb-Code 3E7W) resultierte in eine *r.m.s.d.* von 0,7314 über 106 Aminosäuren. Die Überlagerung mit der kleinen C-terminalen Domäne von DltA (pdb-Code 3E7X) ergab dabei eine *r.m.s.d.* von 0,8086 über 108 Aminosäuren. Dabei können größere Abweichungen zwischen den beiden DltA-Strukturen in der großen Domäne innerhalb der *loop*-Region zwischen Ala106-Gln116, zwischen Asn129-Gly131 sowie zwischen Phe370-Trp376 beobachtet werden. Im Vergleich der kleinen C-terminalen Domänen können größere Abweichungen in der *loop*-Region zwischen Thr487-Lys491 sowie in der Position des Gly435 festgestellt werden. Interessanterweise liegt die Aminosäure Asn489, für die eine nach dem Ramachandran-Plot

abweichende ϕ/ψ -Winkelkombination festgestellt wurde, innerhalb dieser *loop*-Region. Die ϕ/ψ -Winkelkombination von Val300 weichen in den Strukturen von DltA (pdb-Code 3E7W und pdb-Code 3E7X, (Yonus et al., 2008)) ebenfalls von den im Ramachandran Plot erlaubten Bereichen ab.

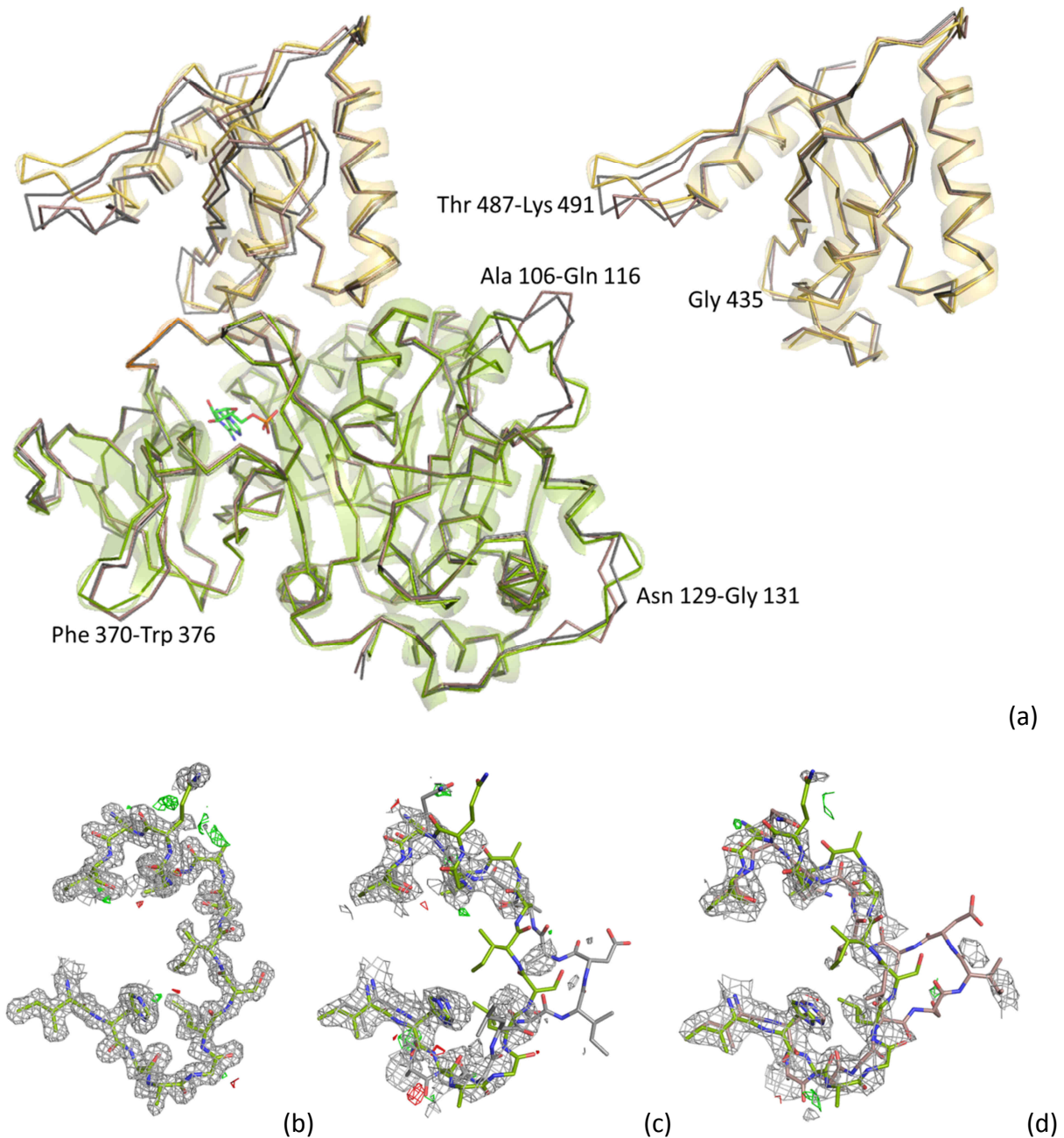


Abbildung 3.6 Röntgenkristallstrukturen von DltA. (a) Röntgenkristallstruktur von DltA, überlagert mit DltA von *Bacillus subtilis* (pdb-Code 3E7W und pdb-Code 3E7X, (Yonus et al., 2008)). Links Überlagerung N- und C-terminale Domäne, rechts Überlagerung C-terminale Domäne. (b)-(d) Elektronendichte im Bereich Ile114-Ile118. (b) DltA aus dieser Arbeit. Elektronendichte-Karte durch Verfeinerung der Koordinaten von DltA (pdb-Code 3E7W) (c) und DltA pdb-Code 3E7X (d) gegen die Strukturfaktoramplituden von DltA aus dieser Arbeit. Die große Domäne von DltA (aus dieser Arbeit) ist grün, die kleine Domäne gelb und die *linker*-Region orange koloriert. DltA (pdb-Code 3E7W) ist grau und DltA (pdb-Code 3E7X) rosa gezeigt. Die $2F_o - F_c$ Elektronendichte (1σ) ist grau und die $F_o - F_c$ Differenzelektronendichte ($+3\sigma / -3\sigma$) grün/rot koloriert.

Alle beobachteten Unterschiede liegen innerhalb Solvens-exponierter Bereiche und sind an der Ausbildung von Kontakten zu symmetrieverwandten Molekülen beteiligt. Der größte Unterschied konnte dabei in der *loop*-Region zwischen Ala106 und Gln116 beobachtet werden. Die Elektronendichte von DltA aus dieser Arbeit ist in diesem Bereich sehr gut definiert (Abbildung 3.6(b)). Im Gegensatz dazu ist die Elektronendichte in diesem Bereich in den Strukturen von DltA (pdb-Code 3E7W und pdb-Code 3E7X, (Yonus et al., 2008)) jedoch nur ungenügend definiert. Eine Verfeinerung der höher aufgelösten Struktur von DltA aus dieser Arbeit gegen die beobachteten Strukturfaktoramplituden von DltA (pdb-Code 3E7W) und DltA (pdb-Code 3E7X) ergab, dass die Position dieser *loop*-Region in der Struktur (pdb-Code 3E7X) der *loop*-Region von DltA aus dieser Arbeit ähnelt (Abbildung 3.6(d)). Die genaue Position dieser *loop*-Region in der Struktur von DltA (pdb-Code 3E7W) konnte auch unter Verwendung der Koordinaten der hochaufgelösten Struktur nicht eindeutig definiert werden (Abbildung 3.6(c)), so dass ein Vergleich dieser Region keine eindeutigen Aussagen liefert.

3.1.4. Analyse der Liganden-Bindung und Konformationen von DltA

Ausgehend von den Kristallstrukturen von DltA aus *Bacillus subtilis* sowie verwandter Proteine wurden in Abhängigkeit der Substrate (D-Ala, ATP) oder Produkte (D-Ala-Adenylat, AMP) verschiedene Konformationen beobachtet (Kapitel 1.3.2.). In den Kristallstrukturen von DltA aus *Bacillus subtilis* (pdb Codes 3E7W, 3E7X (Yonus et al., 2008)) konnte ein AMP-Molekül im aktiven Zentrum des DltA beobachtet werden, obwohl die Kristallisation in Anwesenheit von ATP und D-Ala durchgeführt wurde. DltA nimmt dabei die Transfer-Konformation ein. Für verwandte Proteine konnten zusätzlich eine Adenylierungs-Konformation (in Anwesenheit von ATP) sowie eine offene Konformation (ohne Ligand) beschrieben werden. Dabei stellt sich die Frage, ob DltA von *Bacillus subtilis* in Lösung ebenfalls die Adenylierungs- bzw. die offene Konformation einnehmen kann. Weiterhin sollte untersucht werden, ob AMP in der Lage ist, in DltA die Transfer-Konformation zu stabilisieren. Dafür wurde sowohl native Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie, als auch limitierte Proteolyse durchgeführt. Weiterhin sollte die Affinität der Liganden AMP, AMPCPP sowie D-Ala für DltA mittels isothermaler Titrationskalorimetrie charakterisiert werden.

3.1.4.1. Konformationelle Analyse mittel nativer Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie

Native ESI-Massenspektren und die Ionenmobilität von Peaks ausgewählter Ladungszustände von DltA ohne Nukleotid sowie in Anwesenheit von AMP oder AMPCPP wurden analysiert. Die Verteilung der Ladungszustände im ESI-Massenspektrum gibt Auskünfte über die Größe der Oberfläche des analysierten Proteins. Je denaturierter das Protein vorliegt, desto größer ist Oberfläche und umso höher ist seine Ladung. Dementsprechend sind die Peaks von denaturierten Proteinen im kleinen m/z Bereich vorzufinden. Das m/z Spektrum von DltA in Anwesenheit von AMP ist exemplarisch dargestellt und weist drei Peaks mit Ladungszuständen von 10, 11 und 12 auf (Abbildung 3.7(a)).

In der Ionenmobilitätszelle werden die positiv geladenen Proteine durch ein periodisches elektrisches Feld geleitet. Kollisionen mit Molekülen eines inerten Driftgases führen zu einer Retention in der Driftzeit. Dabei nimmt die Anzahl an Kollisionen mit der Größe der Proteinoberfläche zu. Kleine, kompakte Proteine weisen daher im Vergleich zu großen, expandierten Proteinen (bei gleichem Masse/Ladungsverhältnis) eine kürzere Driftzeit auf. Dabei sind bereits Unterschiede in der Oberfläche von 2-3% detektierbar (Konijnenberg et al., 2013).

Die Analyse der Ionenmobilität des Ladungszustands 11 der DltA-Probe ohne Nukleotid sowie in Anwesenheit von AMP und AMPCPP ergibt unterschiedliche Driftzeiten (Abbildung 3.7(b)), was auf unterschiedliche Konformationen zurückgeführt werden kann. In Anwesenheit von AMP wurde die kürzeste Driftzeit beobachtet. Dementsprechend stellt die Transfer-Konformation die kompakteste Form des DltA dar. Im Gegensatz dazu wies die Adenylierungs-Konformation die größte Driftzeit auf und kann demzufolge als die am meisten expandierte Konformation angesehen werden. Die Driftzeit in Abwesenheit eines Nukleotides liegt zwischen den anderen beiden Peaks. Interessanterweise umfasst die Breite des Peaks von DltA ohne Nukleotid die beiden angrenzenden Peaks in Anwesenheit von AMP und ATP. Somit kann die offene Form eine gewisse konformationelle Flexibilität aufweisen. Vermutlich ist DltA in Abwesenheit eines Nukleotides flexibler und demzufolge in der Lage, verschiedene Konformationen einzunehmen.

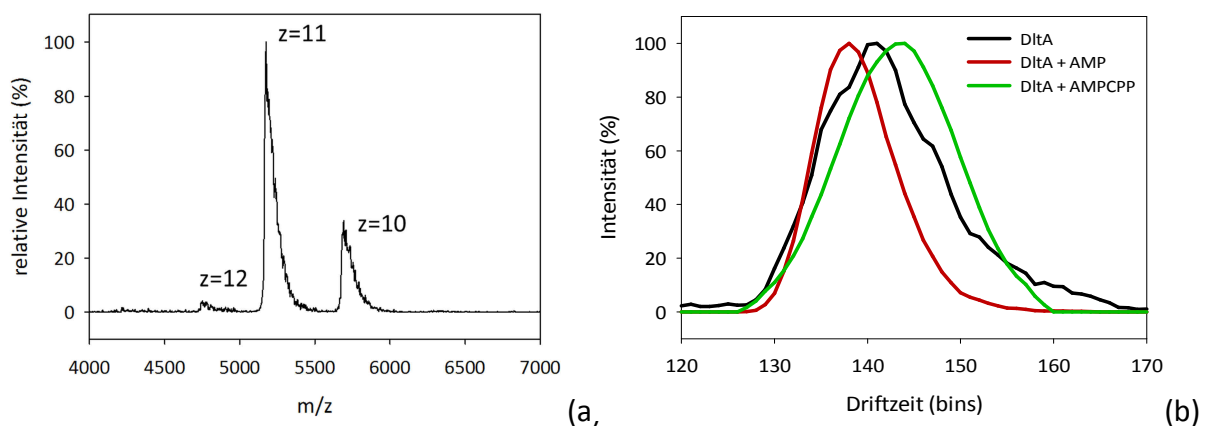


Abbildung 3.7 **Native Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie von DltA. (a) m/z-Spektrum von DltA in Anwesenheit von AMP. (b) Driftzeitanalyse des Ladungszustandes 11 von DltA.** In Anwesenheit von AMP (rot), AMPCPP (grün) und in Nukleotid-freier Form (schwarz).

Es kann festgestellt werden, dass für DltA drei verschiedene Konformationen in Abhängigkeit des Liganden (AMP, AMPCPP, ohne Ligand) beobachtet werden können. Die offene Konformation ist vermutlich flexibel und kann dementsprechend auch im Gleichgewicht mit der Transfer- und Adenylierungs-Konformation vorliegen. Weiterhin kann festgestellt werden, dass AMP in der Lage ist, eine definierte Konformation von DltA zu stabilisieren, wobei es sich vermutlich um die Transfer-Konformation handelt. Demzufolge stellt AMP ein geeignetes Adenylat-Mimetikum dar und kann für weitere Experimente genutzt werden, um die Transfer-Konformation von DltA zu analysieren.

3.1.4.2. Konformationelle Analyse durch limitierte Proteolyse

Zusätzlich zur Analyse der möglichen DltA-Konformationen mittels nativer Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie wurde eine limitierte Proteolyse von DltA in Abhängigkeit von AMP, ATP, AMPCPP sowie ohne Liganden mittels Trypsin durchgeführt. Unterschiedliche Konformationen von DltA sind durch unterschiedliche Kontakte zwischen der kleinen und großen Domäne charakterisiert, die durch eine flexible Region miteinander verbunden sind (Abbildung 3.8(b)-(d)). DltA enthält 27 Lysine und 15 Arginine. Durch eine limitierte Proteolyse mittels Trypsin wurde die Zugänglichkeit dieser Aminosäuren in Abhängigkeit von der Konformation analysiert.

Es ist ersichtlich, dass unter allen gewählten Bedingungen nur ein Spaltprodukt beobachtet werden konnte (Abbildung 3.8 (a)). Die Analyse mittels ESI-Massenspektrometrie (Anhang, Abbildung 0.5) ergab, dass die Spaltung nach dem konservierten Lys402 erfolgte, welches innerhalb des ersten β -Faltblatts in der kleinen Domäne lokalisiert ist (pdb-Code 3E7W, (Yonus et al., 2008)). In Abwesenheit eines Nukleotides bzw. in Anwesenheit von ATP konnte bereits nach einer min eine Spaltung beobachtet werden kann, während in Anwesenheit von AMP oder des ATP-Analogons AMPCPP die zusätzliche Bande erst ab 3 min sichtbar wurde. Äquivalente Mengen von gespaltenem und ungespaltenem DltA können ohne Ligand bereits nach 5 min, in Anwesenheit von ATP oder AMPCPP nach 5-7 min und in Anwesenheit von AMP nach 7-10 min beobachtet werden. Lys402 weist in verschiedenen DltA-Konformationen vermutlich eine veränderte Zugänglichkeit für Trypsin auf (Abbildung 3.8 (b)-(d)).

In der Transfer-Konformation ist Lys402 in das aktive Zentrum gerichtet und weist damit eine geringe Zugänglichkeit für Trypsin auf (Abbildung 3.8 (b)). Im Gegensatz dazu weist diese Aminosäure in der offenen oder Adenylierungs-Konformation eine gute Zugänglichkeit für Trypsin auf (Abbildung 3.8 (a) und (c)).

Es kann festgestellt werden, dass aufgrund der Ergebnisse der nativen Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie als auch der limitierten Proteolyse unterschiedliche Konformationen für DltA in Abhängigkeit des gebundenen Liganden vermutet werden können. Dabei stellt die AMP-induzierte Konformation die am stärksten komprimierteste Form dar, während der offenen Form die höchste Flexibilität zugeordnet werden kann.

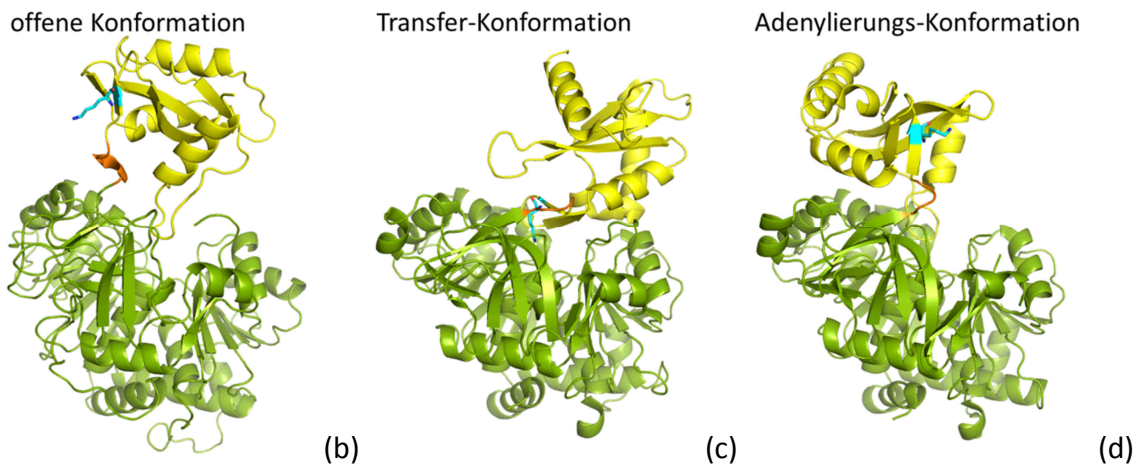
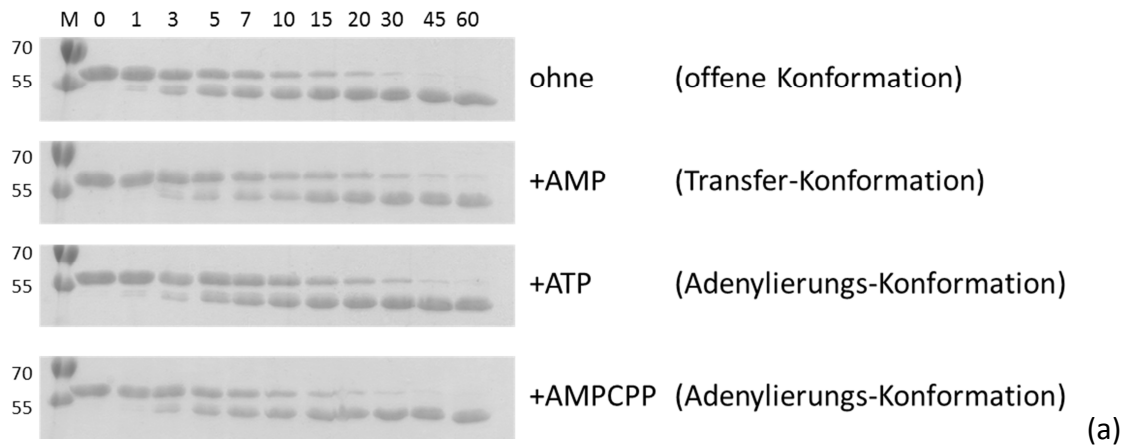


Abbildung 3.8 **Limitierte Proteolyse von DltA und Zugänglichkeit des Lys402.** (a) SDS-PAGE des tryptischen Verdaus von DltA. M: Marker (kDa), von links nach rechts: Zeit in Minuten. (b) Leuchtkäfer-Luziferase in der offenen Konformation (pdb-Code 1BA3 (Franks et al., 1998)). (c) DltA von *Bacillus subtilis* in der Transfer-Konformation (pdb-Code 3E7W (Yonus et al., 2008)) (d) DltA von *Bacillus cereus* in der Adenylierungs-Konformation (pdb-Code 3FCC (Osman et al., 2009)) Die große Domäne ist grün, die kleine Domäne gelb, die linker-Region orange und Lys402 (Lys403 im *Bacillus cereus* DltA, Lys443 in der Leuchtkäfer-Luziferase) als stick-Darstellung blau koloriert.

3.1.4.3. Liganden-Bindung an DltA

Die Charakterisierung der thermodynamischen Parameter der Bindung zwischen DltA und den Liganden AMP, AMPCPP und D-Ala erfolgte mittels isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC). Mit einem Experiment können dabei sowohl K_D , ΔH und über die Gibbs-Helmholtz-Gleichung bei gegebener Temperatur auch ΔS und ΔG ermittelt werden.

Unerwarteterweise sind die beobachteten Affinitäten von DltA zu dem Substrat-Analogen AMPCPP ($K_D = 552 \mu\text{M}$) sowie zu dem Reaktionsprodukt AMP ($K_D = 529 \mu\text{M}$) sehr ähnlich (Tabelle 3.3 und Anhang Abbildung 0.7). In diesem Versuch konnte demnach keine präferentielle Bindung zu dem Substrat-Analogen beobachtet werden. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Bindung zu dem nicht-hydrolysierbaren Nukleotidanalogen AMPCPP mit einer niedrigeren Affinität erfolgen kann als die Bindung zum natürlichen Substrat ATP. Die vorherige Sättigung von DltA mit D-Ala führt nicht zur Erhöhung der Affinität für AMPCPP (Tabelle 3.3 und Anhang Abbildung 0.7). Sowohl bei der Titration von D-Ala zu DltA allein, als auch in Gegenwart von 2 mM AMPCPP (nicht gezeigt) konnte kein

auswertbares Titrationsexperiment erzielt werden. Für die sehr schwache Interaktion kann ein K_D im millimolaren Bereich vermutet werden. Die vorherige Bindung von AMPCPP an DltA kann die Affinität für D-Ala nicht erhöhen.

Ligand	AMPCPP	AMPCPP	AMP	D-Ala	D-Ala
Protein in der Zelle	DltA	DltA + D-Ala	DltA	DltA	DltA + AMPCPP
[Ligand] (mM)	6	2	3	10	6
[DltA] (μ M)	200	200 + 3 mM D-Ala	150	1000	165 + 1 mM AMPCPP
K_D (μ M)	552 \pm 34	719 \pm 66	529 \pm 31	n.a.	n.a.
N (DltC / DltA)	0,9 \pm 0,1	0,54 \pm 0,33	1,1 \pm 0,1	n.a.	n.a.
ΔH (cal mol ⁻¹)	-14830 \pm 1516	-25160 \pm 17140	-18440 \pm 2354	n.a.	n.a.
ΔS (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	-34,8	-70	-46,9	n.a.	n.a.
T (K)	298,15	298,15	298,15	298,15	298,15
ΔG (cal mol ⁻¹)	-4454	-4290	-4457	n.a.	n.a.

Tabelle 3.3 **Thermodynamische Parameter für die Titration von AMPCPP und AMP zu DltA.** n.a. nicht auswertbar.

Es wurde vermutet, dass DltA eine höhere Affinität zum Substrat als zum Reaktionsprodukt aufweist. Jedoch sind die Affinitäten für das Substrat und auch das Produkt sehr ähnlich, was eventuell auf die Verwendung von AMPCPP als Substrat-Analogon zurückgeführt werden kann. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die zellulären Konzentrationen an ATP zwischen 1-10 mM liegen. Diese sind 10-mal höher als die AMP-Konzentrationen (Buckstein et al., 2008; Beis and Newsholme, 1975). Eine Bindung des ATP (AMPCPP) als Substrat und eine Dissoziation des AMP als Produkt könnte demzufolge unter zellulären Bedingungen erfolgen. Weiterhin kann für die Bindung der Substrate ATP und D-Ala eine sequentiell zufällige Bindung vermutet werden, da die Anwesenheit des ersten Substrates keine Auswirkung auf die Affinität zum zweiten Substrat hat.

3.2. Röntgenstrukturanalyse des DltA-DltC-Komplexes

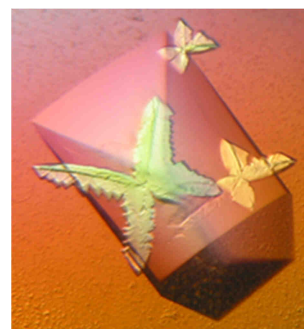
3.2.1. Kristallisation, Datensammlung und Prozessierung

DltA-DltC-Kristalle wurden nach Optimierung der Kristallisation (Kapitel 2.9.1.2.) bei 20°C erhalten. Das Verhältnis von Proteinlösung zur Reservoirlösung betrug 1 μ l:1 μ l.

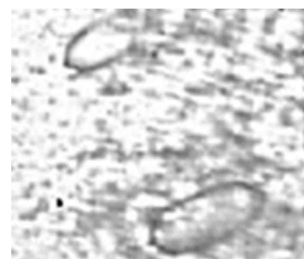
Die Kristalle der Kristallform I (Abbildung 3.9) kristallisierten in der trigonalen Raumgruppe P312₁ und streuten mit einer maximalen Auflösung von 3,2 Å, während die Kristalle der Kristallform II (Abbildung 3.10) in der orthorhombischen Raumgruppe P2₁2₁2₁ kristallisierten und bis zu einer Auflösung von 1,9 Å streuten. Die Sammlung der Diffraktionsdaten erfolgte an der Beamline 14.1 am BESSY II am Helmholtz-Zentrum Berlin. Die Prozessierung der Datensätze erfolgte mittels XDS (Kabsch, 2010). Die Zellparameter sowie die Statistik zur Datensammlung sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Für den Komplex in der Raumgruppe P312₁ konnte mittels Phenix-Xtriage eine merohedrale Verzwilligung mit einem Anteil von 4,3% festgestellt werden.

Bedingung 1

Protein-Puffer	50 mM HEPES/NaOH, 150 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ , 5 mM TCEP, 10 mM AMP, pH 7,8
Protein-Konzentration	350 μM (20 mg/ml) DltA, 1000 μM (10 mg/ml) <i>holo</i> -DltC
Kristallisations-Puffer	90 mM NaNO ₃ , Na ₂ HPO ₄ /(NH ₄) ₂ SO ₄ , 100 mM MOPS/100 mM HEPES pH 7,5, 42,5% 2-Methyl-2,4-Pentandiol (MPD)/PEG1K/PEG 3350, 100 mM NaBr

Abbildung 3.9 **DltA-DltC-Kristall aus Bedingung 1.****Bedingung 2**

Protein-Puffer	50 mM HEPES/NaOH, 150 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ , 3 mM ATP, 3 mM D-Ala pH 7,8
Protein-Konzentration	300 μM (17,1 mg/ml) DltA, 600 μM (6,2 mg/ml) <i>holo</i> -DltC
Kristallisations-Puffer	3 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1 % 2-Methyl-2,4-Pentandiol (MPD)

Abbildung 3.10 **DltA-DltC-Kristall aus Bedingung 2.**

Datensammlung	Kristallform I	Kristallform II
Raumgruppe	P312 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Elementarzelle	a=b=95,4 Å c=300,2 Å α=β=90° γ=120°	a=64,1 Å b=95,2 Å c=99,5 Å α=β=γ=90°
maximale Auflösung	3,2 Å	1,9 Å
DltA-DltC-Komplex-Moleküle in der asymmetrischen Einheit	2	1
R _{merge}	9,1% (52%)	4,6% (35,5%)
I/σI	12,41 (3,27)	24,47 (4,47)
Vollständigkeit	99,4% (99,9%)	99,5% (99,9%)
Redundanz	5,3 (5,6)	4,5 (4,5)
unabhängige Reflexe	16179	48556 (6846)
Zwillingsgesetz	-h, -k, l	-
Verzwilligungsanteil	4,3%	-

Tabelle 3.4 **Zellparameter und Statistiken zur Datensammlung von DltA-DltC-Kristallen.** Die Werte in runden Klammern entsprechen der letzten Auflösungsschale, $\sigma I = I_{\text{obs}} - I_{\text{true}}$, $R_{\text{merge}} = \sum_h \sum_{i=1}^N |I_{(h)} - \bar{I}_{(h)}| / \sum_h \sum_{i=1}^N I_{(h)}$.

3.2.2. Phasierung, Strukturbau, Verfeinerung und Validierung

Die Lösung des Phasenproblems mittels *molecular replacement* wurde für den Komplex der orthorhombischen Raumgruppe (Kristallform II) mittels Phaser (CCP4) (McCoy et al., 2007) durchgeführt. Als Suchmodell diente dabei DltA (pdb-Code 3E7W, (Yonus et al., 2008)) sowie DltC (pdb-Code 4BPH, (Zimmermann, 2011)). Für den Komplex in der trigonalen Raumgruppe (Kristallform I) wurde Phenix-Phaser (Adams et al., 2010) mit DltA (aus dieser Arbeit) als Suchmodell verwendet. DltC wurde manuell in die Elektronendichte eingepasst.

Verfeinerung	P312 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
R _{work}	22,7%	19,0%
R _{free}	26,0%	24,5%
Größe Testset	5%	5%

Validierung	P312 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Ziel
Anzahl der Proteinantome	8798	4670	
Liganden	2x AMP, 2x Ppant	AMP	
Puffermoleküle	-	4x MPD	
Anzahl Wasseratome	0	289	
<i>poor Rotamers</i>	4 (0,41%)	19 (3,75%)	<1%
Ramachandran <i>outlier</i>	0 (0%)	2 (0,34%)	<0,05%
Ramachandran <i>favoured</i>	1076 (96,76%)	567 (97,42%)	>98%
<i>r.m.s.d.</i> C β -Abweichung >0,25 Å	0 (0%)	8 (1,43%)	0
<i>r.m.s.d.</i> Winkel	1,593	1,932	
<i>r.m.s.d.</i> Bindungen	0,011	0,024	
MolProbity score	1,56	1,92	

Tabelle 3.5 Ergebnisse der Verfeinerung und Strukturvalidierung nach MolProbity

3.2.3. Strukturbeschreibung des DltA-DltC-Komplexes (Kristallform I)

Es liegen zwei Moleküle des DltA-DltC-Komplexes in der asymmetrischen Einheit vor. Im Monomer 1 ist die Elektronendichte für die Aminosäuren 1-502 des DltA gut definiert, während für Val503 sowie dem C-terminalen His₆-tag keine Elektronendichte vorhanden ist. Im Molekül 2 ist die Elektronendichte für die *loop*-Region, gebildet von Ile444-Glu454 sowie den 26 C-terminalen Aminosäuren (ab Phe478) nicht definiert. Für das DltC im Monomer 1 ist die Elektronendichte innerhalb der Aminosäuren 4-79 und im Monomer 2 in den Regionen 2-79 vorhanden. In den DltA-Molekülen ist die Elektronendichte sowohl für das Peptidrückgrat, als auch für die Seitenketten gut definiert. Nur in Solvens-exponierten Bereichen kann häufig keine Elektronendichte für große flexible Seitenketten gefunden werden, während innerhalb der DltC-Moleküle ein Fehlen der Elektronendichte für große Seitenketten auch in nicht Solvens-exponierten Bereichen zu beobachten ist. In diesen Fällen wurden die statistisch am häufigsten auftretenden Rotamere eingebaut und der Besetzungsgrad auf 0 herabgesetzt. Aufgrund der Anordnung der DltA-DltC-Moleküle im Kristallgitter kann die C-terminale Helix von DltA (Kette A) Kontakte zu der C-terminalen Helix eines Symmetrie-verwandten Moleküls von DltA (Kette A) ausbilden. Diese Stabilisierung ist in der Kette B nicht möglich, da hier unterschiedliche Kontakte zu Symmetrie-verwandten Molekülen ausgebildet werden. Eine Überlagerung von dem

Komplex-Molekül 1 mit dem Komplex-Molekül 2 resultierte in einer mittleren *r.m.s.d.* der C α -C α -Koordinaten von 0,5148 über 542 Aminosäuren. Mit Ausnahme fehlenden Elektronendichte in den bereits beschriebenen Regionen der Kette B können keine signifikanten Unterschiede von DltA der Kette B im Vergleich mit der Kette A beobachtet werden. Die DltC-Moleküle der Kette C und D weisen eine geringfügig unterschiedliche Orientierung zu DltA auf, so dass ebenfalls die Position des 4'-Phosphopantethein-Cofaktors leicht abweicht.

DltA liegt, wie in der im Kapitel 3.1.3. beschriebenen Struktur, in der Transfer-Konformation vor, während das DltC, wie bereits von ZIMMERMANN beschrieben (Zimmermann, 2011), in der A/H Konformation (Koglin et al., 2006) vorliegt. Für die Beschreibung der Bindung zwischen DltA und DltC wird das Molekül 1 verwendet (Ketten A, C), da hier eine besser definierte Elektronendichte beobachtet werden kann. DltC bindet in einer Spalte des DltA, welche von der großen und kleinen Domäne gebildet wird. Der 4'-Phosphopantethein-Cofaktor, der kovalent mit dem Ser36 des DltC verknüpft ist, ragt dabei in einen Tunnel direkt in das aktive Zentrum. Zur Interaktion zwischen DltA und DltC trägt der C-terminal gelegene Teil der ersten Helix von DltC, der *loop* zwischen Helix I und II, die Helix II, an deren N-terminalem Ende der Cofaktor gebunden ist, die Helix III sowie der sich anschließende *loop* bei. Wie bereits in (Conti et al., 1996; Conti et al., 1997; Yonus et al., 2008) beschrieben, ist die große Domäne von DltA in drei Subdomänen aufgeteilt (Abbildung 3.12). Kontakte zu DltC werden ausgehend von der Subdomäne B (der großen Domäne) sowie von der kleinen Domäne des DltA gebildet und wurden mittels PISA-Server identifiziert (Krissinel and Henrick, 2007). In der Kontaktfläche von DltC und der kleinen Domäne von DltA werden Wasserstoffbrückenbindungen vornehmlich von basischen Aminosäuren des DltA und sauren bzw. neutralen Aminosäuren innerhalb der Helix I und II sowie der *loop*-Region zwischen den beiden Helices des DltC ausgebildet (Abbildung 3.13 (a) und Tabelle 3.6). Der Bereich der Helices II und III sowie die *loop*-Region zwischen Helix III und IV des DltC bilden Kontakte zur großen Domäne des DltA aus. Neben Wasserstoffbrückenbindungen wird ein hydrophober Bereich zwischen MetA247, MetA250, ProA223 sowie PheA227 (A = DltA) und IleC56, der Methylgruppe des ThrC57, LeuC44, ValC40 und PheC37 (C = DltC) gebildet (Abbildung 3.13 (b) und Tabelle 3.6).

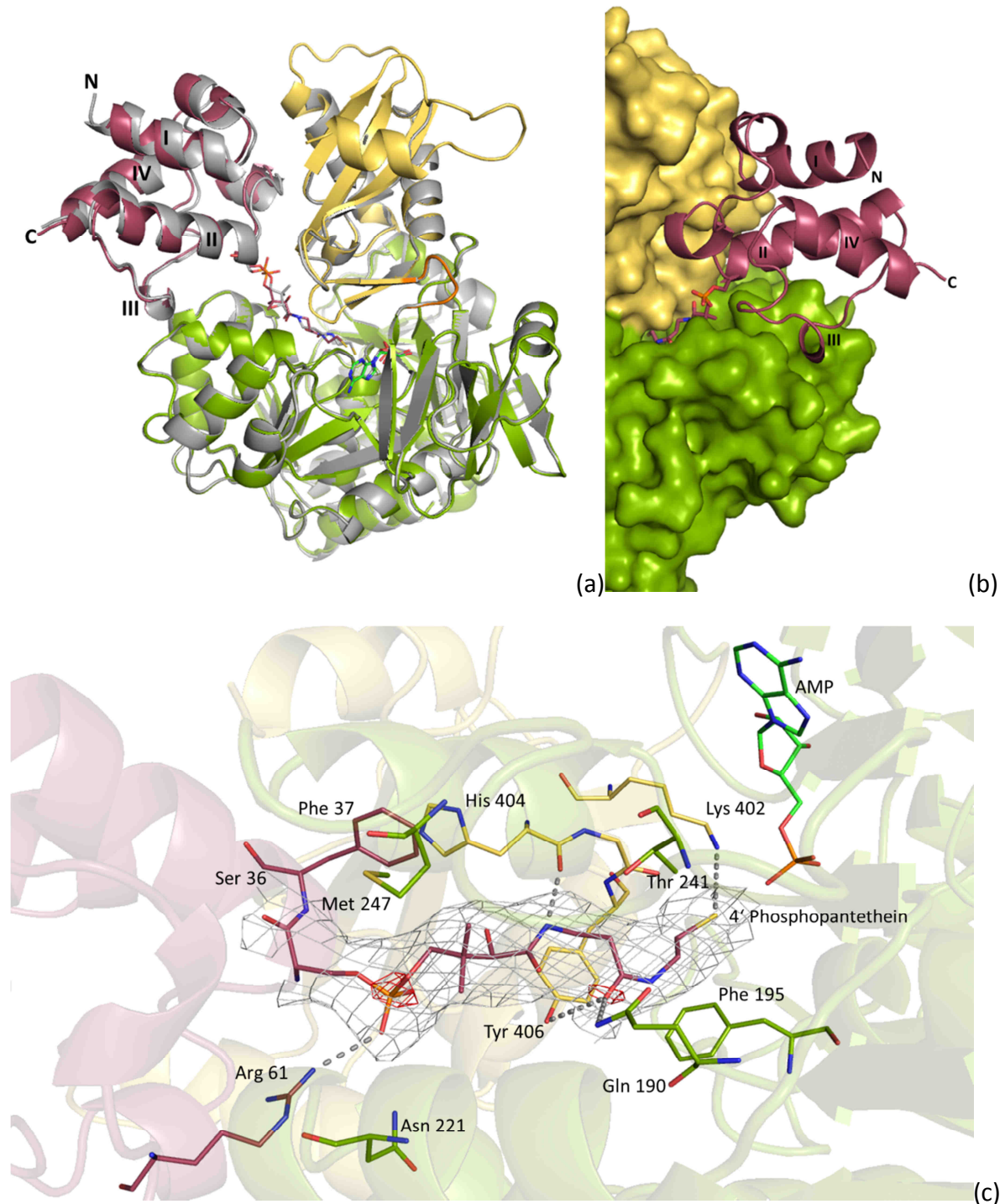


Abbildung 3.11 Röntgenkristallstruktur des DltA-DltC-Komplexes (Kristallform I). (a) Überlagerung von Komplex-Molekül 1 (Kette A,C) mit Komplex-Molekül 2 (Kette B, C). (b) Ausschnitt: Tunnel für den 4'-Phosphopantethein-Cofaktor des DltC. Molekül 1 (Kette A, C): Die große Domäne von DltA ist grün, die kleine Domäne gelb, die *loop*-Region orange und DltC in rot dargestellt. Molekül 2 (Kette B, D): grau. Der Cofaktor von *holo*-DltC, Ser36 und AMP sind in *stick*-Darstellung gezeigt. Die Helices von DltC sind vom N- zum C- Terminus nummeriert. (c) Cofactor-Bindetasche. AMP, Cofaktor sowie die Aminosäuren, die für seine Bindung verantwortlich sind, sind in *stick*-Darstellung. Grau ist die $2F_o - F_c$ des DltC Cofaktors (1σ), rot/grün ist die negative/positive $F_o - F_c$ Differenzelektronendichte ($+3\sigma / -3\sigma$). Der Cofaktor und die Aminosäuren von DltC sind rot, die der kleinen Domäne von DltA gelb und die der großen Domäne grün koloriert.

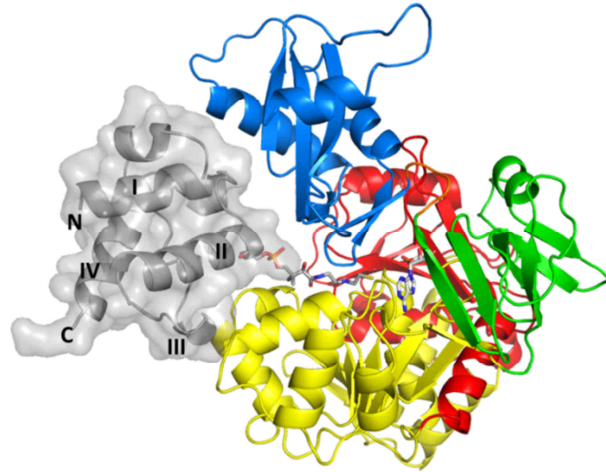


Abbildung 3.12 **Kontaktfläche im DltA-DltC-Komplex (Kristallform I)**. Die Subdomänen des DltA sind rot (Subdomäne A), gelb (Subdomäne B) und grün (Subdomäne C) koloriert. Die C-terminale Domäne ist blau und DltC grau dargestellt.

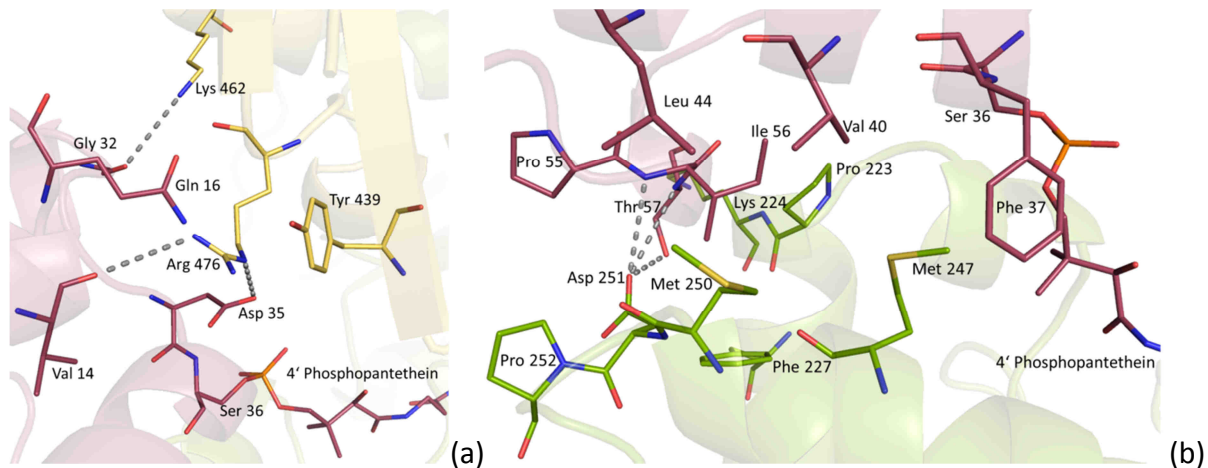


Abbildung 3.13 **Kontaktfläche von DltA und DltC (Kristallform I)**. DltC ist rot, die kleine Domäne des DltA gelb und die große Domäne des DltA grün dargestellt. **(a) Wechselwirkungen zwischen DltC und der kleinen Domäne von DltA (b) Wechselwirkungen zwischen DltC und der großen Domäne von DltA**. Es werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Aminosäuren des DltA und DltC ausgebildet. Zusätzlich kommt es zur Ausbildung einer hydrophoben Tasche in der Kontaktfläche zwischen DltC und der großen Domäne (Subdomäne b) von DltA.

Die durch den PISA-Server (Krissinel and Henrick, 2007) berechnete Kontaktfläche, einschließlich des 4'-Phosphopantethein-Cofaktors von DltC, beträgt 1093 \AA^2 pro Monomer. Die Elektronendichte für den Cofaktor ist sehr gut definiert, was auf dessen gute Fixierung hindeutet. Der Cofaktor wird durch hydrophobe Wechselwirkungen, ausgehend vom PheC37 und TyrA406, PheA195 und MetA247 und durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu ArgC61 sowie zu LysA402, TyrA406 und dem Carbonylsauerstoff des HisA404 stabilisiert. Die freie Thiolgruppe des Cofaktors ist in Richtung des AMP gerichtet. Nach Ausbildung des D-Ala-Adenylats wäre demnach eine Übertragung des D-Ala auf die Thiolgruppe des Cofaktors in dieser Position möglich (Abbildung 3.14).

Kontaktfläche 1 (DltC-kleine Domäne des DltA)				
DltA		DltC	Abstand (Å)	
Arg476	(Guanidinogruppe)	Val14	(Carbonylsauerstoff der Peptidbindung)	3,7
Arg476	(Guanidinogruppe)	Asp35	(Carboxylgruppe)	3,4
Lys462	(Aminogruppe)	Gly32	(Carbonylsauerstoff der Peptidbindung)	3,7
Kontaktfläche 2 (DltC-Subdomäne B des DltA)				
Asp251	(Carboxylgruppe)	Thr57	(Hydroxylgruppe)	2,9
Asp251	(Carboxylgruppe)	Thr57	(Amidstickstoff der Peptidbindung)	3,3
Asp251	(Carboxylgruppe)	Ile56	(Amidstickstoff der Peptidbindung)	3,7

Tabelle 3.6 **Wasserstoffbrückenbindungen im DltA-DltC Komplex (Kristallform I)**. Die Abstände des Wasserstoffbrücken-Donors und -Akzeptors liegen normalerweise zwischen 0,27 Å (O-H··O) und 0,31 Å (N-H··N). Aufgrund der niedrigen Auflösung von 3,2 Å, kann die exakte Position der Atome der Aminosäureseitenketten nicht genau festgelegt werden, sodass Abstände zwischen Wasserstoffbrücken-Donor und -Akzeptor bis 3,7 Å zugelassen wurden.

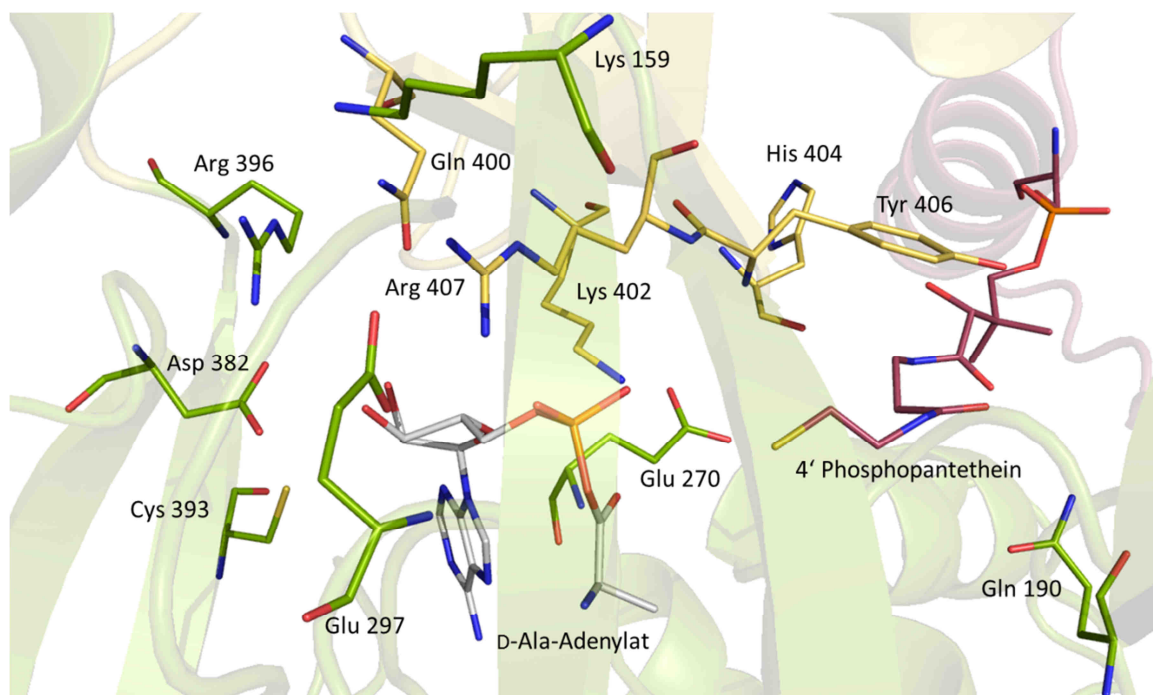


Abbildung 3.14 **Modell der D-Ala-Übertragung innerhalb des DltA-DltC Komplexes (Kristallform I)**. Dafür wurde DltA aus der DltA-DltC-Struktur (Kristallform I) mit dem DltA von *Bacillus cereus* (pdb-Code 3DHV, (Du et al., 2008)) in der Adenylierungskonformation überlagert. Das D-Ala-Adenylat aus dem aktiven Zentrum des DltA von *Bacillus cereus* konnte somit auf das aktive Zentrum des DltA von *Bacillus subtilis* im DltA-DltC-Komplex übertragen werden. Es ist ersichtlich, dass in dieser Konformation die Bindung des Adenylats im aktiven Zentrum von DltA und die Übertragung des D-Ala auf den 4' Phosphopantethein-Cofaktor des DltC erfolgen könnte. D-Ala-Adenylat aus DltA von *Bacillus cereus* ist grau dargestellt. Der Cofaktor und die Aminosäuren von DltC sind rot, die der kleinen Domäne von DltA gelb und die der großen Domäne grün koloriert.

3.2.4. Strukturbeschreibung des DltA-DltC Komplexes (Kristallform II)

Im Gegensatz zur Kristallform I kristallisiert der DltA-DltC-Komplex in der Raumgruppe $P2_12_12_1$ (Kristallform II) mit einem Molekül in der asymmetrischen Einheit. Dieser Komplex wurde mit einer Auflösung von 2,6 Å beschrieben (Zimmermann, 2011). Die in dieser Arbeit beschriebenen Kristallisationsbedingungen ergaben eine Verbesserung der Streueigenschaften der DltA-DltC-Kristalle.

DltA nimmt ebenfalls die Transfer-Konformation und DltC die A/H-Konformation ein. Obwohl für die Kristallisation ATP und D-Ala eingesetzt wurden, konnten neben 4 MPD Molekülen aus dem Kristallisationspuffer nur ein AMP-Molekül im aktiven Zentrum des DltA identifiziert werden. Für die Kristallisation wurde analog zur DltA-DltC-Struktur (Kristallform I) *holo*-DltC verwendet. Dennoch wurde keine Elektronendichte für den Cofaktor beobachtet (Abbildung 3.15(c)).

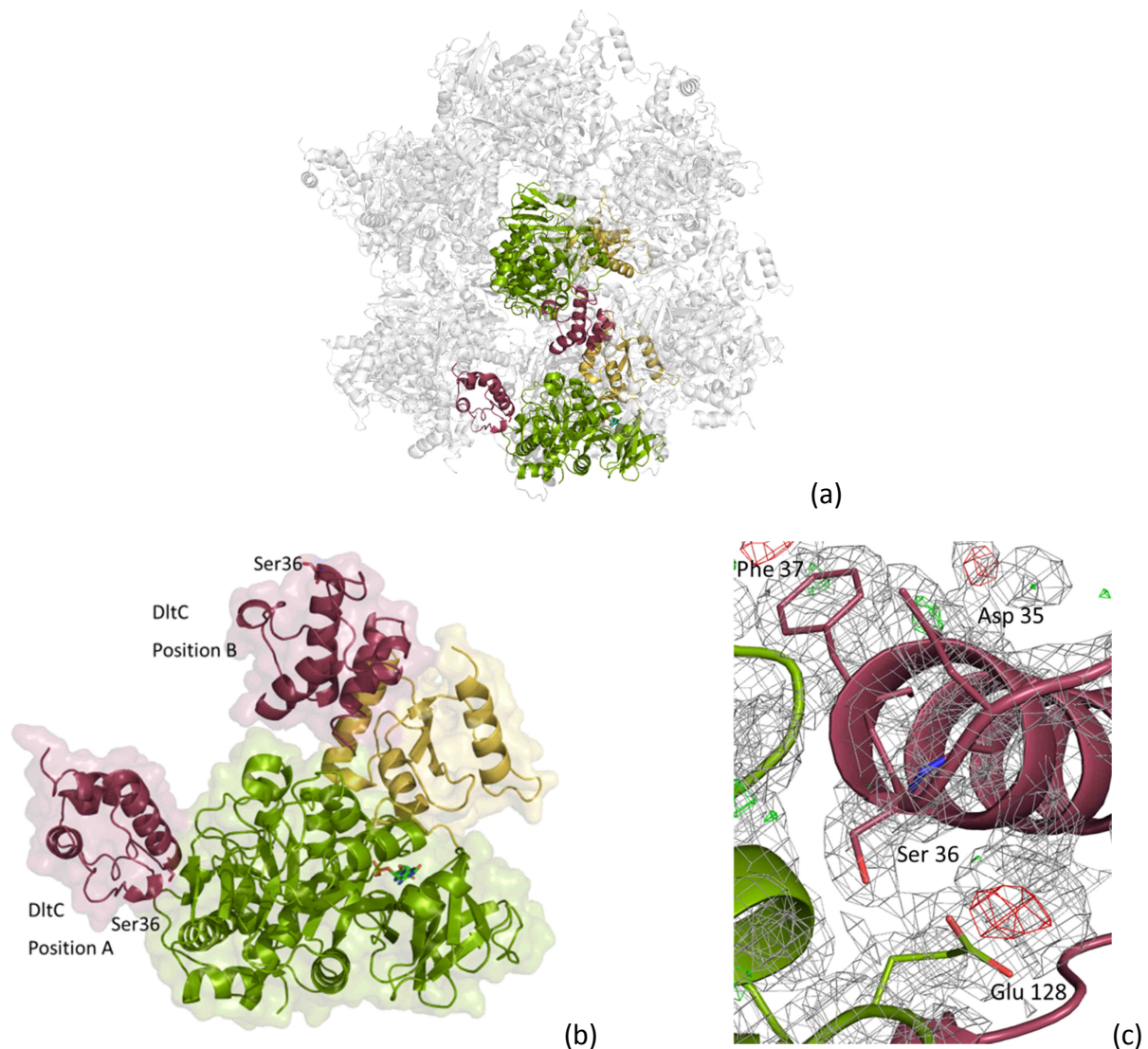


Abbildung 3.15 **Röntgenkristallstruktur des DltA-DltC-Komplex (Kristallform II)**. Zur Darstellung der Strukturen wurde die *cartoon*-Darstellung gewählt. Die große Domäne von DltA ist grün, die kleine Domäne gelb und DltC rot koloriert. **(a) Ausschnitt aus dem Kristallgitter. (b) Darstellung beider möglicher Bindestellen von DltC an DltA. (c) Elektronendichte im Bereich des Ser36 des DltC.** Zur Darstellung der Elektronendichte der DltC Aminosäuren Asp35, Ser36 und Phe37 sowie Glu128 von DltA ist die $2F_o-F_c$ Elektronendichte (1σ) grau und die F_o-F_c Differenzelektronendichte ($+3\sigma / -3\sigma$) grün/rot koloriert.

Dies kann auf unterschiedliche Ursachen zurückgeführt werden. Die Kristallisation erfolgte in Abwesenheit eines Reduktionsmittels. Mittels ESI-Massenspektrometrie sowie anhand der Bestimmung der freien Thiolgruppen nach ELLMAN unter nichtreduzierenden Bedingungen konnte eine Dimerisierung des DltC durch Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Phosphopantethein-Gruppen beobachtet werden, so dass eine produktive Bindung zwischen DltA und einem DltC-Monomer nicht mehr möglich ist. Die Co-Expression von *dltC* und *sfp*

resultierte in einer Cofaktor-Beladung von ca. 95%. Eine Ursache für das Fehlen der Elektronendichte kann somit sein, dass in diesem Fall der geringe Anteil von DltC ohne Cofaktor kristallisiert wurde. Eine weitere Möglichkeit stellt die Hydrolyse der Phosphoester-Bindung zum Ser36 während der Kristallisation dar. Ser36, welches an der Interaktion mit Glu128 von DltA beteiligt ist, liegt am Rand der DltA-DltC-Kontaktfläche und geht zudem keine Interaktionen mit Symmetrie-verwandten Molekülen ein, so dass dies auch eine Flexibilität des Cofaktors bedingen könnte.

Durch die Kristallsymmetrie sind zwei mögliche DltA-DltC-Komplex-Varianten möglich (Abbildung 3.15 (a)). In der Position A bindet DltC an der Subdomäne B der großen Domäne von DltA, weit entfernt vom aktiven Zentrum. In der Position B hingegen bindet DltC an die kleine Domäne von DltA. Dabei befindet sich Ser36 auf der DltA-abgewandten Seite des DltC (Abbildung 3.15(b)). Unerwarteter Weise haben die möglichen Kontaktflächen keine Ähnlichkeiten mit der DltC-Bindestelle im DltA-DltC Komplex der Kristallform I.

Mittels PISA-Server konnte für die DltA-DltC-Interaktion in der Position A der Kristallform II eine Kontaktfläche von 404 \AA^2 und für die Position B eine Fläche von 567 \AA^2 ermittelt werden. Im Vergleich mit der Interaktionsfläche von 1093 \AA^2 des DltA-DltC-Komplexes der Kristallform I sind die hier ermittelten Flächen sehr klein und nur wenige Aminosäuren sind an der Ausbildung beteiligt (Abbildung 3.16). In der Position A gehen wichtige Kontakte von GluA128 aus. Dabei werden Wasserstoffbrückenbindungen zum SerC36 und ArgC61 ausgebildet. Des Weiteren erfolgt die Ausbildung von Van-der-Waals-Kontakten durch PheC37, ValC40, LeuC44, IleC56 und PheC59 mit AlaA107, GlyA108 sowie mit den aliphatischen Bereichen von GluA125 und GluA128 (Abbildung 3.16 (a) und Tabelle 3.7).

Für die Interaktion in der Position B werden neben Wasserstoffbrückenbindungen zwischen DltC und der kleinen Domäne des DltA Van-der-Waals-Kontakte zwischen PheA455 und ValC10, AlaC45, PheC50 sowie dem aliphatischen Bereich von ArgC49 ausgebildet (Abbildung 3.16 (b) und Tabelle 3.7). Die tatsächliche Interaktionsstelle für DltC sowie die Relevanz und Funktion dieses unerwarteten Komplexes sind unklar und sollen durch Mutationsstudien untersucht werden.

Zur Inhibierung der Interaktion von DltC mit DltA der Position A wurden Glu125 sowie Glu128 des DltA zu Arg/Arg oder Arg/Trp mutiert. Die Arg/Arg-Variante weist im Vergleich zur Glu/Glu-Form eine gegensätzliche Ladung auf, während die Insertion eines Tryptophan an Position 128 aus sterischen Gründen eine Bindung unterdrücken sollte. Zur Abschwächung der Interaktion der Position B können nicht die entsprechenden Aminosäuren von DltA mutiert werden, da diese auch eine wichtige Funktion für die Interaktion im DltA-DltC-Komplex der Kristallform I aufweisen. Infolgedessen wurden Gln5, Asp9 und Asn48 von DltC zu Ala/Ala/Ala mutiert, um die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen abzuschwächen.

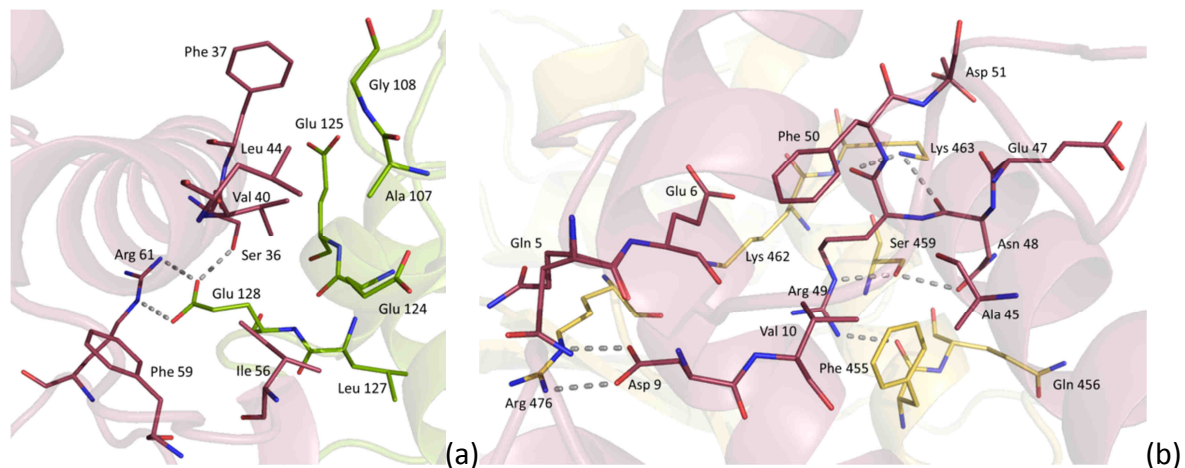


Abbildung 3.16 **Mögliche Interaktionsflächen des DltA-DltC-Komplexes (Kristallform II)**. Die gewählten Farben sind analog zu Abbildung 3.15. Für die Interaktion verantwortliche Aminosäuren sind in *stick*-Darstellung gezeigt. **(a) DltA-DltC-Interaktion Position A** Zwischen DltC und der Subdomäne B des DltA werden sowohl Wasserstoffbrückenbindungen, als auch Van-der-Waals-Kontakte ausgebildet. Die wichtigsten Interaktionen gehen dabei von Glu128 der großen Domäne des DltA aus. **(b) DltA-DltC-Interaktion Position B**. Neben Wasserstoffbrückenbindungen zwischen DltC und der kleinen Domäne des DltA werden zahlreiche Van-der-Waals-Kontakte ausgebildet.

Kontaktfläche A (DltC-Subdomäne B des DltA)				
DltA		DltC		Abstand (Å)
Glu128	(Carboxylgruppe)	Arg 61	(Guanidinogruppe)	3,0 / 3,0
Glu128	(Carboxylgruppe)	Ser 36	(Hydroxylgruppe)	2,5
Kontaktfläche B (DltC-kleine Domäne des DltA)				
Arg476	(Guanidinogruppe)	Asp 9	(Carboxylgruppe)	2,9 / 2,8
Phe455	(Carbonylsauerstoff der Peptidbindung)	Arg 49	(Guanidinogruppe)	3,1
Ser459	(Hydroxylgruppe)	Arg 49	(Guanidinogruppe)	2,7
Ser459	(Hydroxylgruppe)	Asn 48	(Säureamidgruppe)	2,7
Lys463	(Aminogruppe)	Arg 49	(Carbonylsauerstoff der Peptidbindung)	3,2

Tabelle 3.7 **Wasserstoffbrückenbindungen im DltA-DltC Komplex (Kristallform II)**.

3.2.5. Vergleich der Strukturen beider DltA-DltC-Komplexe

In beiden Kristallstrukturen des DltA-DltC-Komplexes können die gleichen Konformationen von DltA und DltC beobachtet werden. Eine Überlagerung der DltA- bzw. DltC-Strukturen aus beiden Varianten mit SuperPose resultiert in einer *r.m.s.d.* von 0,7395 Å über 500 Aminosäuren bzw. 0,5198 Å über 75 Aminosäuren. Es ist ersichtlich, dass keine großen Unterschiede innerhalb der DltA-Moleküle festgestellt werden können (Abbildung 3.17). Kleine Abweichungen können im Bereich Val114-Gln117, der an der Ausbildung von Kontakten zu DltC in der Position A (Kristallform II) beteiligt ist, beobachtet werden. Hier liegen die *r.m.s.d.* für die C α -C α -Positionen der Aminosäuren zwischen 1,22 Å und 1,71 Å, während die Abweichung in anderen Bereichen meist kleiner als 1 Å ist. Die kleine Domäne von DltA nimmt, im Vergleich der Strukturen aus beiden Komplex-Varianten, eine geringfügig unterschiedliche Orientierung zur großen Domäne ein. Zwischen den DltC-Molekülen können keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Im Gegensatz zur Struktur der

Kristallform I kann bei dem DltC innerhalb des DltA-DltC-Komplexes der Kristallform II jedoch keine Elektronendichte für den 4'-Phosphopantethein-Cofaktor beobachtet werden.

In der Kristallform I erfolgt die Bindung von DltC an die große und kleine Domäne von DltA. Diese Interaktion kann nur erfolgen, wenn DltA in der Transfer-Konformation vorliegt. In der offenen oder in der Adenylierungs-Konformation weist die kleine Domäne von DltA eine unterschiedliche Orientierung zur großen Domäne auf. Mögliche Interaktionen von DltC mit DltA in diesen beiden Konformationen wären demnach nur durch eine konformationelle Reorientierung oder durch Ausbildung einer neuen Kontaktfläche möglich. Im Gegensatz dazu wird die Kontaktfläche zwischen DltA und DltC im Komplex der Kristallform II nur von einer DltA-Domäne gebildet. Dadurch kann die kleine Domäne des DltA unterschiedliche Positionen einnehmen. Eine Interaktion zwischen DltC und DltA in der offenen oder in der Adenylierungs-Konformation erscheint somit möglich.

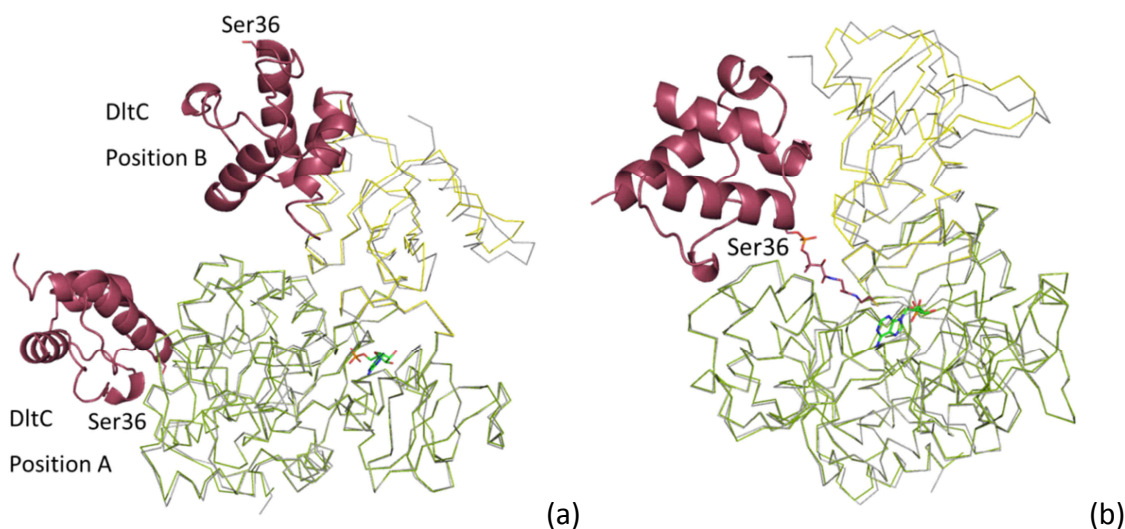


Abbildung 3.17 **Überlagerung der DltA-Moleküle aus den Strukturen der DltA-DltC-Komplexe.** DltA aus dem Komplex der Kristallform I ist grün (große Domäne) und gelb (kleine Domäne), DltA aus dem Komplex der Kristallform II grau und DltC rot koloriert. **(a) Mögliche Bindestellen des DltC im DltA-DltC-Komplex der Kristallform II. (b) DltA-DltC-Komplex Kristallform I.**

3.3. Biophysikalische und biochemische Charakterisierung der DltA-DltC-Interaktion

Im Kapitel 3.2. wurden zwei Röntgenkristallstrukturen des DltA-DltC-Komplexes beschrieben. In der Struktur der Kristallform I handelt es sich vermutlich um eine produktive Bindung von DltC zwischen der kleinen und der großen Domäne des DltA. Dabei ist der 4'-Phosphopantethein-Cofaktor des *holo*-DltC in das aktive Zentrum des DltA gerichtet, wodurch eine Übertragung des aktivierten D-Ala auf DltC ermöglicht werden könnte. Innerhalb der Struktur der Komplexform II konnte eine unerwartete, alternative Bindung von DltC an DltA beobachtet werden. Aufgrund der Anordnung des DltA-DltC-Moleküls im Kristallgitter gibt es zwei mögliche Bindungsstellen von DltC an DltA. DltC kann dabei entweder an die große Domäne des DltA (alternativer Komplex, Position A) oder an die kleine Domäne (alternativer Komplex, Position B) binden. Interessanterweise ist für den

DltC-Cofaktor im alternativen Komplex die Elektronendichte nicht definiert. Daraus ergeben sich folgende Fragen, die durch weitere geeignete Experimente untersucht wurden:

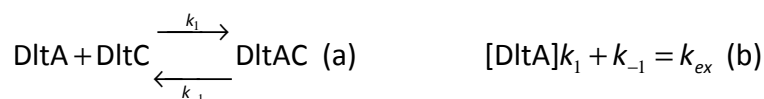
- Existieren beide, die alternative und die produktive, Komplexvarianten in Lösung?
- Bindet DltC nach der Position A oder B im alternativen Komplex?
- Warum fehlt der 4'-Phosphopantethein-Cofaktor in der Kristallstruktur des alternativen Komplexes?
- Welche Funktion hat die alternative Bindung von DltC an DltA?

3.3.1. NMR-spektroskopische Titration von DltA zu DltC (^{15}N , ^1H -TROSY HSQC)

Die Identifikation der Aminosäuren von DltC, die zur Interaktion mit DltA beitragen, kann Aufschluss darüber geben, ob beide Komplexvarianten (die produktive und die alternative) in Lösung vorliegen. Dabei soll zusätzlich analysiert werden, ob die Bindung von DltC an DltA im alternativen Komplex nach der Position A oder B erfolgt und welchen Anteil der Cofaktor bei der Interaktion von DltC mit DltA einnimmt.

Dafür wurden ^{15}N , ^1H -TROSY-HSQC- Spektren von ^{15}N markiertem *holo*-DltC bzw. *apo*-DltC S36A in Ab- und Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an DltA aufgenommen. Zur Stabilisierung der Transfer- oder offenen Konformation von DltA wurden die Experimente in An- oder Abwesenheit von AMP durchgeführt.

Das komplexierte DltC erfährt im Vergleich zum freien DltC durch die Bindung an DltA eine Änderung in der chemischen Umgebung, was sich in Änderungen der chemischen Verschiebung ($\Delta\omega = \omega_{\text{DltC}} - \omega_{\text{DltAC}}$) in der ^{15}N - und ^1H - Ebene sowie in Änderungen der Signalintensitäten der betroffenen Aminosäuren von DltC widerspiegelt.



Formel 3.2 (a) Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeit des DltA-DltC-Komplexes. (b) Zusammenhang der Komplex-Bildungs- (k_1) und Zerfallskonstanten (k_{-1}) mit der Geschwindigkeitskonstante des Austausches (k_{ex}).

Die Komplex-Bildung und der -Zerfalls sind durch die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_1) und Dissoziation (k_{-1}) gekennzeichnet. Die Summe der beiden Geschwindigkeitskonstanten wird als Geschwindigkeitskonstante des Austausches (k_{ex}) definiert (Woessner, 1996). In Abbildung 3.18 ist exemplarisch ein ^{15}N , ^1H -TROSY-HSQC-Spektrum von *holo*-DltC in An- und Abwesenheit von DltA gezeigt. Im Vergleich des Spektrums von freiem DltC mit dem in Anwesenheit von DltA ist eine Abnahme der Signalintensität zu beobachten. Dies beruht auf der langsamen Austauschgeschwindigkeit der Komplexbildung im Vergleich zur Differenz der chemischen Verschiebung. Eine Zunahme der Signalintensität von komplexiertem DltC kann dabei nicht beobachtet werden, da der gebildete DltA-DltC-Komplex aufgrund seiner Größe nicht detektiert werden kann. Demzufolge können Aminosäuren von DltC, die zur Interaktion mit DltA beitragen, durch

eine Abnahme der Signalintensität nach Zugabe von DltA identifiziert werden. Für die Analyse wurde ein Verhältnis von DltA:DltC = 0,2 gewählt, da bei höherem Anteil an DltA bereits ein Großteil des DltC komplexiert vorlag. Dies führt zu einer Verringerung der Konzentration an freiem DltC und in einer deutlich verringerten Signalintensität, wodurch die Auswertung erschwert werden würde.

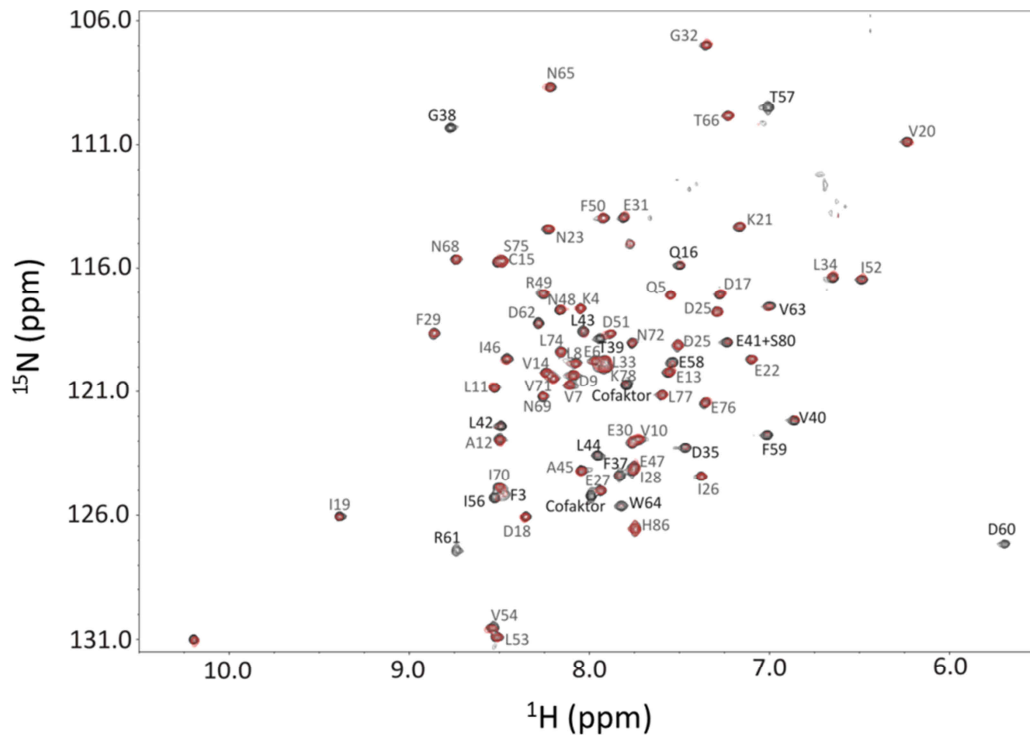


Abbildung 3.18 ^{15}N , ^1H TROSY-HSQC-Spektrum in Anwesenheit von AMP. *holo*-DltC (schwarz), DltA:DltC = 0,2 (rot). Aminosäuren mit starker Abnahme der Signalintensität sind fett hervorgehoben.

Die Analyse der NMR-Spektren ergab, dass die Aminosäuren von *holo*-DltC bzw. *apo*-DltCS36A, die zur Interaktion mit DltA beitragen, für die vier getesteten Kombinationen sehr ähnlich sind (Abbildung 3.19). Identifiziert wurde dabei der C-terminale Bereich der Helix I, der folgende *loop*-Bereich, die Helix II und die Helix III sowie der darauf folgende *loop*-Bereich.

Die identifizierten DltC-Aminosäuren sind im produktiven Komplex an der Interaktion mit DltA beteiligt (Abbildung 3.20 (a)). Wird die Struktur des alternativen DltA-DltC-Komplexes entsprechend der identifizierten Aminosäuren koloriert, ist zu erkennen, dass die Regionen mit den größten Intensitätsunterschieden (Helix II und III) ebenfalls an der Ausbildung der Kontaktfläche zwischen DltA und DltC nach Position A beteiligt sind. Weitere Regionen, die mittels NMR-Titration identifiziert wurden (C-terminaler Bereich der Helix I sowie die *loop*-Bereiche zwischen Helix I und II sowie zwischen III und IV) sind nicht Teil der Interaktionsfläche. Bei Betrachtung der Kontaktfläche der Position B können nur wenige Aminosäuren der C-terminalen Region der Helix II den Änderungen in den Signalintensitäten zugeordnet werden.

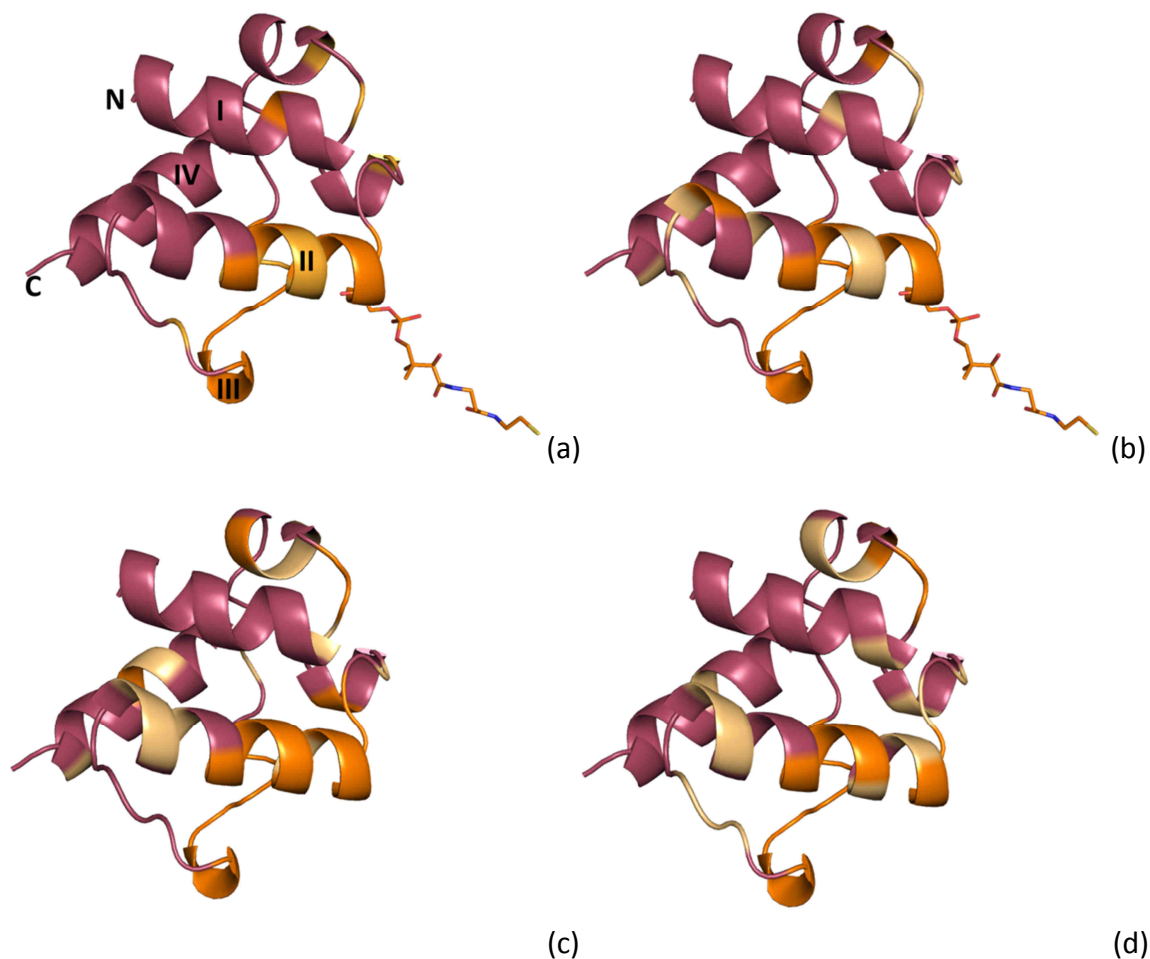


Abbildung 3.19 Im ^{15}N , ^1H TROSY-HSQC-Spektrum identifizierte Aminosäuren bei $\text{DltA:DltC} = 0,2$. DltC ist rot koloriert. Aminosäuren mit schwachen Änderungen in der Signalintensität zwischen $n = 0$ und $n = 0,2$ sind in gelb, Aminosäuren mit starken Intensitätsunterschieden in orange eingefärbt. (a) *holo*-DltC + DltA mit AMP. (b) *holo*-DltC + DltA ohne AMP. (c) *apo*-DltC S36A + DltA mit AMP. (d) *apo*-DltC S36A + DltA ohne AMP.

Es kann festgestellt werden, dass mittels NMR-Titration sowohl dem produktiven, als auch dem alternativen Komplex (Position A) eine Relevanz in Lösung zugeordnet werden kann. Es kann jedoch nicht geklärt werden, ob tatsächlich ein Gemisch aus alternativem und produktivem Komplex vorlag, da die identifizierten DltC-Aminosäuren beiden Varianten zugeordnet werden können. Die Bindung von DltC nach der Position B des alternativen Komplexes kann anhand der erzielten Ergebnisse ausgeschlossen werden. Interessanterweise ist kein Unterschied der Strukturen bei An- und Abwesenheit von AMP vorhanden. Die Bindung von DltC an die offene, flexible Form des DltA könnte dabei auch in Abwesenheit von AMP die Transfer-Konformation von DltA induzieren, so dass die Bindung entsprechend des produktiven DltA-DltC-Komplexes erfolgen kann. Alternativ könnte die Bindung von DltC an die große Domäne des DltA nach der Position A unabhängig von der DltA-Konformation erfolgen. Weiterhin konnten keine signifikanten Unterschiede in An- und Abwesenheit des Cofaktors identifiziert werden.

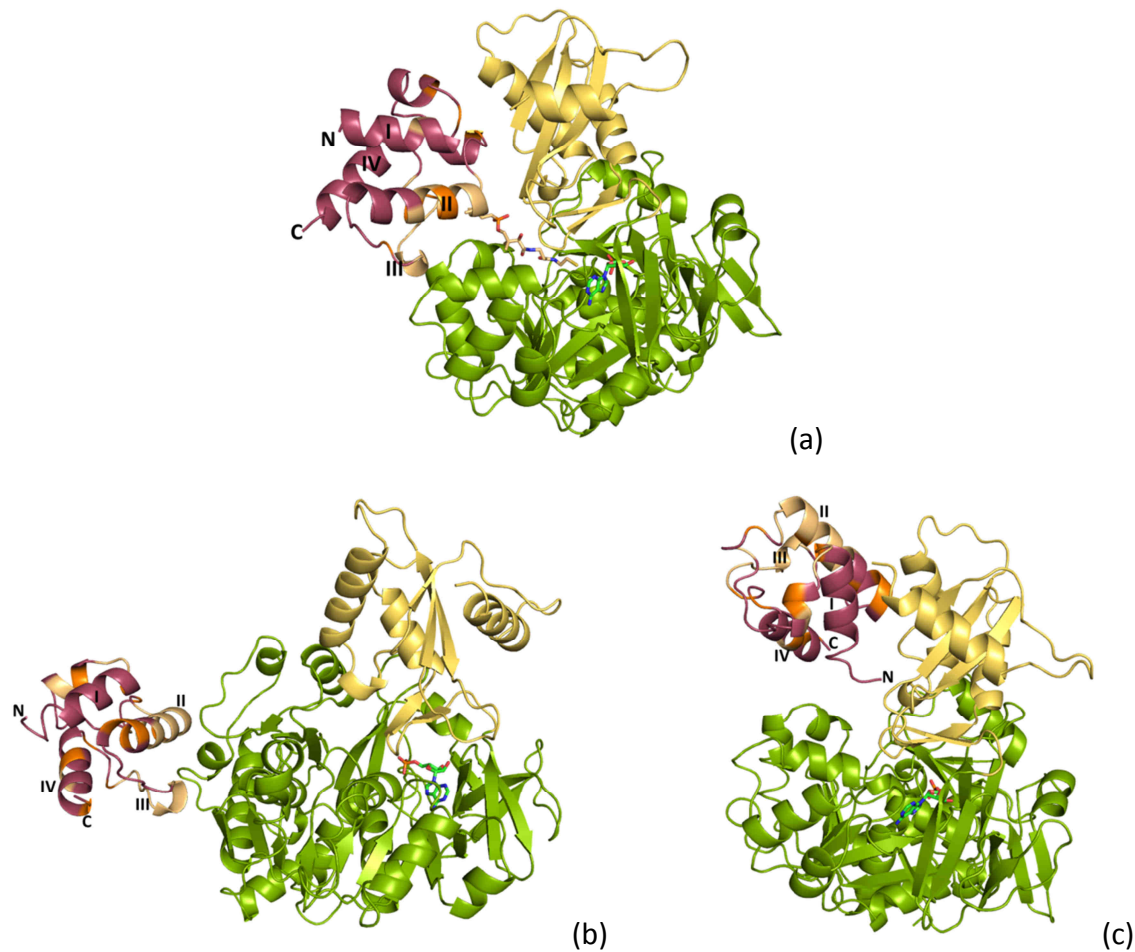


Abbildung 3.20 Im ^{15}N , ^1H -TROSY-HSQC-Spektrum identifizierte Aminosäuren bei DltA:DltC = 0,2. (a) Produktiver Komplex. (b) Alternativer Komplex, Position A. (c) Alternativer Komplex, Position B. Die Farbgebung ist analog zu Abbildung 3.19. Die große und kleine Domäne von DltA ist grün und gelb koloriert.

3.3.2. Kovalente Verknüpfung des alternativen DltA-DltC-Komplexes (Position A)

Bei den NMR-Titrationsexperimenten wurden Aminosäuren von DltC identifiziert, die sowohl zur Interaktion mit DltA im produktiven, als auch im alternativen Komplex (Position A) beitragen können. Zur weiteren Überprüfung, ob der alternative Komplex (Position A) in Lösung existiert, wurden Cystein-Varianten von DltA (DltA E125C) und DltC (DltC S36C) hergestellt, die eine kovalente Verknüpfung von DltA-DltC entsprechend des alternativen Komplexes (Position A) ermöglichen sollten (Abbildung 3.21).

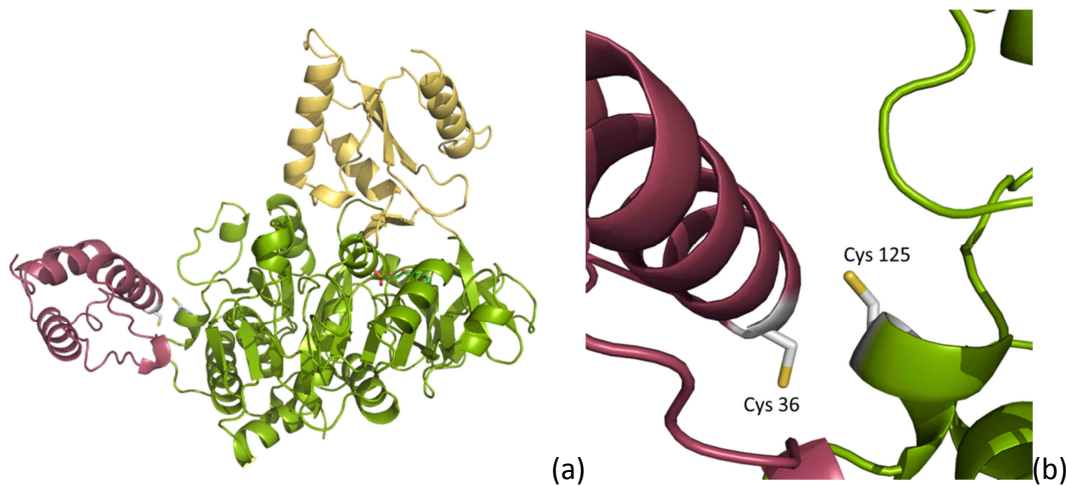


Abbildung 3.21 **(a) Struktur des alternativen DltA-DltC Komplexes-(Position A)**. Die große und kleine Domäne des DltA sind grün und gelb dargestellt. DltC ist rot koloriert. **(b) Modell der Interaktion von DltAE 125C und DltC S36A im alternativen Komplex (Position A)**.

Dafür wurden die Varianten DltA E125C und DltC S36C reduziert. Nach Abtrennung des Reduktionsmittels über eine Größenausschlusschromatographie wurde in drei Ansätzen untersucht, ob eine Disulfidbrücke zwischen DltA E125C und DltC S36C ausgebildet werden kann. In der dem ersten Ansatz wurden beide Proteine in unterschiedlichen Verhältnissen und Konzentrationen für 2 h oder 20 h bei 25°C inkubiert (Abbildung 3.22 (a)-(b)). Im zweiten Ansatz wurden 50 µM DltA E125C mit 50 µM DltC S36C mit einem *redoxshuffle*-System (unterschiedlichen Verhältnisse von oxidiertem (GSSG) und reduziertem (GSH) Glutathion) ebenfalls für 2 h oder 20 h bei 25°C inkubiert (Abbildung 3.22 (c)-(d)). Im dritten Ansatz wurde ausgehend von 50 µM DltC S36C und 50 mM GSSG ein gemischtes Disulfid hergestellt. Nach Abtrennung des überschüssigen GSSG und Zugabe einer äquivalenten Menge an DltAE125C wurden die Ansätze für 8 h oder 20 h bei 25°C inkubiert (Abbildung 3.22 (e)-(f)). Ausgehend vom DltAE125C konnte aufgrund der nahezu vollständigen Präzipitation des Proteins kein gemischtes Disulfid hergestellt werden.

Die Analyse mittels SDS-PAGE ergab, dass unter allen gewählten Bedingungen eine Ausbildung von DltC-Dimeren (~21 kDa) sowie höheren DltA-Oligomeren (~200 kDa) beobachtet werden konnte. Es liegt die Vermutung nahe, dass die eingeführten Cysteine eine hohe Reaktivität aufweisen. Deshalb wurde darauf verzichtet, die Ausbildung von Disulfidbrücken durch katalytische Mengen an Schwermetallen zu beschleunigen. Dennoch kann unter allen Bedingungen ein signifikanter Anteil an monomeren DltC S36C und DltA E125C beobachtet werden kann, welche die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen DltA E125C und DltC S36C ermöglichen könnten. Jedoch konnte unter keiner der angewandten Bedingungen ein kovalenter DltA E125C-DltC S36C-Komplex (~66 kDa) beobachtet werden. Es kann festgestellt werden, dass es mit diesem Experiment nicht möglich war, den alternativen DltA-DltC-Komplex (Position A) in Lösung mittels einer Disulfidbrücke zu stabilisieren und dessen Existenz nachzuweisen.

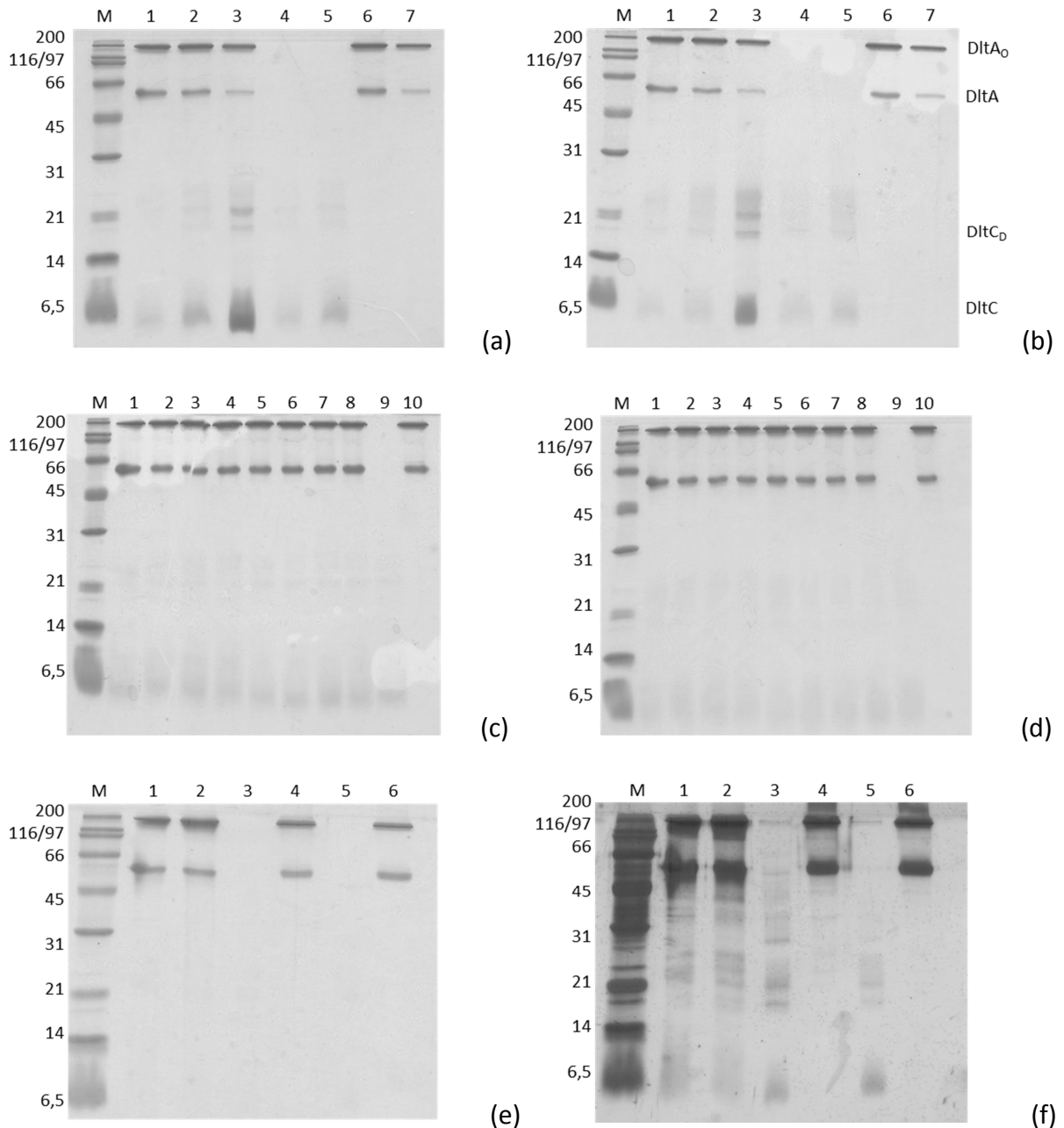


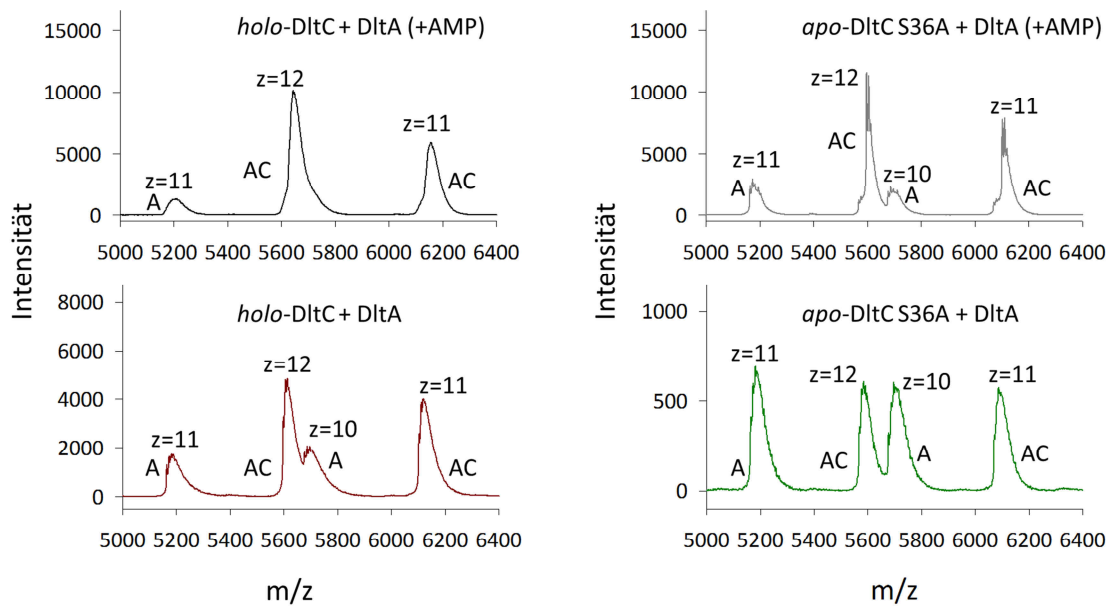
Abbildung 3.22 **Analyse der kovalenten Verknüpfung zwischen DltA E125C und DltC S36C mittels SDS PAGE.** **(a) 2h. (b) 20h: ohne Zusätze.** M: Marker in kDa, 1: 50 μ M DltC S36C + 50 μ M DltA E125C, 2: 100 μ M DltC S36C + 50 μ M DltA E125C, 3: 100 μ M DltC S36C + 10 μ M DltA E125C, 4: 50 μ M DltC S36C, 5: 100 μ M DltC S36C, 6: 50 μ M DltA E125C, 7: 10 μ M DltA E125C. **(c) 2h. (d) 20h: mit redoxshuffle-System.** M: Marker in kDa, 1: 1 mM GSH + 0,1 mM GSSG, 2: 1 mM GSH + 1 mM GSSG, 3: 1 mM GSH + 5 mM GSSG, 4: 1 mM GSH + 10 mM GSSG, 5: 1 mM GSSG + 0,1 mM GSH, 6: 1 mM GSSG + 1 mM GSH, 7: 1 mM GSSG + 5 mM GSH, 8: 1 mM GSSG + 10 mM GSH, 9: 50 μ M DltC S36C + 1 mM GSH, 10: 50 μ M DltA E125C + 1 mM GSH. **(e) Coomassiefärbung. (f) Silberfärbung: Ausbildung eines gemischten Disulfides.** M: Marker in kDa, 1: gemischtes Disulfid nach 8 h, 2: gemischtes Disulfid nach 20 h, 3: 50 μ M DltC S36C, 4: 50 μ M DltA E125C, 5: 50 μ M DltA E125C + GSSG, 6: 50 μ M DltC S36C. Dlt_O = DltA-Oligomere, DltC_D = DltC-Dimere.

3.3.3. Analyse des DltA-DltC-Komplexes mittels Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie

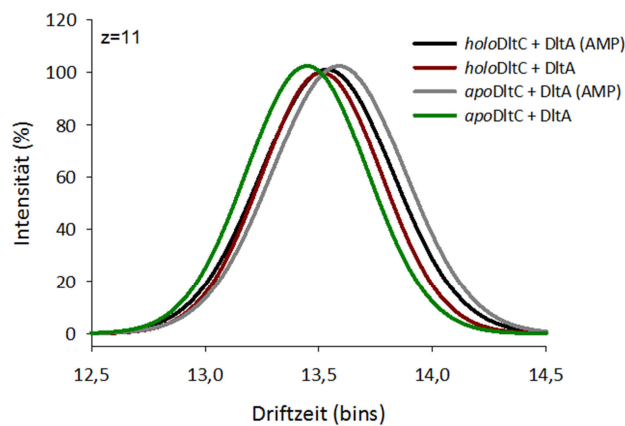
Für die Interaktion zwischen DltA und DltC konnten zwei Varianten beobachtet werden (Kapitel 3.2.). Mittels NMR-Titrationsexperimenten konnten Aminosäuren von DltC identifiziert werden, die an der Interaktion mit DltA in beiden Varianten (produktiver und alternativer Komplex Position A) beteiligt sind (Kapitel 3.3.1). Eine kovalente Verknüpfung von DltA und DltC gemäß des alternativen Komplexes (Position A) konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Kapitel 3.3.2.). Die Relevanz und mögliche Funktion des alternativen DltA-DltC-Komplexes sind damit weiterhin ungeklärt. Eine mögliche Funktion des alternativen Komplexes könnte in einer allosterischen Regulation der katalytischen Aktivität von DltA liegen, oder die alternative Bindung von DltC könnte zu einer Erhöhung der lokalen DltC-Konzentration führen. Dabei stellt sich die Frage, ob ein oder zwei DltC-Moleküle simultan an DltA gebunden sein können. Zur Analyse der Stöchiometrie der DltA-DltC-Bindungen sowie zur Untersuchung der Oberflächenform des DltA-DltC-Komplexes wurden native ESI-Massenspektren aufgenommen. Dafür wurden *holo*-DltC und *apo*-DltC S36A genutzt. Die Experimente wurden sowohl ohne Ligand, als auch in Anwesenheit von AMP oder AMPCPP durchgeführt.

Es ist ersichtlich, dass in allen untersuchten Kombinationen das Verhältnis von DltA:DltC von 1:1 erhalten werden konnte (Abbildung 3.23 (a)). Es gibt keine Hinweise darauf, dass simultan zwei DltC an einem DltA binden können. Neben dem DltA-DltC-Komplex konnten zudem Peaks der nichtgebundenen Proteinpartner identifiziert werden. Das Verhältnis zwischen der Intensität des Peaks des Komplexes und den Peaks der freien Proteine hängt von dem vorhandenen Nukleotid ab (Abbildung 3.23 (a)). Unter Verwendung von *holo*-DltC und DltA in Anwesenheit von AMP konnte der höchste Anteil des DltA-DltC-Komplexes beobachtet werden, gefolgt von *apo*-DltC S36A mit AMP. Für die Proben in Abwesenheit von AMP ist der Anteil an freien Bindungspartnern deutlich erhöht. Das Verhältnis von freiem DltA zum DltA-DltC-Komplex lässt Rückschlüsse auf die Affinität unter den gewählten Bedingungen zu. Die höchste Affinität kann demnach für *holo*-DltC und DltA in Anwesenheit von AMP beobachtet werden, während die niedrigste Affinität für *apo*-DltC S36A und DltA in Abwesenheit von AMP detektiert werden kann. Es kann festgestellt werden, dass sowohl die Anwesenheit von AMP, als auch die des Cofaktors die Affinität der DltA-DltC-Interaktion erhöhen.

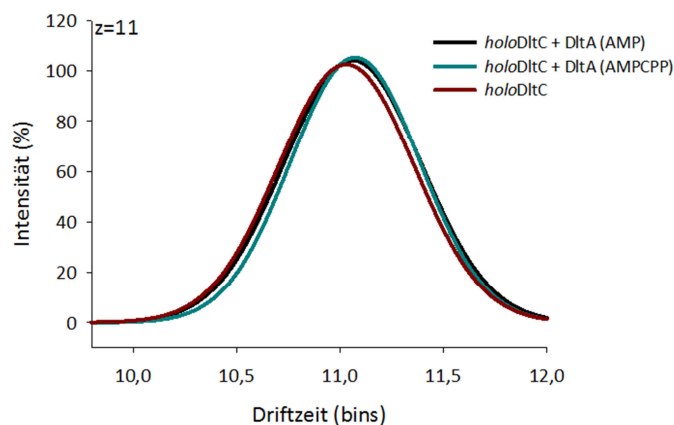
Neben der Bestimmung der Stöchiometrie anhand der *m/z*-Spektren wurde auch die Driftzeit von DltA-DltC bei unterschiedlichen Bedingungen analysiert. Unter allen Bedingungen konnte jeweils nur ein Peak beobachtet werden, so dass vermutlich jeweils nur eine Variante des DltA-DltC-Komplexes vorlag (Abbildung 3.23). Ein Vorkommen von zwei verschiedenen Varianten des DltA-DltC-Komplexes mit unterschiedlichen CCS würde in zwei Peaks mit verschiedenen Driftzeiten resultieren. Bei Verwendung von *holo*-DltC konnte unter allen gewählten Bedingungen eine ähnliche Driftzeit beobachtet werden.



(a)



(b)



(c)

Abbildung 3.23 **Analyse des DltA-DltC-Komplexes mittels nativer Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie. (a) m/z -Spektren von DltC und DltA.** Neben dem DltA-DltC-Komplex (AC) konnte unter allen Bedingungen auch freies DltA (A) beobachtet werden. Die Ladungszustände (z) von DltA sowie DltA-DltC sind in der Abbildung angegeben. **(b) Driftzeit-Analysen von *holo*- und *apo*-DltC in An- und Abwesenheit von AMP.** Die Analyse der Driftzeit erfolgte ausgehend vom DltA-DltC-Komplex mit dem Ladungszustand 11. **(c) Driftzeit-Analysen von *holo*-DltC in Anwesenheit von AMP und AMPCPP sowie in Abwesenheit eines Liganden.** Die Analyse der Driftzeit erfolgte ausgehend vom DltA-DltC-Komplex mit dem Ladungszustand 11. Die Driftzeit ist abhängig von mehreren Parametern. Diese wurden für jede Messreihe neu optimiert, so dass die Driftzeiten zwischen verschiedenen Messreihen (b) und (c) nicht vergleichbar sind.

Die Driftzeit korreliert mit der Oberfläche der zu untersuchenden Proteine (Kapitel 3.1.4.1). Es kann daher vermutet werden, dass *holo*-DltC und DltA in Anwesenheit von AMP, AMPCPP sowie in Abwesenheit eines Liganden eine ähnliche Interaktion eingehen (Abbildung 3.23 (c)). Im Gegensatz dazu wies der Peak von *apo*-DltC und DltA in Abwesenheit von AMP eine geringfügig kürzere Driftzeit auf. Es muss dabei jedoch berücksichtigt werden, dass unter dieser Bedingung die Signalintensität im m/z-Spektrum am geringsten war. Eine direkte Identifizierung der Kontaktfläche zwischen den beiden Proteinen kann jedoch nicht erfolgen.

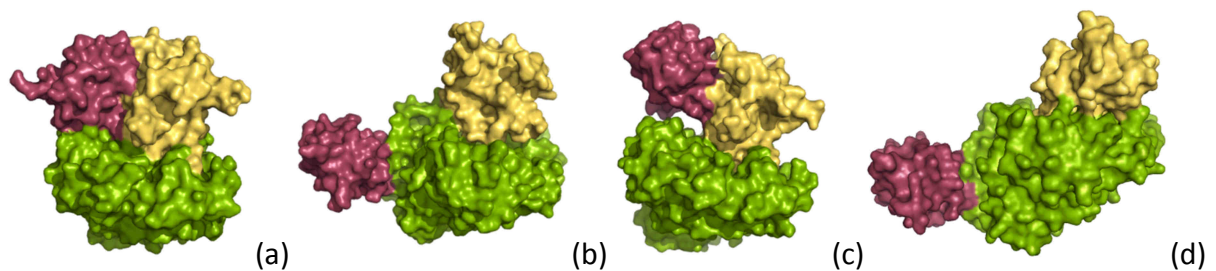


Abbildung 3.24 **Oberflächendarstellung der möglichen DltA-DltC Komplex-Varianten (a) Produktiver Komplexes (b) Alternativer Komplex (Position A). (c) Alternativer Komplex (Position B). (d) Alternativer Komplex (Position A, DltA in Adenylierungs-Konformation aus pdb-Code 3DHV).** Die große Domäne von DltA ist in grün, die kleine Domäne in gelb und DltC ist in rot koloriert.

Die *CCS* (*collision cross section*) ist ein struktureller Parameter und korreliert mit der gemittelten Projektionsoberfläche des Proteins (Konijnenberg et al., 2013). Für die möglichen Komplex-Varianten konnten mittels *LeedsCrossArea* (Smith et al., 2009) folgende *CCS* berechnet werden: produktiver DltA-DltC-Komplex 3564 \AA^2 , alternativer DltA-DltC-Komplex (Position A) 3812 \AA^2 , alternativer DltA-DltC-Komplex (Position B) 3661 \AA^2 und alternativer DltA-DltC-Komplex (mit DltA pdb-Code 3DHV in der Adenylierungs-Konformation) 3759 \AA^2 . Die berechneten *CCS* sind nur Näherungen, geben jedoch eine Tendenz wieder. Die *CCS* des produktiven und alternativen Komplex (Position A) sowie des produktiven und alternativen Komplex mit DltA in der Adenylierungs-Konformation weisen eine Differenz von $\sim 250 \text{ \AA}^2$ (6,5%) bzw. $\sim 195 \text{ \AA}^2$ (5,2%) auf und könnten somit mittels IM-MS unterschieden werden (Konijnenberg et al., 2013). Die *CCS*-Differenz zwischen dem produktiven und dem alternativen Komplex (Position B) beträgt nur $\sim 100 \text{ \AA}^2$ (2,5 %), jedoch konnte die Variante B bereits anhand der NMR-Titrationsexperimente ausgeschlossen werden. Geht man davon aus, dass unter Verwendung von *holo*-DltC und DltA in Anwesenheit von AMP der produktive Komplex erhalten wird, würde die kürzere Driftzeit von *apo*-DltC S36A mit DltA in Abwesenheit von AMP auf einen Komplex mit einer kleineren *CCS* hindeuten. Jedoch weist der produktive Komplex bereits die geringste *CCS* auf.

Es kann festgestellt werden, dass unter allen gewählten Bedingungen nur ein DltC an ein DltA bindet. Eine simultane Bindung von DltC nach dem produktiven und dem alternativen Komplex (Variante A) konnte unter diesen Bedingungen nicht beobachtet werden. Zudem deutet die Analyse der Driftzeit auf eine Komplexvariante unter allen getesteten Bedingungen hin. Das Vorkommen des alternativen Komplexes konnte anhand dieser Experimente nicht bestätigt werden.

3.4. Thermodynamische Charakterisierung der DltA-DltC-Interaktion

In Kapitel 3.2. wurden zwei möglichen Bindestellen für DltC an DltA beschrieben. Mittels NMR-Titrationsexperimenten konnten DltC-Aminosäuren identifiziert werden, die sowohl Teil der Interaktionsfläche im produktiven, als auch im alternativen Komplex (Position A) sind (Kapitel 3.3.1). Ein eindeutiger Nachweis der alternativen Bindung wurde anhand vorheriger Experimente (kovalente Verknüpfung, native Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie) jedoch nicht erbracht. Eine simultane Bindung von zwei Molekülen DltC an ein DltA konnte zudem mittels nativer Massenspektrometrie bereits ausgeschlossen werden. Die Bindung von DltC an DltA im produktiven bzw. alternativen Komplex (Position A) ist durch unterschiedliche Größen der Kontaktflächen sowie durch unterschiedliche Beiträge von polaren und unpolaren Aminosäuren an der Ausbildung Interaktionsflächen charakterisiert (Kapitel 3.2.). Eine thermodynamische Charakterisierung der Bindung von DltC an DltA kann demnach Aufschluss über die möglichen Bindungsvarianten geben.

3.4.1. Analyse der thermodynamischen Parameter für die Bindung von DltC an DltA

In den Kristallstrukturen des produktiven und alternativen (Position A) DltA-DltC-Komplexes bindet DltC an DltA in der Transfer-Konformation. Die Bindung von DltC an DltA im alternativen Komplex (Position A) erfolgt dabei nur an die N-terminale große Domäne von DltA, während die Bindung von DltC im produktiven Komplex sowohl an die große, als auch an die kleine Domäne des DltA erfolgt. Die alternative Bindung von DltC an die große DltA-Domäne könnte demnach unabhängig von der Konformation des DltA erfolgen. Die Ergebnisse der Analyse der Konformations-spezifischen DltA-DltC-Interaktionen mittels nativer IM-MS deuten jedoch darauf hin, dass vermutlich nur eine Variante der DltA-DltC-Interaktion beobachtet werden konnte.

Die Analyse der thermodynamischen Bindungsparameter von DltC an die offene, AMPCPP-gebundene und AMP-gebundene Form von DltA kann Aufschluss über die Relevanz der alternativen Bindung geben. Unter Verwendung von *holo*-DltC bzw. *apo*-DltC S36A kann zudem die Rolle des Cofaktors bei der Interaktion geklärt werden.

Bei allen durchgeführten Messungen ist ein stöchiometrisches Verhältnis von DltC : DltA von 1 zu beobachten. Die Affinität für die Bindung von *holo*-DltC an DltA ist in Anwesenheit von AMP mit 3,3 μM am höchsten (da DltA hier vermutlich in der Transfer-Konformation vorliegt) (Abbildung 3.25 (c), Tabelle 3.8). Wird die Adenylierungs-Konformation durch Zugabe von AMPCPP stabilisiert oder liegt DltA in der offenen Konformation vor, konnte eine Abnahme der Affinität zu 253 μM (in Anwesenheit von AMPCPP) bzw. 102 μM (ohne Ligand) beobachtet werden (Abbildung 3.25 (a), (b), Tabelle 3.8). Bei der Analyse von Interaktionen mit Dissoziationskonstanten in diesem hohen mikromolarem-Bereich mittels ITC ergeben sich jedoch Limitierungen, so dass die erhaltenen thermodynamischen Parameter nur Näherungen darstellen können. Alle gemessenen Reaktionen sind entropisch getrieben. Eine Zunahme der Entropie nach Bildung des Komplexes kann auf einen hohen Anteil an hydrophoben Interaktionen zurückgeführt werden, da es hierbei zum Ausschluss von Wasser

während der Bindung kommt, wie es in dem produktiven und alternativen Komplex (Position A) beobachtet werden konnte. Die gemessenen freien Bindungsenthalpien unterscheiden sich in allen Varianten (Tabelle 3.8). Ein jeweils unterschiedlicher Beitrag an Entropie- und Enthalpieänderungen kann entweder auf unterschiedliche Kontaktflächen oder auf zusätzliche energetische Beiträge (z.B. verursacht durch konformationelle Änderungen) zur Interaktion zurückgeführt werden. Durch Inversion von Titrant und Titrator wurde DltA zu *holo*-DltC in Anwesenheit von AMP titriert. Dabei konnten die gleichen Bindungsparameter wie bei der Titration von *holo*-DltC zu DltA beobachtet werden (Tabelle 3.8 und Abbildung 3.25 (d)). In der Kristallstruktur des alternativen DltA-DltC-Komplexes (Position A) ist keine Elektronendichte des 4'-Phosphopantethein-Cofaktors des DltC zu erkennen. DltA ist hierbei in der Transfer-Konformation.

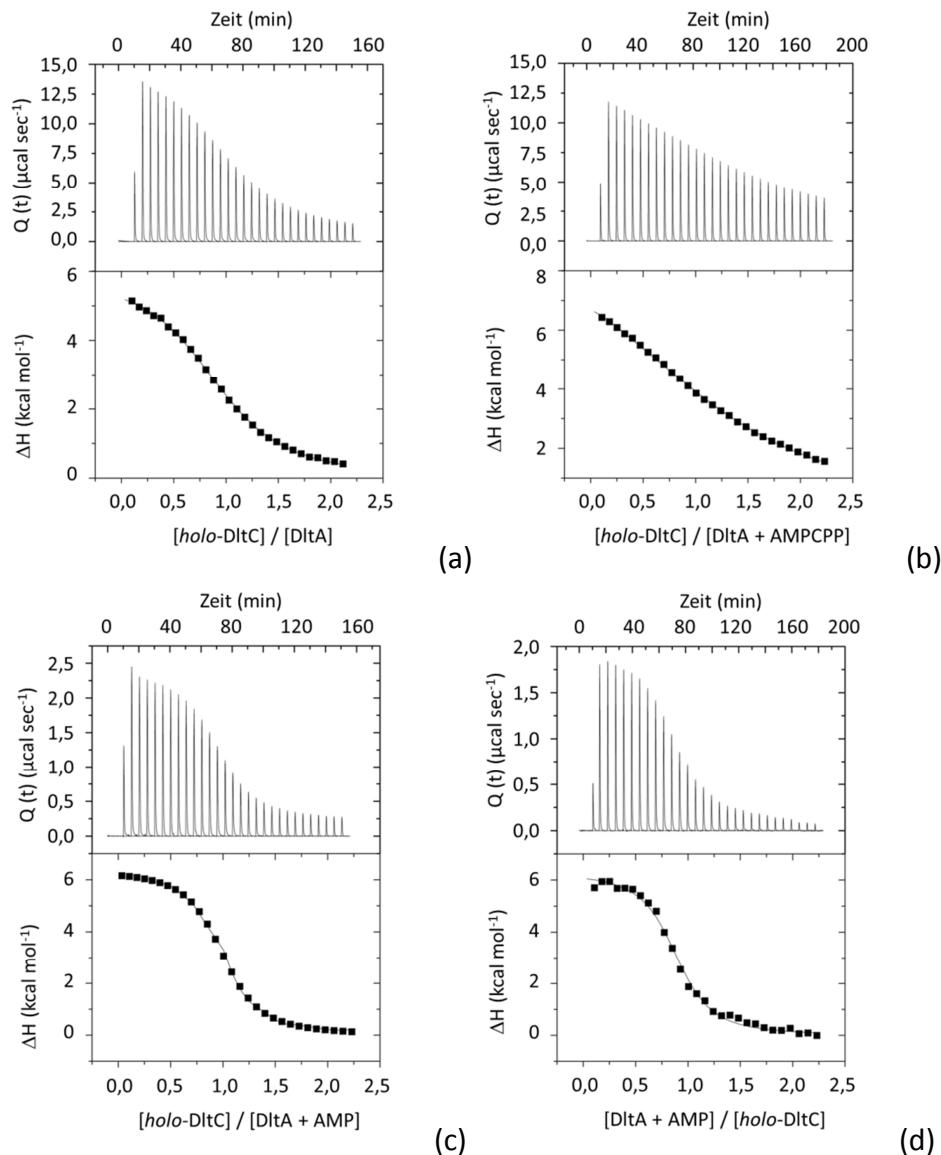


Abbildung 3.25 ITC-Experimente: Titration von *holo*-DltC zu DltA in Anwesenheit verschiedener Liganden. Alle Experimente wurden bei 298,15 K in 50 mM HEPES/NaOH (für Messung mit 3 mM AMP) bzw 100 mM HEPES/NaOH (für Messung ohne Nukleotid und in Anwesenheit von 2 mM AMPCPP), 150 mM NaCl, 2 mM TCEP, 10 mM MgCl_2 (für Messung mit AMP und APCPP) pH 7,8 durchgeführt. (a) *holo*-DltC titriert zu DltA. (b) *holo*-DltC titriert zu DltA + AMPCPP. (c) *holo*-DltC titriert zu DltA + AMP (d) DltA + AMP titriert zu *holo* DltC.

Ligand	ohne	AMPCPP	AMP	AMP (invers)
[<i>holo</i> -DltC] (mM)	7,5	4,5	1,1	0,09
[DltA] (μ M)	790	450	100	900
K_D (μ M)	102 ± 2	253 ± 7	$3,3 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,3$
N (DltC / DltA)	$1,0 \pm 0,0$	$1,3 \pm 0,0$	$1,0 \pm 0,0$	$0,9 \pm 0,0$
ΔH (cal mol ⁻¹)	5874 ± 31	9481 ± 120	6358 ± 49	6275 ± 86
ΔS (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	38,0	48,3	46,4	46,3
T (K)	298,15	298,15	298,15	298,15
ΔG (cal mol ⁻¹)	-5457	-4920	-7476	-7529

Tabelle 3.8 **Thermodynamische Parameter für die Titration von *holo*-DltC zu DltA.** K_D Dissoziationskonstante, ΔH Änderung der Enthalpie, ΔS Änderung der Entropie, ΔG Änderung der freien Enthalpie, T Temperatur.

Um die Relevanz des Komplexes in Lösung zu untersuchen, wurden Titrationsexperimente mit der Cofaktor-freien Variante *apo*-DltC S36A zu DltA in An- und Abwesenheit von AMP durchgeführt. Diese zeigte im Vergleich zu *holo*-DltC eine geringere Affinität (Abbildung 3.26 und Tabelle 3.9). Ausgehend davon kann dem Cofaktor eine wichtige Funktion bei der Interaktion mit DltA sowohl in der offenen, als auch in der Transfer-Konformation zugeschrieben werden.

Betrachtet man die Differenz von ΔG der Bindung von DltC an die offene und Transfer-Konformation von DltA, so ergibt sich unter Verwendung von *holo*-DltC ein $\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{offen}} - \Delta G_{\text{Transfer}} = 2019 \text{ cal mol}^{-1}$ und für *apo*-DltC S36A eine sehr ähnliche Differenz von $\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{offen}} - \Delta G_{\text{Transfer}} = 1880 \text{ cal mol}^{-1}$, welches den Beitrag des Übergangs von der offenen zur Transfer-Konformation zur beobachteten freien Bindungsenthalpie widerspiegeln könnte. Ist eine vorherige Konformationsänderung von DltA in der offenen Konformation für die Interaktion mit DltC nötig, wird die dafür aufgebrauchte Energie die eigentliche freie Bindungsenthalpie überlagern. Für die Analyse der Interaktion von DltC mit DltA in der Adenylierungs-Konformation wurden die Bindungsstudien in Anwesenheit des nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogons AMPCPP durchgeführt. Ausgehend von den eingesetzten Konzentrationen an DltA und AMPCPP liegt DltA zu 75% im Komplex mit AMPCPP vor. Dabei konnte die geringste Affinität für die DltC-Bindung beobachtet werden. Ist dieses Phänomen ebenfalls auf konformationelle Änderungen in Anwesenheit von DltC zurückzuführen, kommt es zur Ausbildung einer alternativen DltA-DltC-Interaktion oder geht die beobachtete Interaktion aufgrund des unvollständigen AMPCPP-Beladungsgrades von der offenen Konformation des DltA aus?

Um die mögliche alternative Bindung von DltC an die große Domäne des DltA zu inhibieren, wurden DltA-Varianten erstellt, in denen Glu125/Glu128 zu Arg/Arg bzw. Arg/Trp mutiert wurden (DltA RR bzw. DltA RW). Hierbei wurden sowohl Bindungsstudien mit *holo*-DltC, als auch mit *apo*-DltC S36A durchgeführt. Da die Bindung von DltC an die große Domäne des DltA nach der Position A des alternativen Komplexes unabhängig von der DltA-Konformation erfolgen sollte, wurden zudem Bindungsexperimente mit DltA + AMP für die Transfer-, mit DltA + AMPCPP für die Adenylierungs-Konformation sowie mit der isolierten großen Domäne von DltA (DltA_N) durchgeführt (Anhang Abbildung 0.8 und Tabelle 3.10). Die Strukturelle Integrität der Proteine konnte mittels CD-Spektroskopie bestätigt werden (Anhang).

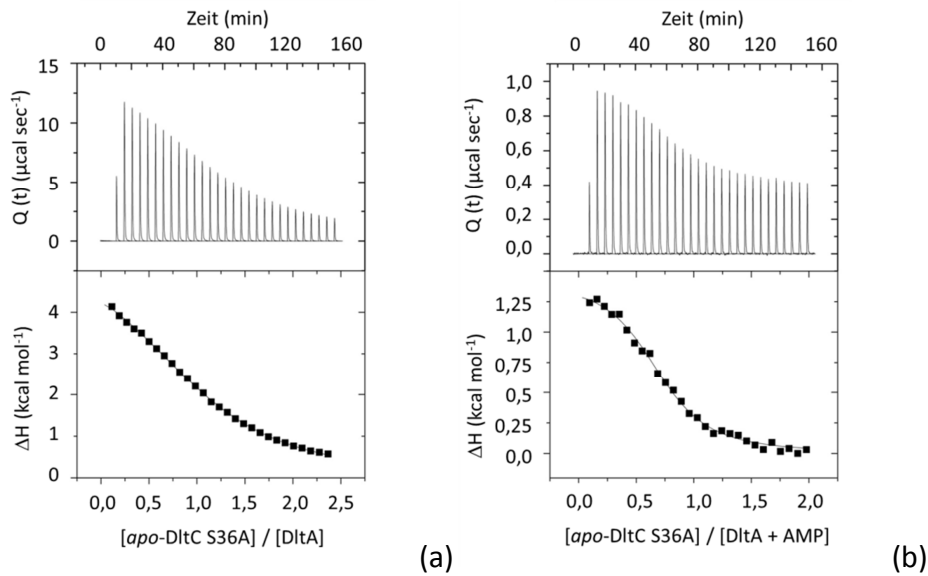


Abbildung 3.26 ITC-Experimente: Titration von *apo-DltC S36A* zu *DltA*. Alle Experimente wurden bei 298,15 K in 50 mM HEPES/NaOH (für Messung mit 3 mM AMP) bzw 100 mM HEPES/NaOH (für Messung ohne Nukleotid), 150 mM NaCl, 2 mM TCEP, 10 mM MgCl₂ (für Messung mit AMP), pH 7,8 durchgeführt. (a) *apo-DltC S36A* titriert zu *DltA*. (b) *apo-DltC S36A* titriert zu *DltA+AMP*.

Ligand	ohne	AMP
[<i>apo DltC S36A</i>] (mM)	8,3	1,5
[Konzentration] (μM)	783	150
K_D (μM)	276 ± 7	11,5 ± 1,1
N (DltC / DltA)	1,1 ± 0,0	0,7 ± 0,0
ΔH (cal mol ⁻¹)	5572 ± 56	1426 ± 32
ΔS (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	35,0	27,4
T (K)	298,15	298,15
ΔG (cal mol ⁻¹)	-4863	-6743

Tabelle 3.9 Thermodynamische Parameter für die Titration von *DltC S36A* zu *DltA*. K_D Dissoziationskonstante, ΔH Änderung der Enthalpie, ΔS Änderung der Entropie, ΔG Änderung der freien Enthalpie, T Temperatur.

Ligand	AMP	AMP	AMPCPP	AMP
DltA	RR	RW	RW	RW
DltC	holo	holo	holo	S36A
[DltC] (mM)	1	1	3,5	2,5
[DltA] (μM)	100	93	350	250
K_D (μM)	3,4 ± 0,2	3,5 ± 0,5	226 ± 8,8	6,2 ± 1,1
N (DltC / DltA)	0,93 ± 0,00	0,93 ± 0,00	1,2 ± 0,0	0,9 ± 0,0
ΔH (cal mol ⁻¹)	6250 ± 46	6244 ± 39	11020 ± 228	1035 ± 24
ΔS (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	46,0	45,9	53,6	27,3
T (K)	298,15	298,15	298,15	298,15
ΔG (cal mol ⁻¹)	-7465	-7441	-4961	-7104

Tabelle 3.10 Thermodynamische Parameter für die Titration von *DltC* zu *DltA RW* bzw. *RR*. K_D Dissoziationskonstante, ΔH Änderung der Enthalpie, ΔS Änderung der Entropie, ΔG Änderung der freien Enthalpie, T Temperatur.

Es ist ersichtlich, dass eine Mutation der potentiellen alternativen Bindungsstelle von *DltC* an die große Domäne des *DltA* keinen signifikanten Einfluss auf die thermodynamischen

Bindungsparameter hat. Dabei konnte kein Unterschied zwischen DltA RR und DltA RW beobachtet werden (Anhang Abbildung 0.8 und Tabelle 3.10). Im Vergleich zu den Experimenten mit den Wildtyp-Proteinen kann keine Abnahme der Affinität beobachtet werden, die eine Bindung von DltC an die große Domäne (gemäß der Position A des alternativen Komplexes) bestätigen würde. Zudem konnten keine Änderungen der enthalpischen und entropischen Beiträge zur Bindung im Vergleich zu den Wildtyp-Proteinen gemessen werden. Die Abwesenheit des Cofaktors in der Variante *apo*-DltC S36A hatte ebenfalls keine Auswirkung auf die Bindung von DltA RW im Vergleich zu Wildtyp-DltA.

Eine Bindung von DltC an die Position B des alternativen Komplexes konnte bereits mittels NMR-Titrationsexperimente ausgeschlossen werden. Um einen zusätzliche Beweis zu erbringen wurden die an der potentiellen Interaktion beteiligten DltC-Aminosäuren Gln5, Asp5 und Asn48 zu Ala mutiert (*holo*-DltC DltC A3 bzw. *apo*-DltC S36A A3). Ausgehend von diesen beiden Varianten wurden Studien mit DltA in der Transfer-Konformation durchgeführt (Anhang Abbildung 0.9 und Tabelle 3.11).

Ligand	AMP	AMP
DltC	<i>holo</i> -DltC A3	<i>apo</i> -DltC S36A A3
[DltC] (mM)	1	2,7
[DltA] (μ M)	100	270
K_D (μ M)	$3,2 \pm 0,2$	$5,3 \pm 1,2$
N (DltC / DltA)	$0,9 \pm 0,0$	$1,0 \pm 0,0$
ΔH (cal mol ⁻¹)	6522 ± 53	869 ± 21
ΔS (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	47,0	27,1
T	298,15 K	298,15 K
ΔG (cal mol ⁻¹)	-7491	-7211

Tabelle 3.11 **Thermodynamische Parameter für die Titration von DltC A3 zu DltA.** K_D Dissoziationskonstante, ΔH Änderung der Enthalpie, ΔS Änderung der Entropie, ΔG Änderung der freien Enthalpie, T Temperatur.

Analog zu den Experimenten der DltA RR bzw. RW Mutanten können hier ebenfalls keine Änderungen der thermodynamischen Bindungsparameter beobachtet werden, was gegen eine Relevanz der Kontaktfläche in Lösung spricht.

Die Bindung von DltC an DltA nach der Position A des alternativen Komplexes erfolgt nur an die große Domäne von DltA. Daher wurde in einem weiteren Experiment die Bindung von DltC an die isolierte N-terminale große Domäne von DltA (DltA_N) näher untersucht. Für die Titrations-Experimente wurde *holo*-DltC bzw. *apo*-DltC S36A bei einer Konzentration von 7,05 mM bzw. 7,38 mM eingesetzt. Die Konzentration von DltA_N betrug 215 μ M.

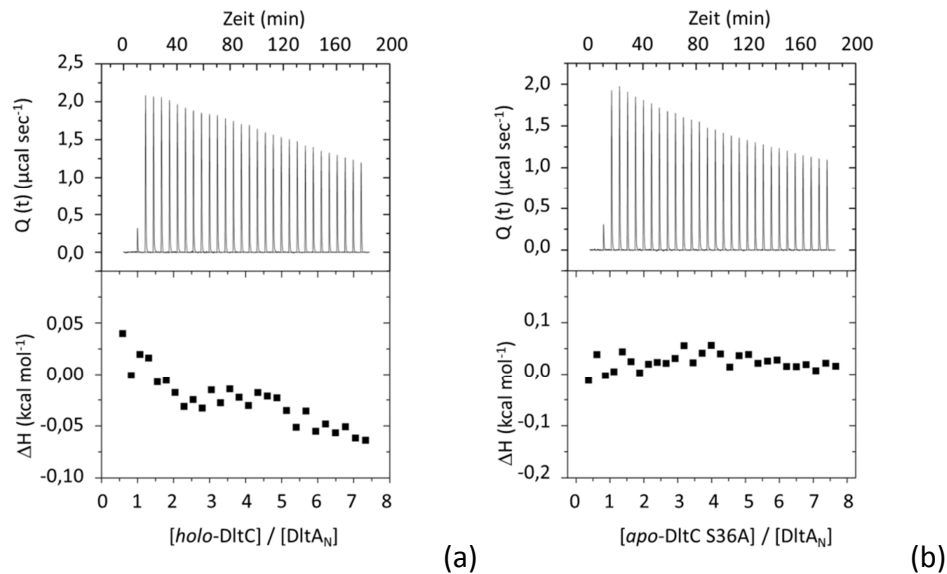


Abbildung 3.27 **Titration von DltC zu DltA_N mittels ITC.** Alle Experimente wurden in 100 mM HEPES/NaOH pH 7,8, 150 mM NaCl, 2 mM TCEP, 10 mM MgCl₂ durchgeführt (a) *holo*-DltC. (b) *apo*-DltC S36A.

Unter Verwendung von *holo*-DltC kann eine sehr schwache Interaktion mit DltA_N beobachtet werden. Die Auftragung des Verhältnisses von *holo*-DltC zu DltA_N gegen die Änderung der Enthalpie pro Titrationschritt konnte nicht entsprechend eines Modells unter der Annahme einer Bindestelle ausgewertet werden. Aufgrund der hohen verwendeten Konzentrationen kann für den K_D vermutlich ein Wert im millimolaren Bereich angenommen werden. Analog zu den Experimenten mit dem Vollängen-DltA ist die Interaktion ebenfalls entropisch getrieben, was auf einen Beitrag an hydrophoben Wechselwirkungen zurückgeführt werden kann. Diese sind sowohl an der Ausbildung der Kontaktfläche zwischen DltC und der großen Domäne im produktiven DltA-DltC-Komplex, als auch bei der Interaktion zwischen DltA und DltC nach der Position A des alternativen Komplexes beteiligt. Bei Verwendung der Cofaktorfreien Variante *apo*-DltC S36A kann keine Interaktion beobachtet werden. Unter Berücksichtigung der Abwesenheit des Cofaktors in dem alternativen DltA-DltC-Komplex wäre eine gleiche oder höhere Affinität des *apo*-DltC S36A zur großen Domäne von DltA im Vergleich zu *holo*-DltC zu erwarten. Demnach kann die Interaktion vermutlich der Bindung an DltA nach dem produktiven Komplex zugeordnet werden, da der Cofaktor hier zur Interaktion mit DltA beiträgt.

3.4.2. Protonierungsreaktionen innerhalb der DltA-DltC-Interaktion

Innerhalb von Protein-Protein-Interaktionen ändert sich die chemische Umgebung der beteiligten Aminosäuren, was sich unter anderem auf die pK_S -Werte auswirken kann. Dementsprechend kann neben der Bindungsenthalpie (ΔH_b) auch die Protonierungsenthalpie (ΔH_p) der übertragenen Protonen (n_H^+) einen Beitrag zur beobachteten Enthalpie (ΔH_{app}) leisten (Formel 3.3). Bei unterschiedlichen Kontaktflächen kann demzufolge auch die mögliche Anzahl an übertragenen Protonen variieren. Die Analyse der an der DltA-DltC-Interaktion beteiligten Protonenübertragungen kann weitere Aufschlüsse über das Vorkommen von zwei möglichen DltC-Bindestellen liefern.

$$\Delta H_{app} = \Delta H_b + n_{H^+} \Delta H_p$$

Formel 3.3 **Einfluss der Übertragung von Protonen bei der Proteininteraktion.** ΔH_{app} beobachtete Änderung der Enthalpie, ΔH_b Änderung der Bindungsenthalpie, ΔH_{prot} Änderung der Protonierungsenthalpie, n_{H^+} Anzahl der übertragenen Protonen.

Zur Analyse, ob Protonierungsreaktionen bei der Komplexbildung unter verschiedenen Bedingungen beteiligt sind, wurden Titrations von *holo*-DltC zu DltA in Anwesenheit von 3 mM AMP oder 2 mM AMPCPP in Puffern mit verschiedenen Protonierungsenthalpien durchgeführt (Anhang Abbildung 0.10) (ΔH_p HEPES -5020 cal mol⁻¹, ΔH_p MOPS -5220 cal mol⁻¹, ΔH_p Tris/HCl -11360 cal mol⁻¹, ΔH_p Bis-Tris-Propan -10800 kcal mol⁻¹) (Bianconi, 2003; Tellgmann, 1998). Die Konzentration des Puffers betrug 50 mM bei pH 7,8. Zusätzlich enthalten waren 150 mM NaCl, 2 mM TCEP und 10 mM MgCl₂.

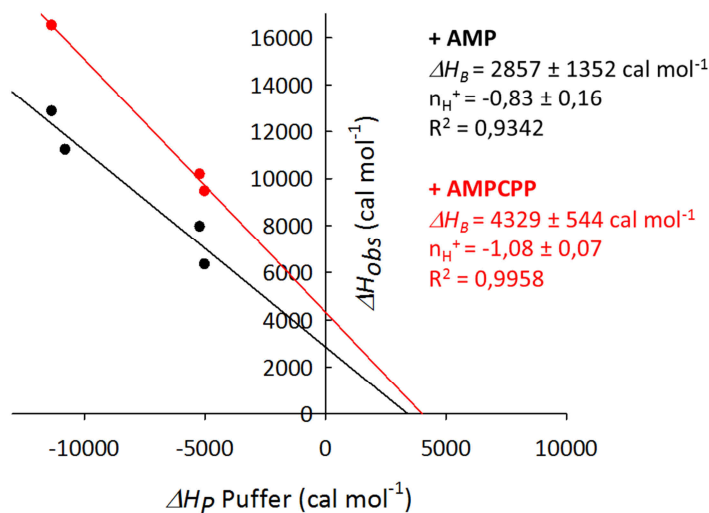


Abbildung 3.28 **Bestimmung der an der *holo*-DltC-DltA-Interaktion beteiligte Protonierungsreaktion.** Anwesenheit von AMP (schwarz) und AMPCPP (rot). Die lineare Kurvenanpassung erfolgte nach Formel 3.3.

Puffer	HEPES	MOPS	Bis-Tris-Propan	Tris/HCl
ΔH_p (cal mol ⁻¹)	-5020	-5220	-10800	-11360
[DltC] (mM)	1,1	1	0,95	1
[DltA] (μ M)	100	100	95	100
K_D (μ M)	$3,3 \pm 0,2$	$3,3 \pm 0,2$	$6,1 \pm 0,2$	$2,9 \pm 0,1$
N (DltC / DltA)	$1,0 \pm 0,0$	$0,98 \pm 0,00$	$1,11 \pm 0,00$	$1,10 \pm 0,00$
ΔH (cal mol ⁻¹)	6358 ± 49	7978 ± 53	11240 ± 47	12880 ± 30
ΔS (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	46,4	51,9	61,6	68,5
T (K)	298,15	298,15	298,15	298,15
ΔG (cal mol ⁻¹)	-7476	-7496	-7126	-7543

Tabelle 3.12 **Thermodynamische Parameter für die Titration von DltC zu DltA + AMP in verschiedenen Puffern.** K_D Dissoziationskonstante, ΔH Änderung der Enthalpie, ΔH_p Änderung der Protonierungsenthalpie, ΔS Änderung der Entropie, ΔG Änderung der freien Enthalpie, T Temperatur.

Ligand	HEPES	MOPS	Tris/HCl
ΔH_p (kcal/mol)	-5020	-5220	-11360
[DltC] (mM)	4,5	2,9	3,0
[DltA] (μ M)	450	290	300
K_D (μ M)	253 ± 7	115 ± 5	162 ± 3
N (DltC / DltA)	$1,33 \pm 0,01$	$0,97 \pm 0,01$	$1,12 \pm 0,01$
ΔH (cal mol ⁻¹)	9481 ± 119	10200 ± 189	16540 ± 170
ΔS (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	48,3	52,2	72,8
T (K)	298,15	298,15	298,15
ΔG (cal mol ⁻¹)	-4920	-5363	-5165

Tabelle 3.13 **Thermodynamische Parameter für die Titration von DltC zu DltA + AMPCPP in verschiedenen Puffern.** K_D Dissoziationskonstante, ΔH Änderung der Enthalpie, ΔH_p Änderung der Protonierungsenthalpie, ΔS Änderung der Entropie, ΔG Änderung der freien Enthalpie, T Temperatur.

Aufgrund der unterschiedlichen apparenten Enthalpien bei Messungen in Puffersystemen mit unterschiedlichen Protonierungsenthalpien kann eine Netto-Übertragung von 0,83 bzw. 1,08 Protonen vom Puffer auf den DltA-DltC-Komplex während der Komplexbildung in Anwesenheit von AMP bzw. AMPCPP gemessen werden (Abbildung 3.28). Für die Interaktion zwischen DltA und DltC kann nach Abzug der Protonierungsenthalpie eine Bindungsenthalpie von 2857 cal mol⁻¹ (in Anwesenheit von AMP) bzw. 4329 cal mol⁻¹ (in Anwesenheit von AMPCPP) erhalten werden.

Sowohl für die DltA-DltC-Interaktion in Anwesenheit von AMP, als auch in Anwesenheit von AMPCPP konnte eine Netto-Protonenaufnahme gemessen werden. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass diese sich aus der Summe aller beteiligten Protonierungs- und Deprotonierungs-Reaktionen bei pH 7,8 zusammensetzt. Weiterhin ist eine Differenz der Bindungsenthalpie zwischen der DltA-DltC-Interaktion in Anwesenheit von AMP oder AMPCPP von 1472 cal mol⁻¹ erkennbar. Diese kann entweder aus unterschiedlichen Interaktionsflächen zwischen DltA und DltC oder aus zusätzlichen energetischen Beiträgen (z.B. konformationelle Änderungen) resultieren. Sind zusätzliche Konformationsänderungen an der DltA-DltC-Interaktion beteiligt, die ebenfalls zu Änderungen der pK_s-Werte von entsprechenden Aminosäuren führen, sind diese auch in der Netto-Protonenübertragung enthalten. Eindeutige Aussagen, die auf gleiche oder unterschiedliche DltC-Bindungen an DltA hindeuten, sind demnach nicht möglich, so dass in weiteren Experimenten zusätzlich die Größe der Interaktionsfläche bestimmt werden soll.

3.4.3. Abschätzung der Größe des Interaktionsfläche

Die DltC-Bindestellen im alternativen (Position A) und produktiven Komplex unterscheiden sich neben der Beteiligung der entsprechenden Aminosäuren auch hinsichtlich der Größe der Kontaktfläche (404 Å² und 1093 Å²). Die Analyse der Größe der Interaktionsfläche unter verschiedenen Bedingungen kann demnach weitere Hinweise auf eine mögliche alternative oder produktive Bindung von DltC an DltA liefern.

Ligand-Protein-Komplexe haben aufgrund der veränderten Oberflächen-Hydratisierung im Vergleich zu den freien Komponenten eine geringere Wärmekapazität (C_p). Die Änderung der molaren Wärmekapazität (ΔC_p) kann als Differenz der polaren (ΔASA_{pol}) und apolaren

(ΔASA_{apol}) Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche zwischen dem Komplex und den freien Bindungspartnern angegeben werden. Die Bindungsenthalpie (ΔH_b) sowie die Änderung der Wärmekapazität kann demnach genutzt werden, um die Interaktionsfläche des Protein-Ligand-Komplexes zu berechnen (Xie and Freire, 1994; Freire, 1994). Für die Berechnung von ΔC_p für die Komplexbildung wurden drei Titrations bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt (20°C, 25°C und 30°C) (Anhang Abbildung 0.11). Nach Formel 3.4 (a) und (b) kann die Differenz der polaren und apolaren Lösungsmittel-zugänglichen Oberflächen zwischen dem DltA-DltC-Komplex und den freien Bindungspartnern berechnet werden (Xie and Freire, 1994). Die empirischen Formeln basieren auf ΔH (60°C). Mittels des Gesetzes nach Kirchhoff (Formel 3.4 (c)) lässt sich ausgehend von ΔH (25°C) die entsprechende Enthalpie bei 60°C berechnen. Für die Berechnung wurde ΔH (25°C) abzüglich der Protonierungsenthalpie verwendet (Abbildung 3.28). Die molare Wärmekapazität der Protonierungsreaktion des HEPES-Puffers beträgt $11 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (Goldberg et al., 2002) und kann demnach vernachlässigt werden.

$$\Delta ASA_{\text{apol}} = \frac{[-8,44 \cdot \Delta C_p + 0,26 \cdot \Delta H(60^\circ\text{C})]}{4,262} \quad (\text{a}) \quad \Delta ASA_{\text{pol}} = \frac{[31,4 \cdot \Delta C_p - 0,45 \cdot \Delta H(60^\circ\text{C})]}{-4,262} \quad (\text{b})$$

$$\Delta H(T_2) = \Delta H(T_1) + \Delta C_p \cdot (T_2 - T_1) \quad (\text{c})$$

Formel 3.4 (a) und (b) Berechnung der Differenz der polaren und apolaren Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche. (c) Gesetz nach Kirchhoff. ΔASA_{apol} Differenz der apolaren Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche, ΔASA_{pol} Differenz der polaren Lösungsmittel-zugänglichen Oberfläche, ΔC_p Änderung der molaren Wärmekapazität, ΔH Änderung der Enthalpie, ΔH (60°C) Änderung der Enthalpie bei 60°C. T_1 Temperatur 1, T_2 Temperatur 2.

Es ist ersichtlich, dass unter Verwendung von AMP die Messung bei verschiedenen Temperaturen zu keiner Änderung der freien Enthalpie und daraus resultierend nicht zu einer Änderung der Dissoziationskonstante der DltA-DltC-Interaktion führte (Anhang Abbildung 0.11 und Tabelle 3.14). Werden die Experimente in Anwesenheit von AMPCPP durchgeführt können größere Schwankungen innerhalb der freien Enthalpien und Dissoziationskonstanten beobachtet werden, die vermutlich auf Limitierungen in der sigmoiden Kurvenanpassung der Messergebnisse zurückzuführen sind (Anhang Abbildung 0.11 und Tabelle 3.15).

Temperatur	20°C	25°C	30°C
[DltC] (mM)	1	1,1	1
[DltA] (μM)	100	100	100
K_D (μM)	$4,9 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,2$	$5,6 \pm 1,1$
N (DltC / DltA)	$1,08 \pm 0,00$	$1,00 \pm 0,00$	$0,92 \pm 0,02$
ΔH (cal mol^{-1})	9779 ± 30	6358 ± 49	1904 ± 67
ΔS ($\text{cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)	57,6	46,4	30,3
ΔG (cal mol^{-1})	-7106	-7476	-7276

Tabelle 3.14 Thermodynamische Parameter für die Titration von DltC zu DltA + AMP bei verschiedenen Temperaturen. K_D Dissoziationskonstante, ΔH Änderung der Enthalpie, ΔS Änderung der Entropie, ΔG Änderung der freien Enthalpie, T Temperatur.

Temperatur	20°C	25°C	30°C
[DltC] (mM)	2,6	4,5	2,6
[DltA] (μM)	260	450	260
K_D (μM)	255 ± 13	253 ± 7	103 ± 3
N (DltC / DltA)	1,12 ± 0,02	1,33 ± 0,01	1,08 ± 0,03
ΔH (cal mol ⁻¹)	10020 ± 364	9481 ± 119	8018 ± 91
ΔS (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	50,6	48,3	44,7
ΔG (cal mol ⁻¹)	-4813	-4920	-5533

Tabelle 3.15 **Thermodynamische Parameter für die Titration von DltC zu DltA + AMPCPP bei verschiedenen Temperaturen.** K_D Dissoziationskonstante, ΔH Änderung der Enthalpie, ΔS Änderung der Entropie, ΔG Änderung der freien Enthalpie, T Temperatur.

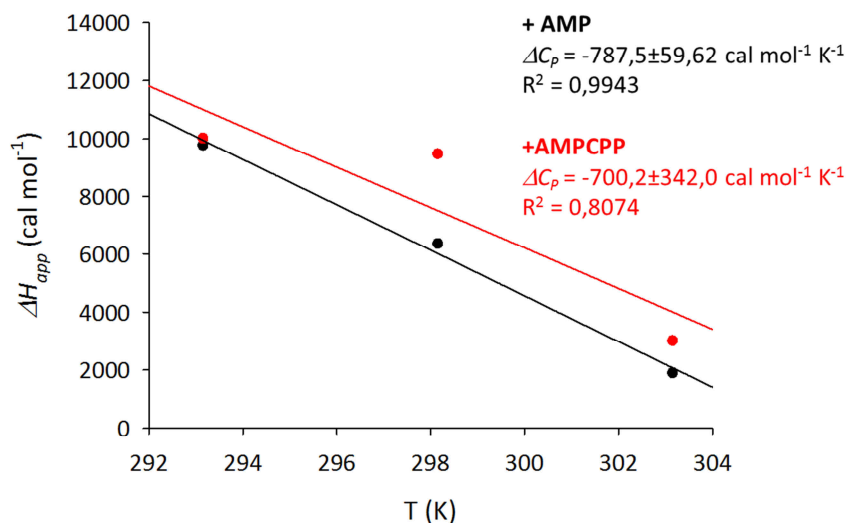


Abbildung 3.29 **Änderung der molaren Wärmekapazität bei der Interaktion zwischen *holo* DltC und DltA.** In Anwesenheit von AMP (schwarz) und AMPCPP (rot). Die lineare Kurvenanpassung erfolgte nach $\Delta H_{app} = \Delta H(T) + \Delta C_p T$.

Ligand	AMP	AMPCPP
$\Delta H_B(25^\circ\text{C})$ (cal mol ⁻¹)	2857	4329
$\Delta H_B(60^\circ\text{C})$ (cal mol ⁻¹)	-24706	-20178
ΔC_p (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	-787,5	-700,2
$\Delta ASA_{\text{apolar}}$ (Å ²)	52	157
$\Delta ASA_{\text{polar}}$ (Å ²)	3193	3028
$\Delta ASA_{\text{gesamt}}$ (Å ²)	3245	3185
Kontaktfläche (Å ²)	1623	1593

Tabelle 3.16 **Zusammenfassung der Parameter zur Berechnung der DltA-DltC-Kontaktfläche.** Die Berechnung der $\Delta ASA_{\text{gesamt}}$ ergibt sich aus Formel 3.4. Die Kontaktfläche entspricht $\Delta ASA_{\text{gesamt}}/2$. $\Delta H_B(25^\circ\text{C})$ Änderung der Bindungsenthalpie bei 25°C, $\Delta H_B(60^\circ\text{C})$ Änderung der Bindungsenthalpie bei 60°C, ΔC_p Änderung der spezifischen Wärmekapazität.

Für die Interaktion von DltA und *holo*-DltC in Anwesenheit von AMP oder AMPCPP können ähnliche ΔC_p erhalten werden (AMP $\Delta C_p = -787,5 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ und AMPCPP $\Delta C_p = -700,2 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) (Abbildung 3.29). Zusammen mit der Bindungsenthalpie resultieren daraus ähnliche Größen für die DltA-DltC-Kontaktflächen (AMP 1623 Å² und AMPCPP 1593 Å²). Im Vergleich der experimentell bestimmten mit den mittels PISA ermittelten Interaktionsflächen (1093 Å² für den produktiven und 404 Å² für die Position A

des alternativen DltA-DltC-Komplex) erscheint die Interaktion zwischen DltA und DltC bei beiden Bedingungen entsprechend der des produktiven Komplexes am wahrscheinlichsten. Die erhaltenen Parameter für $\Delta H_B(25^\circ\text{C})$ und ΔC_p unterliegen jedoch auf Grund der Datenqualität (vor allem in Anwesenheit des AMPCPP) teils starken Abweichungen, so dass die daraus berechneten Kontaktflächen nur eine Orientierung darstellen können. In den vorherigen Kapiteln wurden mögliche Konformationsänderungen von DltA zur Interaktion mit DltC beschrieben. Es kann vermutet werden, dass Konformationsänderungen ebenfalls einen Beitrag zum beobachteten ΔC_p liefern könnten, da diesen ebenfalls Änderungen der Lösungsmittel-zugänglichen Oberflächen innerhalb des DltA zu Grunde liegen. Es kann nicht geklärt werden, ob ohne Abspaltung des Pyrophosphates eine Änderung von der Adenylierungs-zur Transfer-Konformation erfolgen kann. Jedoch liegt der Sättigungsgrad von DltA mit AMPCPP nur bei 75%, so dass ein signifikanter Anteil an DltA in der offenen Nukleotid-freien Form vorgelegen hatte. Demzufolge könnten die hier beschriebenen thermodynamischen Parameter auch die Interaktion mit DltC und DltA in der offenen Form widerspiegeln.

Schlussfolgernd kann festgestellt werden, dass eine Interaktion zwischen DltA und DltC wie im alternativen Komplex, mittels ITC-Experimenten vermutlich nicht beobachtet werden konnte. Die Bindung im alternativen DltA-DltC-Komplex erfolgt nur an die große Domäne des DltA. Würden die niedrigen Affinitäten, die in Anwesenheit von AMPCPP oder ohne Ligand beobachtet worden sind, auf diese Interaktion zurückgeführt werden können, sollte unter Verwendung der isolierten DltA-Domäne eine ähnliche Affinität beobachtet werden. Es war jedoch eine deutliche Abnahme der Affinität feststellbar. Die sehr niedrige Affinität der Interaktion zwischen DltA und DltC in Anwesenheit von AMPCPP oder ohne Ligand sind daher vermutlich auf konformationelle Änderungen von DltA während der Interaktion mit DltC zurückzuführen. Diese These konnte durch die Ermittlung der Größe der Kontaktfläche zusätzlich bestätigt werden, da unter Verwendung von AMP und AMPCPP, welche in DltA die Transfer- oder Adenylierungs-Konformation stabilisieren, eine ähnliche Größe für die Kontaktfläche ermittelt werden konnte.

3.5. Kinetische Charakterisierung der DltA-katalysierten D-Alanylierung des DltC

Anhand biophysikalischer, biochemischer oder thermodynamischer Analysen konnte eine Interaktion zwischen DltA und DltC, wie sie im alternativen Komplex beobachtet wurde, nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Funktion dieser Interaktion könnte innerhalb der DltA-katalysierten D-Alanylierung von DltC liegen. Dabei könnte die Bindung von DltC an die große Domäne eine allosterische Beeinflussung der Reaktion bedingen. Um diese These zu prüfen wurde ein Assay etabliert, der eine kinetische Charakterisierung der DltA-katalysierten D-Alanylierung von DltC ermöglicht.

3.5.1. Zeitabhängigkeit der Reaktion

Nach Übertragung des D-Ala aus dem von DltA gebildeten D-Ala-Adenylat verbleibt ein AMP im DltA, welches anschließend aufgrund der niedrigen Affinität ($K_D = 529 \mu\text{M}$) aus dem Protein freigesetzt wird. Die Bildung des AMP als Produkt in der DltA-katalysierten D-Alanylierung des DltC wurde zeitabhängig bei verschiedenen DltC-Konzentrationen mittels HPLC detektiert. Die Reaktionspartner wurden gemischt (ohne DltA) und nach 10 min Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von $0,2 \mu\text{M}$ DltA gestartet und in definierten Zeitabständen durch 5 min Erhitzen bei 95°C abgestoppt.

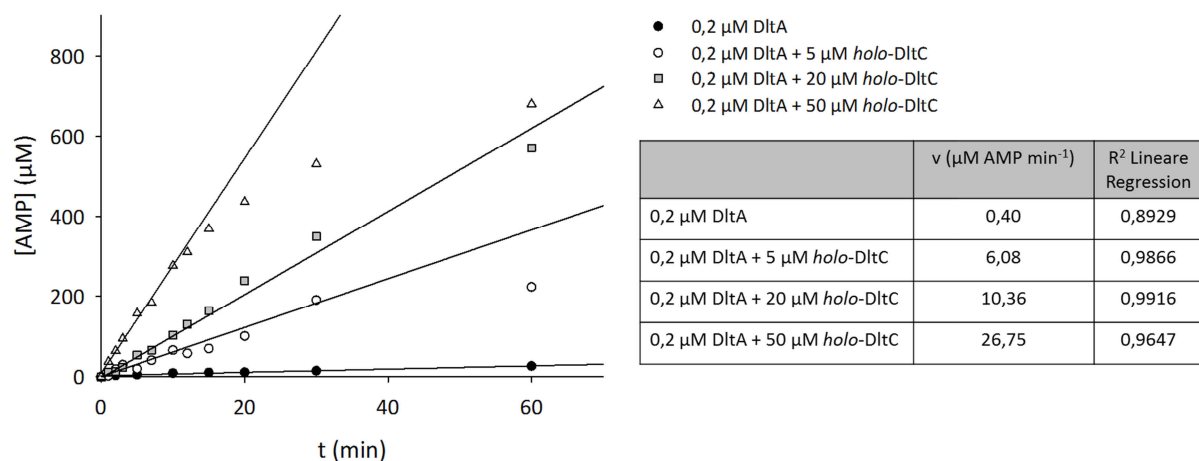


Abbildung 3.30 Zeitabhängigkeit der DltA katalysierten AMP Freisetzung.

Der zeitabhängige Verlauf der DltA-katalysierten AMP-Freisetzung ist in Abbildung 3.30 dargestellt. In Abwesenheit von *holo*-DltC weist DltA eine geringe, jedoch nicht zu vernachlässigende AMP-Freisetzung von $0,4 \mu\text{M AMP min}^{-1}$ auf. Diese wird durch die Anwesenheit des *holo*-DltC beschleunigt. In Abwesenheit des D-Ala kann keine DltA-katalysierte AMP-Freisetzung beobachtet werden (nicht gezeigt). DltC besitzt nur einen D-alanylierbaren Cofaktor. Dementsprechend sollte die DltC-Konzentration die Limitierung für das maximal freigesetzte AMP darstellen. Allerdings liegt die Konzentration des produzierten AMP deutlich höher als die eingesetzte DltC-Konzentration. Es kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass der gebildete Thioester zwischen dem D-Ala und der Thiolgruppe des Cofaktor des *holo*-DltC unter diesen Bedingungen instabil ist, so dass kontinuierlich freies *holo*-DltC generiert wird, was zu einer Amplifizierung des Signals führt. Die Definition eines reversiblen Aktivators ist die Beschleunigung der Reaktion ohne dabei selbst „verbraucht“ zu werden. Obwohl *holo*-DltC ein Substrat für DltA *in vivo* darstellt, kann es unter diesen Bedingungen als Aktivator definiert werden, da DltA auch in Abwesenheit des *holo*-DltC ATP verbraucht und AMP generiert, die Reaktion in Anwesenheit des *holo*-DltC jedoch beschleunigt wird (Abbildung 3.31).

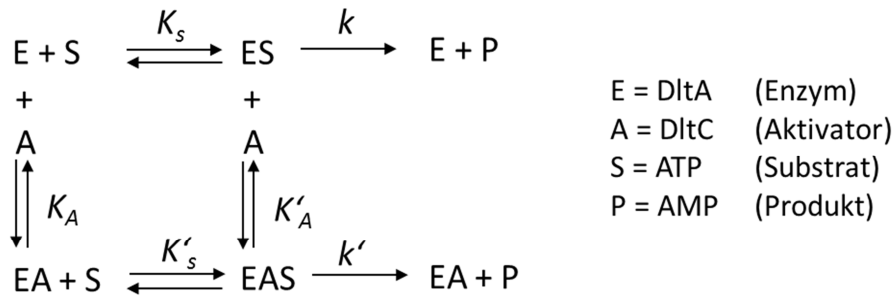


Abbildung 3.31 Vereinfachtes Reaktionsschema für die durch DltA katalysierte Reaktion.

3.5.2. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration

Die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit im *steady state* in Abhängigkeit von der Substrat- (Aktivator-) Konzentration wird durch Ein-Punkt-Messungen für jede Substratkonzentration durchgeführt. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, sind Kenntnisse über den linearen Verlauf des freigesetzten AMP pro Zeiteinheit erforderlich. Es ist ersichtlich, dass eine Reaktionszeit von 1-10 Minuten für alle getesteten Bedingungen gut detektierbare Konzentrationen an AMP liefert, der lineare Teil des Reaktionsverlaufes jedoch nicht überschritten wird (Abbildung 3.30). Für alle gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten wurde die AMP-Freisetzung durch DltA in Abwesenheit von DltC berücksichtigt. Für die Auswertung nach einer Reaktion pseudo 1. Ordnung wurden stets hohe Konzentrationen des nicht variierenden Substrates (Aktivators) verwendet, so dass dessen Verbrauch keine Limitierung für die Geschwindigkeit darstellt.

3.5.2.1. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der DltC-Konzentration

AMP wird aus dem D-Ala-Adenylat, welches von DltA zur Aktivierung des D-Ala gebildet wird, freigesetzt. Dies erfolgt zum geringen Maße in Abwesenheit des *holo*-DltC (Abbildung 3.30). Es ist jedoch ersichtlich, dass eine Erhöhung der *holo*-DltC Konzentration ebenfalls eine Erhöhung der AMP Konzentration pro Zeiteinheit bedingt (Abbildung 3.30). Durch Auftragung der Geschwindigkeit der AMP-Freisetzung, nach Subtraktion der Reaktion in Abwesenheit des *holo*-DltC gegen die *holo*-DltC Konzentration ergibt sich eine hyperbole Verteilung der Messpunkte (Abbildung 3.32). Die Kurvenanpassung erfolgte unter Annahme des *holo*-DltC als Aktivators (Formel 3.5 (b)). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.17 zusammengefasst.

$$v_{\text{obs}} = \frac{V_m \cdot [S]_0 \cdot K'_A + V_m \cdot \frac{k'}{k} \cdot [A]_0 \cdot [S]_0}{K'_A \cdot K_S + K'_A \cdot [S]_0 + [A]_0 \cdot [S]_0 + [A]_0 \cdot K'_S} \quad (\text{a}) \qquad v_{\text{aktiviert}} = \frac{V'_m [A]_0}{K'_A + [A]_0} \quad (\text{b})$$

Formel 3.5 (a) Geschwindigkeitsgleichung eines Aktivators. (b) Nach Subtraktion der Geschwindigkeit der nichtaktivierten Reaktion, unter der Bedingung $K_S \ll [S]_0$ und mit $V'_m = V_m k'/k$.

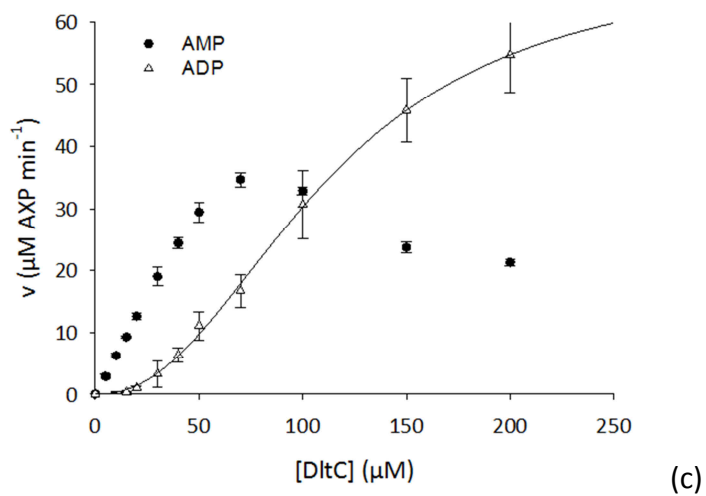
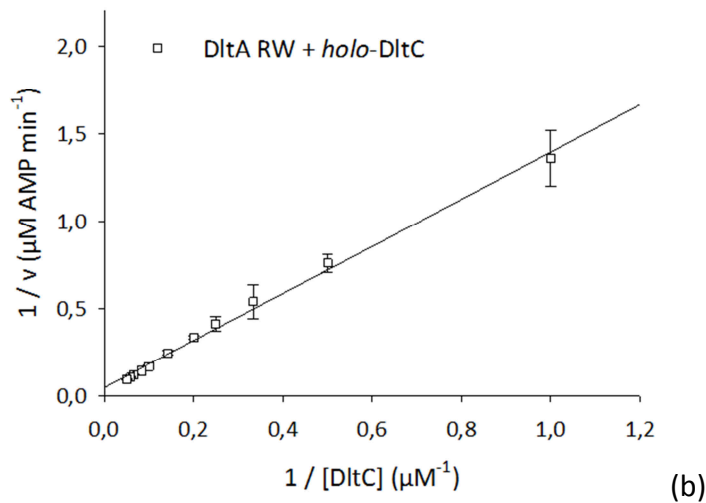
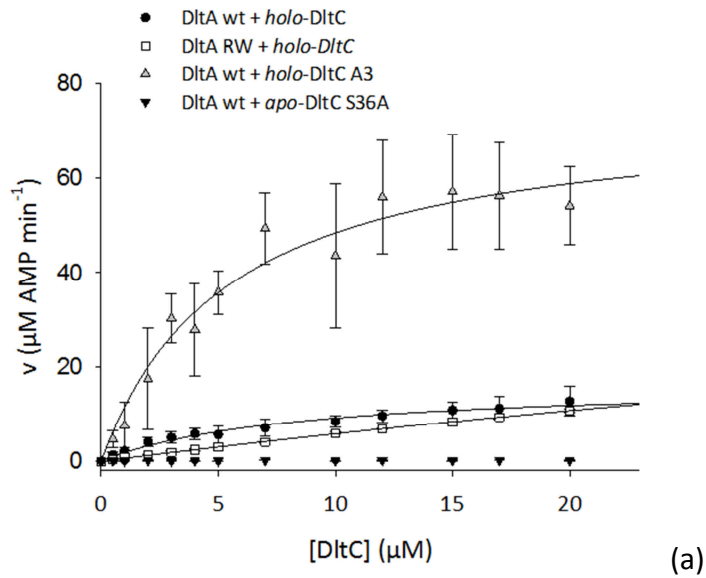


Abbildung 3.32 **Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der DltC-Konzentration. (a) Kurvenanpassung nach Michaelis-Menten.** DltA wt und *holo*-DltC ($R^2=0,9806$), DltA RW und *holo*-DltC ($R^2=0,9994$), DltA wt und *holo*-DltC A3 ($R^2=0,9663$), DltA wt und *apo*-DltC S36A. **(b) Kurvenanpassung nach Lineweaver-Burk.** DltA RW und *holo*-DltC ($R^2=0,9948$). **(c) Freigesetztes AMP bzw. ADP pro Zeiteinheit.** DltA RW und *holo*-DltC.

Parameter	K'_A (μM)	V'_m ($\mu\text{M AMP min}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K'_A ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)
DltA wt+ <i>holo</i> -DltC	$8,2 \pm 1,3$	$16,7 \pm 1,2$	1,4	$1,7 \cdot 10^5$
DltA wt+ <i>holo</i> -DltC A3	$5,4 \pm 1,1$	$74,7 \pm 5,6$	6,2	$11,5 \cdot 10^5$
DltA RW+ <i>holo</i> -DltC	$68,2 \pm 7,7$	$106,6 \pm 13,8$	8,9	$1,3 \cdot 10^5$
DltA RW+ <i>holo</i> -DltC*	$28,0 \pm 2,8$	$20,8 \pm 5,2$	1,7	$0,6 \cdot 10^5$
DltA wt+ <i>apo</i> -DltC S36A	-	-	-	-

Tabelle 3.17 Zusammenfassung der kinetischen Parameter der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der DltC-Konzentration. * Lineare Regression.

Für die Reaktion von DltA und *holo*-DltC konnte ein K'_A von $8,2 \mu\text{M}$ und eine Maximalgeschwindigkeit von $16,7 \mu\text{M AMP min}^{-1}$ erhalten werden. Dies entspricht einer Wechselzahl von $1,4 \text{ s}^{-1}$. Durch den niedrigen K'_A ergibt sich eine hohe katalytische Effizienz von $1,7 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ für die *holo*-DltC-abhängige Reaktion (Abbildung 3.32 und Tabelle 3.17). Neben *holo*-DltC und DltA wt wurde die Reaktionsgeschwindigkeit auch unter Verwendung von DltA RW und *holo*-DltC A3 sowie der Cofaktor-freien Variante *apo*-DltC S36A untersucht (Abbildung 3.32). Die Beschleunigung der Freisetzung des AMP pro Zeiteinheit ist abhängig von der Anwesenheit des 4'-Phosphopantethein-Cofaktors. Bei Verwendung der Cofaktor-freien Variante *apo*-DltC S36A konnte keine Aktivität beobachtet werden (Abbildung 3.32).

Eine Mutation der Bindestelle nach Position B des alternativen DltA-DltC-Komplexes (*holo*-DltC A3), resultiert in einem mit DltA wt vergleichbaren K'_A von $5,4 \mu\text{M}$. Beide Werte gleichen den mittels ITC bestimmten K_D -Werten ($3,3 \mu\text{M}$ bzw. $3,2 \mu\text{M}$). Die Maximalgeschwindigkeit wird dabei jedoch mehr als vervierfacht, was sich in einer höheren katalytischen Effizienz widerspiegelt. Die Erhöhung der Maximalgeschwindigkeit bei konstantem K'_A ist ein Resultat der Verringerung der Energie des Übergangszustandes des Komplexes, ohne die Energie der Bildung des Enzym-Substratkomplexes zu beeinflussen. Mittels CD- und NMR-Experimenten konnten Unterschiede zwischen DltC und DltC A3 festgestellt werden (Anhang), so dass strukturelle Änderungen durch Einführen der A3-Mutation nicht ausgeschlossen werden können.

Wird die DltC-Bindestelle nach Position A des alternativen Komplexes mutiert (DltA RW), kann für den in Abbildung 3.32 (a) gemessenen Bereich keine hyperbole Verteilung der Messpunkte beobachtet werden. Eine Auswertung unter Verwendung einer hyperbolen Kurvenanpassung stellte sich dabei als ungeeignet heraus, da die Datenpunkte im Sättigungsbereich der hyperbolen Kurve fehlen. Zur Ermittlung der kinetischen Parameter wurde aus diesem Grund zudem die Lineweaver-Burk Auftragung verwendet (Abbildung 3.32 (b)). Auffallend ist die starke Abweichung der K'_A bzw. V'_m zwischen den beiden Regressionsvarianten. In beiden Fällen kann eine Erhöhung des K'_A sowie des V'_m festgestellt werden. Die katalytische Effizienz hingegen ist nahezu unverändert. Dies beruht auf einer Verringerung der Energie der Bildung des Enzym-Substratkomplexes ohne Änderung des energetischen Niveaus des Übergangszustandes. Werden höhere DltC-Konzentrationen verwendet, wird eine Maximalgeschwindigkeit von ca. $35 \mu\text{M AMP min}^{-1}$ bei $70 \mu\text{M}$ *holo*-DltC erreicht (Abbildung 3.32 (c)). Wird die Konzentration an *holo*-DltC weiterhin erhöht, kann eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet werden. Bei Analyse der Nukleotid-Verteilung kann neben einem Anstieg der AMP-Konzentration unter diesen Bedingungen auch eine Zunahme der ADP-Konzentration ab einer DltC Konzentration von

30 μM festgestellt werden. In Vorversuchen konnte bei *holo*-DltC und DltA bei hohen DltC-Konzentrationen ebenfalls eine Zunahme des ADP beobachtet werden. Unter Verwendung der Variante DltA RR konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden (nicht gezeigt).

Die Zunahme der ADP-Konzentration bei hohen DltC-Konzentrationen stellt eine Erklärung für die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit dar, da sie eine signifikante Abnahme der ATP-Konzentration zur Folge hat. ADP stellt in dem bekannten Reaktionsmechanismus kein Intermediat sondern ein Nebenprodukt dar. Eine korrekte Analyse von V'_m gestaltet sich demnach schwierig, da bei einer DltC-Konzentration von 70 μM eine Reaktionsgeschwindigkeit von 35 $\mu\text{M AMP min}^{-1}$ beobachtet werden kann (Abbildung 3.32 (c)). Diese liegt zwischen den ermittelten Maximalgeschwindigkeiten von 20,8 $\mu\text{M AMP min}^{-1}$ (linear) und 106,6 $\mu\text{M AMP min}^{-1}$ (hyperbol). Die in DltA RW mutierten Aminosäuren liegen weit entfernt vom aktiven Zentrum. Eine allosterische Beeinflussung der Reaktion kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Zur Analyse, ob die beobachteten Unterschiede zwischen DltA wt und DltA RW in Abhängigkeit der DltC-Konzentration auf unterschiedliche Aktivitäten des DltA selbst, oder auf ein Verlust der möglichen DltC-Bindestelle an der großen Domäne des DltA zurückzuführen sind, wurde zudem die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der ATP bzw. DltA-Konzentration ermittelt.

3.5.2.2. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der D-Ala und ATP-Konzentration

Neben der Konzentrationsabhängigkeit von DltC wurde die Reaktionsgeschwindigkeit zudem in Abhängigkeit von der D-Ala sowie der ATP-Konzentration bestimmt. Dafür wurde eine *holo*-DltC Konzentration von 20 μM gewählt. Die Reaktionszeit betrug 1 min für die ATP- und 2 min für die D-Ala-abhängige Versuchsreihe. Die ATP-Abhängigkeit wurde zudem auch in Abwesenheit von *holo*-DltC sowie unter Verwendung der Variante DltA RW analysiert. Dabei betrug die Reaktionszeit 10 min. Die Kurvenanpassung der hyperbol verteilten Datenpunkte in Ab- und Anwesenheit von DltC erfolgte nach Formel 3.6 (a) und (b).

$$v = \frac{V_m [S]_0}{K_S + [S]_0} \quad (\text{a}) \qquad v_{\text{aktiviert}} = \frac{V'_m [S]_0}{K'_S + [S]_0} \quad (\text{b})$$

Formel 3.6 **Geschwindigkeitsgleichung ausgehend von Formel 3.5 (a) In Abwesenheit des Aktivators. (b) In Anwesenheit des Aktivators**, nach Subtraktion der Geschwindigkeit der nichtaktivierten Reaktion, unter der Bedingung $K'_A \ll [A]_0$ und mit $V'_m = V_m k'/k$.

Die K_S - bzw. K'_S -Werte für die ATP-abhängige als auch für D-Ala-abhängige Reaktion waren deutlich höher als für die DltC-abhängige Reaktion (Abbildung 3.33 und Tabelle 3.18). Die Größenordnung der Maximalgeschwindigkeit hingegen blieb unverändert, wodurch sich eine um zwei Größenordnungen verringerte katalytische Effizienz sowohl für ATP, als auch für D-Ala im Vergleich zu DltC ergibt. Die Geschwindigkeiten sollten unabhängig von der Konzentrationsabhängigkeit an ATP, D-Ala oder DltC den gleichen Maximalwert erreichen. Die Verwendung unterschiedlicher *holo*-DltC Präparationen stellt eine mögliche Ursache für die beobachteten Unterschiede dar. Der K'_S -Wert für ATP bzw. D-Ala hingegen sollte von der Präparation des *holo*-DltC unbeeinflusst sein. Weiterhin kann festgestellt werden, dass sich

die Affinität für ATP in Abwesenheit des DltC verdoppelte, während sich die gemessene Maximalgeschwindigkeit ca. um den Faktor 75 verringerte. In Abwesenheit von *holo*-DltC konnte kein signifikanter Unterschied zwischen DltA wt und DltA RW beobachtet werden. Wird bei einer Mehrsubstratreaktion der K_m (bzw. K_s) sowie der k_{cat} für das erste Substrat (hier ATP) in Anwesenheit des zweiten Substrates (hier DltC) erhöht, kann ein Ping-Pong Mechanismus für die Bindung der Substrate vermutet werden.

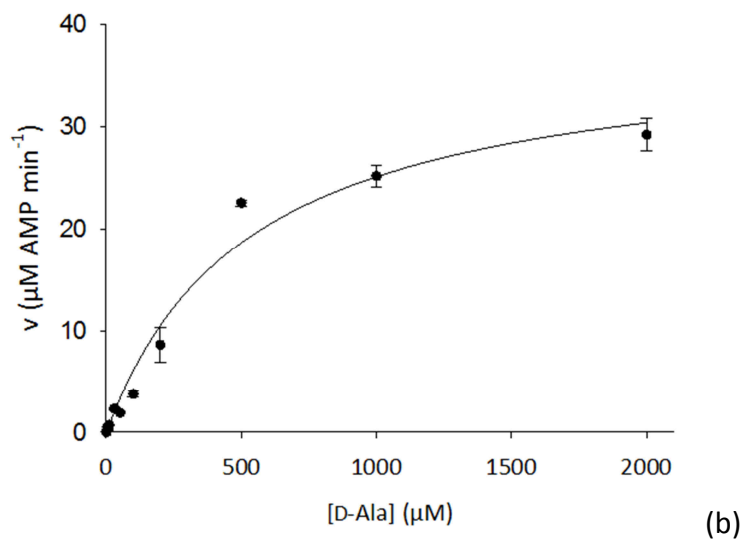
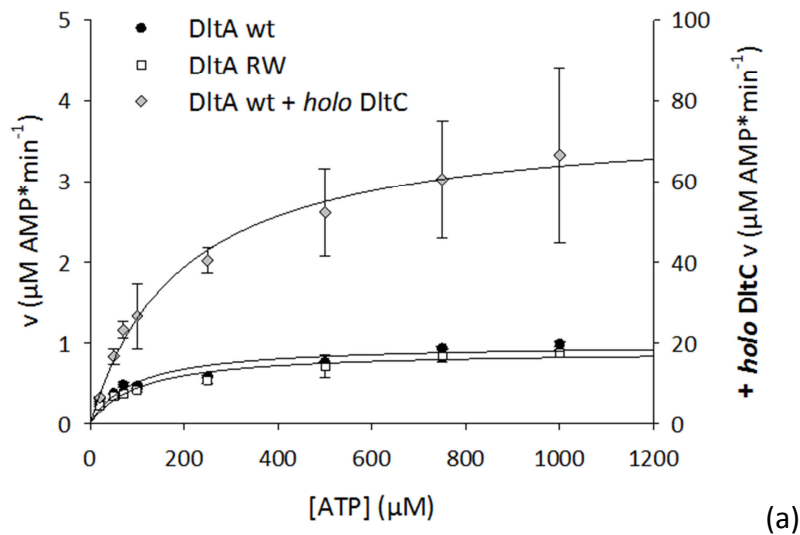


Abbildung 3.33 **Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der ATP und D-Ala-Konzentration.** (a) **In Abhängigkeit von der ATP-Konzentration.** Verwendung von DltA wt in An- und Abwesenheit von 20 μM *holo*-DltC sowie unter Verwendung von DltA RW. Die Kurvenanpassung erfolgte nach Michaelis-Menten mit $R^2 = 0,9908$ (DltA wt + 20 μM *holo*-DltC), $R^2 = 0,9050$ (DltA wt), $R^2 = 0,9354$ (DltA RW). (b) **In Abhängigkeit von der D-Ala Konzentration in Anwesenheit von 20 μM *holo*-DltC.** Unter Verwendung von DltA wt mit 20 μM *holo*-DltC. Die Kurvenanpassung erfolgte nach Michaelis-Menten mit $R^2 = 0,9793$ (DltA wt + 20 μM *holo*-DltC).

Parameter	K_s bzw. K'_s (μM)	V'_m bzw. V_m ($\mu\text{M AMP min}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K'_s ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)
D-Ala (DltA wt + <i>holo</i> -DltC)	$530,9 \pm 116,5$	$38,4 \pm 3,2$	3,2	$6,0 \cdot 10^3$
ATP (DltA wt + <i>holo</i> -DltC)	$192,3 \pm 22,0$	$74,9 \pm 2,9$	6,3	$32,8 \cdot 10^3$
ATP (DltA wt)	$95,5 \pm 26,0$	$1,00 \pm 0,08$	0,1	$0,9 \cdot 10^3$
ATP (DltA RW)	$101,7 \pm 23,3$	$0,91 \pm 0,06$	0,1	$0,7 \cdot 10^3$

Tabelle 3.18 Zusammenfassung der kinetischen Parameter der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der ATP- und D-Ala Konzentration.

3.5.3. Einfluss der DltA-Konzentration

Die gemessene Reaktionsgeschwindigkeit weist bei monomeren Enzymen eine lineare Abhängigkeit von der Enzymkonzentration auf. Abweichungen von der Linearität geben Auskunft über Oligomerisierungszustände und intermolekulare Wechselwirkungen. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde bei verschiedenen DltA wt- und DltA RW-Konzentrationen in An- und Abwesenheit von *holo*-DltC gemessen. Die Reaktionszeit variierte abhängig von der eingesetzten Enzymkonzentration von 1-10 min.

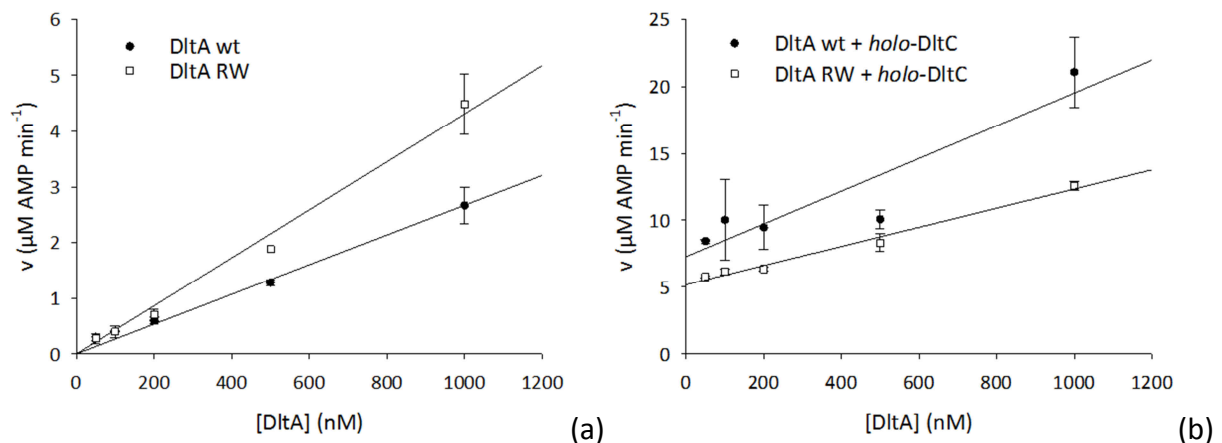


Abbildung 3.34 Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der DltA-Konzentration. (a) In Abwesenheit von *holo*-DltC. Lineare Regression mit $y_0=0$. (b) In Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ *holo*-DltC. Lineare Regression $R^2 = 0,8016$ (DltA wt), $R^2 = 0,9821$ (DltA RW).

Geschwindigkeit	$v/[DltA]$ (ohne DltC)	$v/[DltA]$ (mit DltC)	$(v/[DltA] (+DltC))/(v/[DltA] (-DltC))$
DltA wt	0,0027	0,0122	4,5
DltA RW	0,0043	0,0072	1,7

Tabelle 3.19 Anstiege aus der linearen Kurvenanpassung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der DltA Konzentration.

Es ist ersichtlich, dass sowohl für DltA wt als auch für DltA RW eine lineare Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Enzymkonzentration vorliegt (Abbildung 3.34). Für die Variante DltA RW konnte eine stärkere Steigung der Reaktionsgeschwindigkeit bei Erhöhung der Konzentration beobachtet werden. Eine mögliche allosterische Beeinflussung der inserierten RW-Mutation könnte sich auf eine leicht erhöhte Aktivität von DltA RW im Vergleich zu DltA wt auswirken. Gründe für eine Zunahme der Aktivität könnten eine schnellere Bildung des Adenylat-Intermediates oder eine schnellere Produktfreisetzung darstellen. Im Gegensatz dazu erreichte DltA wt in Gegenwart von *holo*-DltC auch bei geringen

Konzentrationen eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit. Dabei muss berücksichtigt werden, dass der K'_A von DltA wt für *holo*-DltC um das 3,4 fache niedriger ist als von DltA RW. Unter den gewählten Konzentrationen ist DltA wt zu 55% und DltA RW zu 26% mit *holo*-DltC gesättigt. Da DltC als „Aktivator“ für D-Ala-Adenylat-Bildung angesehen werden kann, ist die Reaktionsgeschwindigkeit demnach für DltA wt in Anwesenheit von *holo*-DltC höher. Beim Vergleich des Aktivierungseffektes $((v/[DltA] (+ DltC))/(v/[DltA] (- DltC)))$ ergibt sich für DltA wt eine 4,9-fache und für DltA RW eine 1,6-fache Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit (Tabelle 3.19). Der Quotient der Aktivierungseffizienz von DltA wt und DltA RW von 2,6 entspricht dem Quotienten der katalytischen Effizienz von DltA wt und DltA RW von 2,8. Demnach ist die stärkere Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit von DltA wt im Vergleich mit DltA RW in Anwesenheit von *holo*-DltC nur auf den niedrigeren K'_A von DltA wt für *holo*-DltC zurückzuführen.

Innerhalb des DltA RW ist die Bindestelle für DltC nach Position A des alternativen DltA-DltC-Komplexes mutiert. Mittels ITC-Experimente konnte kein Einfluss dieser Mutation auf die Bindung von DltC an DltA beobachtet werden. Während der kinetischen Charakterisierung der DltA-katalysierten D-Alanylierung von DltC konnten Unterschiede in der Aktivität von DltA wt und DltA RW festgestellt werden. Die dabei beobachteten Differenzen betreffen die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der DltC- und der DltA-Konzentration. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der ATP-Konzentration blieb dabei unbeeinflusst, sodass die beobachteten Unterschiede vermutlich nicht auf die Bindung des Substrates ATP zurückzuführen sind. Die Positionen der mutierten Aminosäuren (Glu125→Arg und Glu128→Trp) liegen innerhalb der großen Domäne, weit entfernt vom aktiven Zentrum. Eine allosterische Beeinflussung der Aktivität des DltA kann dabei jedoch nicht ausgeschlossen werden, da in Abwesenheit des DltC die Reaktionsgeschwindigkeit von DltA RW stärker mit Zunahme der Enzymkonzentration (DltA) steigt. Zusammenfassend kann der Einfluss dieser Mutation auf die D-Alanylierung des DltC nicht eindeutig geklärt werden, da DltA RW Unterschiede in der Aktivität im Vergleich zu DltA wt aufweist.

4. Diskussion

4.1. Konformationelle Untersuchungen von DltA und DltC

4.1.1. Konformationelle Analyse des DltA

2008 wurde bereits von YONUS et al. anhand der Röntgenkristallstrukturen des DltA von *Bacillus subtilis* und der verwandten Proteine Luziferase aus *Photinus pyralis* (Nakatsu et al., 2006; Franks et al., 1998), DhbE aus *Bacillus subtilis* (May et al., 2002) sowie DltC aus *Lactobacillus rhamnosus* (Volkman et al., 2001) ein Reaktionszyklus-Modell postuliert. Dabei kann DltA in Abhängigkeit des enthaltenen Substrates, Reaktionsintermediates oder Produktes eine unterschiedliche Orientierung der kleinen Domäne im Vergleich zur großen Domäne aufweisen. In den Röntgenkristallstrukturen von DltA aus *Bacillus cereus*, welches im Komplex mit ATP (Osman et al., 2009) bzw. dem D-Ala-Adenylat (Du et al., 2008) kristallisiert wurde, nehmen beide DltA-Moleküle, analog zum dem beschriebenen Modell, die (Post-) Adenylierungs-Konformation an. Versuche, DltA in der offenen Form zu kristallisieren, blieben bis dato ohne Erfolg. Anhand nativer Ionen-Mobilitäts-Massenspektrometrie sowie limitierter Proteolyse konnten innerhalb dieser Arbeit weitere Ergebnisse erzielt werden, die das 2008 beschriebene Modell zusätzlich stützen. Zudem konnte die Anwesenheit des AMP als wirkungsvolles Produktmimetikum zur Stabilisierung der Transfer-Konformation des DltA beschrieben werden. Die Verwendung der limitierten Proteolyse zur konformationellen Untersuchung der Interaktion zwischen A- und PCP-Domänen aus Komplexen der nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen wurde bereits beschrieben (Dieckmann et al., 1999; Zettler and Mootz, 2010).

Die Zusammenfassung der Ergebnisse der limitierten Proteolyse sowie der Ionenmobilitäts-Analysen belegen, dass in Anwesenheit des AMP DltA in der Lage ist, eine Konformation einzunehmen, die im Vergleich zu anderen Bedingungen der am stärksten kondensierten Form entspricht. Dies stützt sich zum einen auf die kürzeste Driftzeit innerhalb der Ionenmobilitätsmessung sowie auf die Abnahme der Protease-Zugänglichkeit des Lys402 in der kleinen Domäne des DltA. Dies stellt einen Gegensatz zu den von ZETTLER und MOOTZ beschriebenen Ergebnisse dar, in denen AMP keine Änderung der proteolytischen Spaltprodukte induzieren konnte. Diese Versuche wurden jedoch mit einem PCP-A-Domänen-Fusionsprotein und nicht mit der isolierten A-Domäne durchgeführt. Analog zu den bereits beschriebenen Ergebnissen der Tyrocidin-Synthase sowie der Gramacidin-Synthase ist die Anwesenheit unterschiedlicher Substrat- bzw. Produktanaloga nur durch verringerte Proteolysegeschwindigkeiten und nicht durch das Auftreten neuer Banden bei der SDS-PAGE charakterisiert. In Anwesenheit des ATP konnte eine Konformation erzeugt werden, die zum einen durch die größten Driftzeiten und zum anderen durch eine intermediäre Proteolysegeschwindigkeit gekennzeichnet ist. In Abwesenheit eines Nukleotides konnte mittels Ionenmobilitäts-Analysen eine Konformation mit intermediärer Driftzeit gefunden werden. Der entsprechende Peak ist zudem durch eine vergrößerte Breite gekennzeichnet und kann damit auch die Konformationen in Anwesenheit von AMP sowie

von ATP einschließen, womit der offenen Form eine gewisse Flexibilität zugeordnet werden kann. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen der limitierten Proteolyse. Hier konnte analog dazu die höchste Proteolysegeschwindigkeit identifiziert werden.

4.1.2. Vergleich der beschriebenen gelösten DltA-Kristallstruktur mit publizierten DltA Strukturen

Die Überlagerung der hier beschriebenen DltA-Struktur mit den bereits publizierten DltA-Strukturen sowie mit dessen aus dem produktiven und alternativen Komplex (Abbildung 4.1 (a)-(c)) belegt größere Abweichungen im Bereich zwischen His105 und Glu130. Die Unterschiede betreffen somit auch die potentielle DltC-Bindestelle A des alternativen Komplexes. Dabei kann festgestellt werden, dass die *loop*-Region (His105-Thr120) sowie die folgende α -Helix in den publizierten DltA-Strukturen von *Bacillus subtilis* (pdb-Code 3E7W und pdb-Code 3E7X (Yonus et al., 2008)) die gleiche Konformation aufweist. Im Unterschied dazu weisen die in dieser Arbeit beschriebenen DltA-Strukturen untereinander eine gleiche, von den publizierten DltA-Strukturen jedoch abweichende, Konformation innerhalb der beschriebenen Region auf. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass in der DltA-Struktur (pdb-Code 3E7W) die Aminosäuren in diesem Bereich nicht ausreichend durch Elektronendichte definiert sind. Für DltA (pdb-Code 3E7X) konnte durch eine Verfeinerung der DltA-Struktur (aus dieser Arbeit) gegen die experimentellen Daten von DltA (pdb-Code 3E7X) eine neue Elektronendichte generiert werden, die eine neue Position des entsprechenden *loops* erkennen lässt. Diese ähnelt der *loop*-Region von den in dieser Arbeit beschriebenen DltA-Strukturen.

Die Struktur des DltA von *Bacillus cereus* (pdb-Code 3DHF (Du et al., 2008)) weicht in diesem Bereich ebenfalls von den DltA-Strukturen von *Bacillus subtilis* ab, so dass für die Unterschiede in dieser Region auch eine strukturelle Flexibilität in Betracht gezogen werden kann. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit liegt die Sequenzidentität zwischen *Bacillus subtilis* und *Bacillus cereus* DltA nur bei 56% und ist in diesem Bereich sehr gering (Abbildung 4.1 (d)). Eine Überlagerung der großen Domänen von verschiedenen Strukturen von DltA lässt eine geringe Verschiebung der kleinen Domäne erkennen, was ebenfalls auf eine strukturelle Flexibilität zurückgeführt werden kann (Abbildung 4.1 (b)). Eine detaillierte Analyse des Konservierungsgrades der DltC-Bindestellen erfolgt in Kapitel 4.2.4.

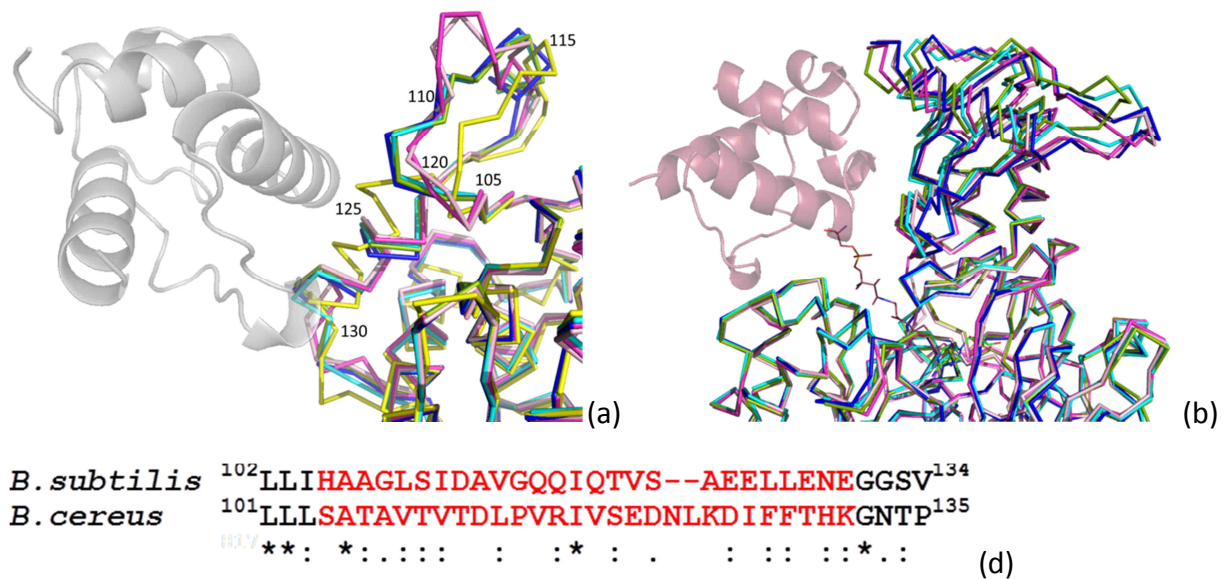


Abbildung 4.1 **Überlagerung und Sequenzvergleich verschiedener DltA Strukturen.** (a) **Überlagerung der großen Domänen von DltA.** Mit DltC in der Position A des alternativen Komplexes (grau). (b) **Überlagerung der großen Domänen von DltA.** Mit DltC aus dem produktiven Komplexes (rot). DltA von *Bacillus subtilis* aus dieser Arbeit (grün), DltA von *Bacillus subtilis* (pdb-Code 3E7W (rosa), pdb-Code 3E7X (pink) (Yonus et al., 2008)), DltA von *Bacillus cereus* (pdb-Code 3DHV (gelb) (Du et al., 2008)), DltA aus dem alternativen DltA-DltC-Komplex (blau), DltA aus dem produktivem DltA-DltC-Komplex (cyan). DltA ist in *ribbon*-Darstellung und DltC in *cartoon* Darstellung gezeigt. (d) **Sequenzvergleich der Region His105-Glu130 von DltA aus *Bacillus subtilis* und *Bacillus cereus*.** Die Überlagerung der Proteinsequenzen erfolgte mittels ClustalW (Larkin et al., 2007;Goujon et al., 2010).

Beim Vergleich der in dieser Arbeit beschriebenen DltA-Struktur mit der Struktur von DltA des Homologen *Bacillus cereus* (pdb-Code 3DHV)(Du et al., 2008), welches mit dem D-Ala-Adenylat kristallisiert werden konnte, ist ersichtlich, dass die kleine Domäne im Vergleich zur großen Domäne eine unterschiedliche Orientierung aufweist (Abbildung 4.1 und Abbildung 4.2). Die Konformation des DltA (pdb-Code 3DHV) wird als post-Adenylierungs-Konformation beschrieben und ähnelt der ATP-gebundenen Form des DltA aus *Bacillus cereus*, welche bereits von OSMAN et al. beschrieben wurde (Osman et al., 2009). In YONUS et al. wird vermutet, dass DltC mit DltA in der Transfer-Konformation interagiert (Yonus et al., 2008). Ausgehend von diesem Komplex kann demnach die Übertragung des aktivierten D-Ala von DltA auf den Cofaktor des DltC erfolgen. Eine Konformationsänderung, ausgehend von der Post-Adenylierungs-Konformation in die Transfer-Konformation in Anwesenheit des Adenylats, ist dafür erforderlich. Unterschiede in der Position und Ausrichtung der Aminosäuren der Substratbindetasche im Vergleich zwischen DltA von *Bacillus subtilis* (aus dieser Arbeit) und *Bacillus cereus* (pdb-Code 3DHV (Du et al., 2008)) sind in Abbildung 4.2 (b) dargestellt. Die Aminosäuren der großen Domäne Phe195, Glu270, Cys393 und Arg396 (Nomenklatur von *Bacillus subtilis*) weisen eine unterschiedliche Orientierung der Seitenketten auf, die für die Positionierung und Stabilisierung des Substrates sowie der Aminosäuren untereinander erforderlich sind. Größere Unterschiede ergeben sich in der Position der Aminosäuren aus der kleinen Domäne. Lediglich Lys492 von DltA von *Bacillus cereus* ragt in das aktive Zentrum und stabilisiert dabei sowohl den Carbonylsauerstoff des D-Ala, als auch das α -Phosphat des AMP im Adenylat. Im DltA von *Bacillus subtilis* übernimmt

Lys402 zusammen mit Gln400 und Arg407 die Stabilisierung des α -Phosphates. Eine Überlagerung des D-Ala-Adenylats auf die Substratbindetasche von DltA in der Transfer-Konformation kann dabei ohne sterische Einschränkungen erfolgen. Nach Bildung des Adenylats kann demnach eine Änderung von der (Post-) Adenylierungs- in die Transfer-Konformation erfolgen.

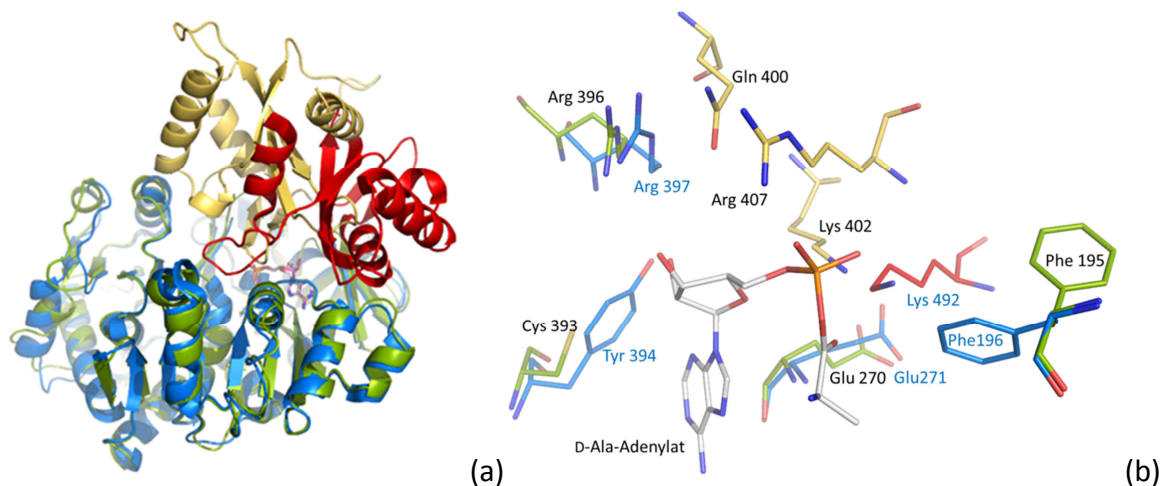


Abbildung 4.2 Röntgenkristallstrukturen von DltA von *Bacillus subtilis* und *Bacillus cereus*. (a) Überlagerung von DltA von *Bacillus subtilis* und *Bacillus cereus*. Die große und kleine Domäne von DltA von *Bacillus subtilis* (aus dieser Arbeit) sind grün und gelb und die von DltA von *Bacillus cereus* (pdb-Code 3DHV (Du et al., 2008)) blau und rot dargestellt. Die Proteine sind in *cartoon*-Darstellung abgebildet. Das AMP bzw. D-Ala-Adenylat ist in *stick*-Darstellung gezeigt. Die kleinen Domänen weisen eine unterschiedliche Orientierung in Bezug zur großen Domäne auf. (b) Aktives Zentrum. Aminosäuren des aktiven Zentrums, die im Vergleich der beiden Strukturen eine unterschiedliche Position oder Orientierung aufweisen sind in *stick*-Darstellung gezeigt. Das D-Ala-Adenylat ist dem DltA von *Bacillus cereus* (pdb-Code 3DHV) entnommen und grau koloriert. Die Aminosäuren von DltA von *Bacillus subtilis* sind schwarz und von *Bacillus cereus* blau markiert.

4.1.3. Ligandenbindung an DltA

Die Anwesenheit der Substrate (ATP, D-Ala), des Reaktionsintermediates (D-Ala-Adenylat) oder des Produktes (AMP) im aktiven Zentrum von DltA beeinflusst die Konformation des DltA und kann damit einhergehend auch einen Einfluss auf die Interaktion mit dem *carrier*-Protein DltC haben. Die ermittelten K_D -Werte für die Bindung von AMPCPP an DltA (552 μ M) bzw. von AMP an DltA (529 μ M) sind sehr ähnlich. Die zellulären Konzentrationen an ATP liegen zwischen 1-10 mM und sind 10 mal höher als die des AMP (Buckstein et al., 2008; Beis and Newsholme, 1975). Eine Bindung des ATP (AMPCPP) als Substrat und eine Dissoziation des AMP als Produkt kann demzufolge unter zellulären Bedingungen erfolgen. Die Affinität von DltA für D-Ala konnte nicht eindeutig bestimmt werden und der K_D liegt vermutlich in millimolaren Bereich. Interessanterweise hat die Anwesenheit von D-Ala keinen Einfluss auf die Affinität des DltA zum AMPCPP und umgekehrt, so dass für die Bindung der Substrate ATP und D-Ala eine zufällige, sequenzielle Bindung vermutet werden kann. Die bestimmten K'_S -Werte für ATP und D-Ala sind etwas niedriger als die mittels ITC bestimmten bzw. abgeschätzten K_D -Werte. Eine Ursache können unterschiedliche Bindungseigenschaften des ATP-Analogons im Vergleich zum ATP darstellen.

Aufgrund der hohen zellulären ATP-Konzentrationen kann vermutet werden, dass *in vivo* das Gleichgewicht zwischen der offenen und ATP-gebundenen Form des DltA in Richtung der komplexierten Form verschoben ist, sodass der Nukleotid-freien Form *in vivo* vermutlich keine Bedeutung zugeordnet werden kann.

4.1.4. Konformationelle Analyse des DltC

In der Literatur wurden bereits zahlreiche Strukturen von ACPs und PCPs allein oder im Komplex mit Interaktionspartnern anhand NMR- und Röntgenkristallstrukturanalyse beschrieben. 2006 wurden von KOGLIN und Mitarbeitern (Koglin et al., 2006) anhand $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -TROSY-HSQC-Spektren drei unterschiedliche Konformationen (A, A/H und H) des TycC3-PCP in Abhängigkeit des 4'-Phosphopantethein-Cofaktors beschrieben. Drei Röntgenkristallstrukturen von DltC von *Bacillus subtilis* wurden ebenfalls beschrieben, in denen DltC dabei die gleiche Konformation aufweist (Zimmermann, 2011). Diese, sowie weitere NMR- bzw. Röntgenkristallstrukturen von PCPs und ACPs gleichen der typischen *four-helix-bundle*-Struktur, die von KOGLIN als A/H-Konformation beschrieben wurde. Die Cofaktor-tragende Helix II weist dabei im Vergleich zwischen der A-, A/H- und H-Konformation eine deutlich unterschiedliche Orientierung auf und ermöglicht demnach Konformations-spezifische Interaktionen (Koglin et al., 2006).

Innerhalb dieser Arbeit wurden $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -TROSY-HSQC-Spektren von *holo*-DltC sowie der Variante *apo*-S36A aufgenommen. Dabei wurden Änderungen der chemischen Verschiebung zwischen den beiden Varianten beobachtet, die vorrangig die Bereiche um Helix II und III sowie die *loop*-Regionen III und IV betreffen. Der Anteil der Aminosäuren, die eine Differenz der chemischen Verschiebung $<0,0167$ ppm aufweisen, liegt bei 85%. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Unterschiede nicht auf konformationelle Änderungen zwischen der *holo*- und *apo*- Form, sondern vermutlich auf Interaktionen zwischen dem Cofaktor und den Aminosäuren aus den beschriebenen Regionen zurückzuführen sind. Vorstellbar sind dabei jedoch auch geringfügige Bewegungen der Helix II und III. Dies konnte bereits für das Actinorhodin ACP beschrieben werden (Evans et al., 2008). Die dort beobachteten Unterschiede im $^{15}\text{N},^1\text{H}$ -TROSY-HSQC-Spektrum zwischen der *holo*- und *apo*-Variante betragen im Durchschnitt 0,03 ppm. Sie sind mit denen von DltC vergleichbar und wurden als eine Bewegung der Helix III in Richtung Helix II sowie eine konformationelle Änderung des Leu43 (entspricht dem Phe37 in DltC) beschrieben. Es wurden dabei Interaktionen zwischen Leu43 mit den Methylgruppen des 4'-Phosphopantethein-Cofaktors identifiziert. Mit einem $\Delta\omega$ von 0,66 ppm weist Phe-37 den größten Unterschied in der Differenz der chemischen Verschiebung zwischen *holo*-DltC und *apo*-DltC S36A auf. Die Anwesenheit des Cofaktors in der Kristallstruktur des *holo*-DltC (pdb-Code 4BPH, (Zimmermann, 2011)) bewirkt eine Änderung der Konformation des Phe-37 im Vergleich zur Cofaktor-freien Variante *apo*-DltC S36A (pdb-Code 4BPF, (Zimmermann, 2011)). Phe37 ist Teil der Kontaktfläche, die zwischen DltC und der kleinen Domäne im produktiven DltA-DltC-Komplex ausgebildet wird. Neben Phe37 weisen die Aminosäuren Leu33, Gly38, Val40, Leu42, Leu43, Ile46, Glu47, Thr57, Asp60, Arg61 sowie Asp62 Unterschiede in der Differenz der chemischen Verschiebung auf, die größer als 0,0167 ppm

sind. Beim Vergleich der Röntgenkristallstrukturen können dabei jedoch keine großen konformationellen Änderungen beobachtet werden. Dabei wurde berücksichtigt, dass anhand der $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -TROSY-HSQC-Spektren nur Änderungen der chemischen Verschiebung der Peptidbindungen beobachtet werden können. Die durch den 4'-Phosphopantethein-Cofaktor verursachte Konformationsänderung des Phe37 kann demnach eine Ursache für die Änderungen in der Helix II und III darstellen. Unterschiede in der chemischen Verschiebung der Aminosäuren der Helix II und III zwischen *holo*- und *apo*-ACP konnten ebenfalls von Kim und Mitarbeitern beobachtet werden (Kim et al., 2006). Es wird die Ausbildung einer hydrophoben Tasche zwischen der Helix II und III beschrieben, die der wachsenden Acylkette einen hydrolytischen Schutz bietet. Demnach sind Interaktionen zwischen dem Cofaktor und den Aminosäuren innerhalb dieser hydrophoben Tasche für die Änderungen der chemischen Verschiebung verantwortlich. Die Ausbildung dieser hydrophoben Tasche kann auch bei DltC beobachtet werden, so dass Wechselwirkungen zwischen dem Cofaktor und Aminosäuren aus dieser Region ebenfalls Unterschiede in der chemischen Verschiebung bewirken können. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Koglin und Mitarbeitern konnte nur ein Satz an $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -Peaks beobachtet werden, so dass für *holo*- und *apo*-DltC jeweils nur eine Konformation angenommen werden kann. Dabei muss berücksichtigt werden, dass eine Verdopplung der Signale nur bei langsamen Austauschgeschwindigkeitskonstanten ($k_{ex} < \Delta\omega$) beobachtet werden kann. Die beschriebenen Ergebnisse sind ebenfalls im Einklang mit der von Volkman beschriebenen Struktur des DltC-Homologen Dcp, die ebenfalls durch eine geringe Dynamik gekennzeichnet ist (Volkman et al., 2001).

Es kann zudem festgestellt werden, dass die hier beschriebenen Unterschiede zwischen *holo*-DltC und der Variante *apo*-DltC S36A ebenfalls die Regionen betreffen, die anhand der NMR-Titrationsexperimente der Interaktion mit DltA zugeordnet werden können. Aminosäuren, die für die Interaktion mit DltA verantwortlich sind, könnten demnach auch Unterschiede in der Konformation zwischen der Cofaktor-haltigen und -freien DltC-Variante aufweisen. Die unterschiedlichen Affinitäten von *holo*- und *apo*-Actinorhodin-ACP bzw. TycC 3-PCP für die Interaktion mit Bindungspartnern wurden dabei auf die beobachteten konformationellen Unterschiede zwischen der *holo*- und der *apo*- Form zurückgeführt (Evans et al., 2008; Koglin et al., 2006).

Vergleiche zwischen der Kristallstruktur von dem freien ACP aus *Escherichia coli* mit einem ACP aus dem ACP-ACPS-Komplex (Parris et al., 2000) sowie mit der NMR-Struktur des ACP aus *Bacillus subtilis* (Xu et al., 2001) weisen auf eine Flexibilität innerhalb der *loop*-Regionen sowie im Bereich der Helix III hin. Große strukturelle Unterschiede zwischen den freien ACPs und den komplexierten ACPs können dabei jedoch nicht beschrieben werden. Dies gilt auch für DltC, da im Vergleich der Kristallstrukturen des freien DltC mit den DltC-Strukturen aus dem alternativen oder produktiven Komplex keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden können.

4.2. Kristallstrukturen belegen unterschiedliche DltC-Bindestellen im DltA-DltC-Komplex

In dieser Arbeit konnten neben der Kristallstruktur von DltA mit einer Auflösung von 1,6 Å zwei Strukturen des DltA-DltC-Komplexes mit einer Auflösung von 3,2 Å (Kristallform I) sowie 1,9 Å (Kristallform II) beschrieben werden. Die Struktur mit einer Auflösung von 3,2 Å stellt einen produktiven Komplex dar. DltC bindet in einer Spalte, gebildet von der kleinen und großen Domäne des DltA, in der Transfer-Konformation. Der 4'-Phosphopantethein-Cofaktor ist durch eine für diese limitierte Auflösung gut definierte Elektronendichte charakterisiert. Die freie Thiolgruppe ist direkt in das aktive Zentrum von DltA gerichtet und wird sowohl von Aminosäuren der kleinen und großen Domäne des DltA, als auch von DltC in seiner Position fixiert. Die Kontakte zwischen DltA und DltC sind vorrangig durch polare Wechselwirkungen zwischen dem DltC und der kleinen Domäne des DltA charakterisiert. Weitere Interaktionen mit der großen Domäne von DltA sind hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen geprägt.

Aufgrund der Kristallpackung können für die Struktur des Komplexes bei 1,9 Å zwei potentielle Bindestellen von DltC an DltA beobachtet werden. In der Position A bindet DltC ausschließlich an die Subdomäne A der großen Domäne des DltA, während in Position B nur Kontakte zur kleinen Domäne des DltA ausgebildet werden. Die Bindung ähnelt dabei nicht der in der Struktur bei 3,2 Å beschriebenen Interaktion. Die Funktion dieser alternativen Interaktion ist bis dato unbekannt und soll innerhalb dieser Arbeit näher beleuchtet werden. Vorstellbar wäre z.B. eine Bindung von DltC an der vom aktiven Zentrum abgewandten Seite des DltA, um dessen lokale Konzentration zu erhöhen und demnach eine effizientere Übertragung des D-Ala von DltA auf DltC zu ermöglichen. Interessanterweise kann keine Elektronendichte für den Cofaktor in dem alternativen DltA-DltC-Komplex beobachtet werden.

4.2.1. Vergleich der Struktur des produktiven DltA-DltC-Komplexes mit publizierten Strukturen

Im Vergleich der Struktur des produktiven DltA-DltC-Komplexes mit den Strukturen des EntE-EntB-Komplexes (pdb-Code 3RG2, (Sundlov et al., 2012)) und dem PA 1221, ein Protein unbekannter Funktion aus *Pseudomonas aeruginosa*, bestehend aus A-Domäne und PCP-Domäne (pdb-Code 4DG9, (Mitchell et al., 2012)), kann eine gleiche Konformation für DltA und die beiden A-Domänen sowie für DltC und die beiden PCPs festgestellt werden (Abbildung 4.3 (a)). Beide verwandte Strukturen wurden in Anwesenheit eines Vinylsulfonamid-AMP-Inhibitors kristallisiert, der eine kovalente Bindung zum 4'-Phosphopantethein ausbildet und ihn damit im aktiven Zentrum der A-Domäne fixiert. Ein ähnliches Prinzip wurde auch für die Kristallisation eines PCP im Komplex mit der TE-Domäne aus dem Terminationsmodul EntF des Enterobactin-Syntheseweges genutzt (Liu et al., 2011). Dabei wurde die Cofaktor-Variante α -Cl-Acetylamid-CoA verwendet, die eine kovalente Verknüpfung mit der katalytischen Triade im aktiven Zentrum der TE-Domäne bewirkt.

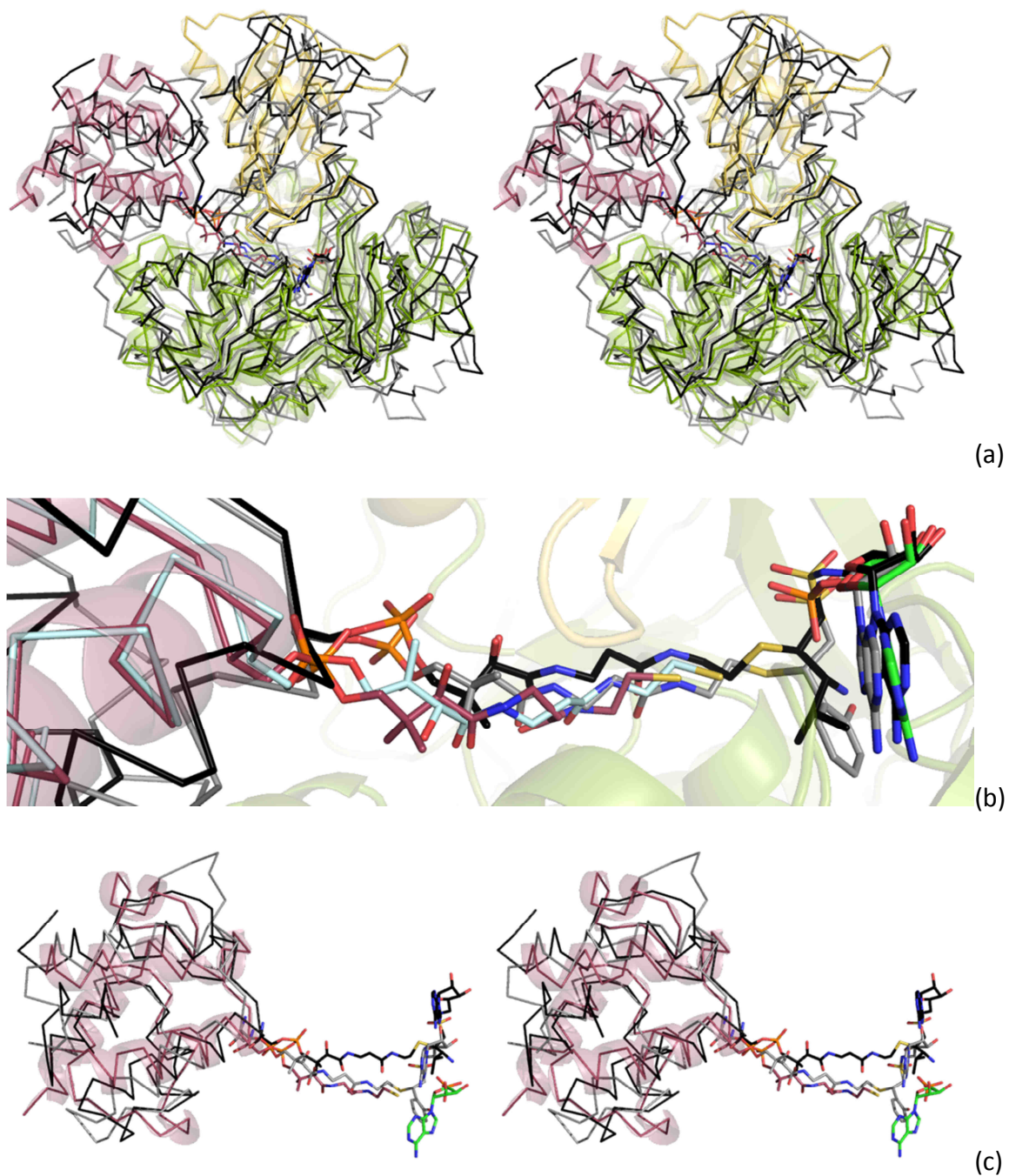


Abbildung 4.3 Vergleich der Struktur des produktiven DltA-DltC-Komplexes mit verwandten Proteinen. **(a) Überlagerung von DltA aus dem produktiven DltA-DltC-Komplex mit den A-Domänen aus dem A-PCP-Komplex von verwandten Proteinen (Stereo-Darstellung).** Die große Domäne des DltA aus dem produktiven DltA-DltC-Komplex wurde auf die A-Domänen von verwandten A-PCP-Komplexstrukturen überlagert. Mittels Pymol konnte eine *r.m.s.d.* von 2,837 Å für DltA-EntA und eine *r.m.s.d.* von 2,128 Å für DltA-PA1221-A-Domäne erhalten werden. **(b) Detailausschnitt von (a).** **(c) Überlagerung von DltC aus dem produktiven DltA-DltC-Komplex mit den PCP-Domänen aus dem A-PCP-Komplex von verwandten Proteinen (Stereo-Darstellung).** DltC aus dem produktiven DltA-DltC-Komplex wurde auf die PCP-Domänen von verwandten A-PCP-Komplexstrukturen überlagert (*cealign*, Pymol, *r.m.s.d.* von 3,470 Å für DltC-EntB und eine *r.m.s.d.* von 4,383 Å für DltC-PA1221-PCP-Domäne). Die große Domäne von DltA (Monomer A) ist grün, die kleine Domäne von DltA (Monomer A) gelb, DltC (Monomer A) ist rot, DltC Kette B ist cyan, EntE-EntB Kette A/B (pdb-Code 3RG2 (Sundlov et al., 2012)) ist grau und PA1221 (pdb-Code 4DG9 (Mitchell et al., 2012)) schwarz koloriert. AMP sowie die (modifizierten) 4'-Phosphopantethein-Cofaktoren sind in *stick* Darstellung gezeigt.

Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit eine unmodifizierte Struktur des DltA-DltC-Komplexes beschrieben werden. Durch die Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen dem Vinylsulfonamid-AMP-Inhibitor und dem 4'-Phosphopantethein ist die Cofaktor-tragende Helix II näher zum aktiven Zentrum gerichtet (Abbildung 4.3 (a) und (b)). Dabei nimmt das PCP eine unterschiedliche Orientierung zur A-Domäne ein, so dass die freie Thiolgruppe der 4'-Phosphopantethein-Cofaktors ca. 2-4 Å weiter in Richtung des aktiven Zentrums gerichtet ist (Abbildung 4.3 (a) und (b)). Es kann vermutet werden, dass nach Ausbildung des DltA-DltC-Komplexes eine Reorientierung des DltC erfolgt, um eine Übertragung des D-Ala zu ermöglichen. Weiterhin können unterschiedliche Abstände zwischen dem C α des Ser36 zum Schwefelatom des 4'-Phosphopantethein-Cofaktors festgestellt werden. Diese sind im DltA-DltC-Komplex (16,9 Å) und im PA1221 (17,1 Å) sehr ähnlich. Der Cofaktor aus dem EntE-EntB-Komplex hingegen ist mit einer Länge von 18,5 Å stärker gestreckt.

Trotz der fehlenden Sequenzhomologie innerhalb der beschriebenen Kontaktflächen ist die Art der Bindung gut konserviert. Es kommt dabei zur Ausbildung vornehmlich hydrophober Kontakte zwischen der großen Domäne der A-Domäne (bzw. DltA) und der Helix II des PCP (bzw. DltC). Wasserstoffbrückenbindungen werden zwischen der kleinen Domäne der A-Domänen (bzw. DltA) und der *loop*-I Region des PCP (bzw. DltC) ausgebildet (Kapitel 3.2.3.) (Sundlov et al., 2012; Mitchell et al., 2012)). Die ACPs sowie Dcp werden in der Literatur als saure Proteine beschrieben, die vorzugsweise an positiv geladene Bereiche der Interaktionspartner binden (Zhang et al., 2003; Nguyen et al., 2014; Roujeinikova et al., 2002; Masoudi et al., 2014; Volkman et al., 2001). Die PCPs hingegen weisen dabei eine eher neutrale Oberfläche auf. Es konnte jedoch kein allgemeines Bindemotiv für die Interaktion zwischen ACPs und A-Domänen bzw. zwischen PCPs und A-Domänen beschrieben werden. Häufig sind die Aminosäuren der Cofaktor-tragenden Helix II sowie der Helix III und des *loop* II an der Interaktion beteiligt. Analog zu den ACPs und dem Dcp ist DltC ebenfalls ein saures Protein und weist eine negativ geladene Proteinoberfläche auf. Im produktiven DltA-DltC-Komplex können analog zu den ACP-A-Domänen ebenfalls Interaktionen von basischen Aminosäuren des DltA sowie sauren Aminosäuren des DltC in der Kontaktfläche beobachtet werden (Kapitel 3.2.3.).

4.2.2. Vergleich der Struktur des alternativen DltA-DltC-Komplexes mit publizierten Strukturen

Mittels NMR-Titrationsexperimente kann die Bindung von DltC an DltA nach der Position A als die wahrscheinlichere Bindestelle im alternativen DltA-DltC-Komplex angenommen werden.

Die Struktur des alternativen DltA-DltC-Komplexes (Position A) wurde mit bereits veröffentlichten Strukturen anderer verwandter Protein-Komplexe verglichen (ACP-*holo*-ACP-Synthase (Parris et al., 2000), Stearoyl-ACP-ACP-Desaturase-Komplex (Guy et al., 2011), PCP-C-Komplex aus dem SrfA-C-*termination-module* (Tanovic et al., 2008), ACP und der Acyltransferase LpxD (Masoudi et al., 2014) und STAS-Domäne des SLC26 Anion-Transporters (Babu et al., 2010) (Abbildung 4.5).

Die Interaktion im alternativen Komplex ist dabei einmalig und wurde bis dato nicht für andere *carrier*-Protein-Komplexe beschrieben. Aufgrund der geringen Größe der *carrier*-Proteine von ca. 9 kDa und der Vielzahl an Interaktionen werden Konformationsänderungen der beteiligten Proteine werden vermutet, um die *carrier*-Proteine entlang der katalytischen Zentren zu dirigieren.

Unter Berücksichtigung der PCP-A, -C und -T-Kontakte konnte basierend auf der Struktur des SrfA-C ein mögliches Modell für konformationelle Reorientierungen aufgestellt werden. Spezifische Interaktionen zwischen der entsprechenden katalytischen Domäne mit dem PCP-Protein selbst sowie mit dem Substrat-beladenem 4'-Phosphopantethein-Cofaktor ermöglichen eine Intermediat-spezifische Interaktion mit den beteiligten aktiven Zentren und damit eine korrekte NRP-Synthese.

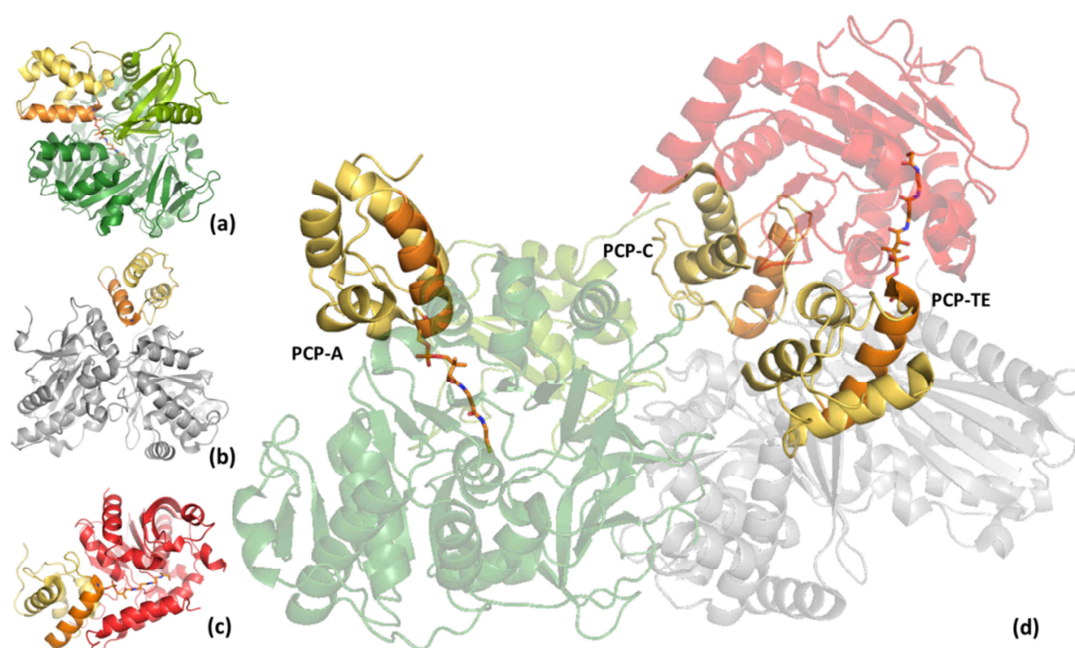


Abbildung 4.4 **PCP-Interaktionen innerhalb des NRPS-Komplexes.** (a) **PCP-A-Domänen Interaktion** aus dem EntB-EntE-Komplex (3RG2) (Sundlov et al., 2012). (b) **PCP-C-Domänen-Interaktion** aus dem SrfA-C-Komplex (2VSQ) (Tanovic et al., 2008). (c) **PCP-TE-Domänen-Interaktion** aus dem EntF-Komplex (3TEJ) (Liu et al., 2011). (d) **Modell für Domänen-Reorientierung innerhalb des SrfA-C-Moduls.** Die Domänen A, C, TE sowie das PCP-C entsammen aus dem SrfA-C (2VSQ), das PCP-A aus EntB-EntE und das PCP-TE aus EntF. Das PCP ist gelb, die PCP-Helix II orange, die C-Domäne grau, die TE-Domäne rot, die N-terminale A-Domäne dunkelgrün und die C-terminale A-Domäne ist hellgrün koloriert. Eine Domänen-Reorientierung ermöglicht eine Wanderung des PCPs entlang der beteiligten katalytischen Zentren. Spezifische Intermediat-abhängige Interaktionen zwischen dem PCP und den beteiligten Domänen ermöglichen eine korrekte NRP-Synthese.

Die Interaktionsflächen in den beschriebenen Komplex-Strukturen sind relativ klein und vielseitig (Abbildung 4.4 und Abbildung 4.5). Interessanterweise sind in allen Komplex-Strukturen die Helices II und III der *carrier*-Proteine an der Ausbildung der Kontaktfläche zum Interaktionspartner beteiligt. Die beteiligten Aminosäuren sind dabei jedoch nicht konserviert. Die Interaktion zum DltC wird durch Kontakte ausgehend von einer α -Helix und den angrenzenden *loop*-Regionen der Subdomäne A des DltA verwirklicht, während die Interaktionspartner in den verwandten Komplex-Strukturen einen anderen Faltungstyp als

die Subdomäne A des DltA aufweisen und demnach andere Strukturmodule zur Interaktion mit dem *carrier*-Protein beitragen.

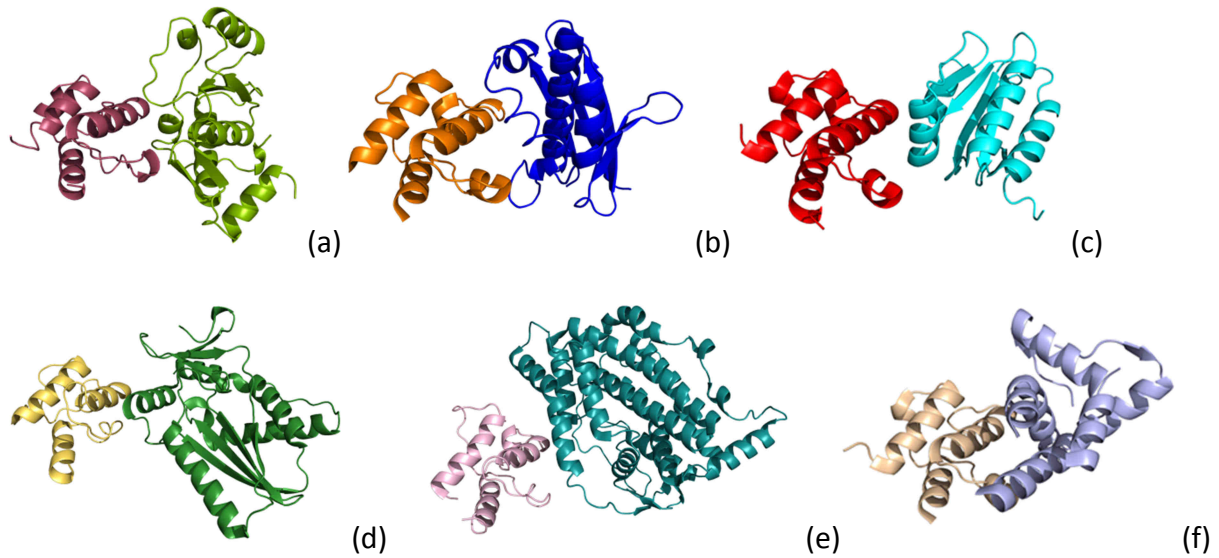


Abbildung 4.5 Vergleich von Komplex-Strukturen von *carrier*-Proteinen mit Interaktionspartnern. (a) Position A des alternativen DltA-DltC-Komplexes (diese Arbeit). (b) ACP-ACPS (pdb-Code 1F80, (Parris et al., 2000)). (c) ACP-STAS (pdb-Code 3NY7, (Babu et al., 2010)). (d) PCP-C-Domäne aus Srf A-C (pdb-Code 2V5Q (Tanovic et al., 2008)). (e) Stearoyl-ACP-ACP-Desaturase (pdb-Code 2XZ0, (Guy et al., 2011)). (f) ACP-LpxD (pdb-Codes 4IHF, 4IHG, (Masoudi et al., 2014)). Das *carrier*-Protein weist in allen Abbildungen die gleiche Orientierung auf.

Komplex	Modifikation des Serin	Größe der Kontaktfläche (Å ²) mit Cofaktor	Größe der Kontaktfläche (Å ²) ohne Cofaktor
DltA-DltC alternativ (A)	-	-	404
DltA-DltC produktive	4'Phosphopantethein	1093	763
ACP-ACPS	4'Phosphopantethein	751	618
ACP-STAS	4'Phosphopantethein	702	541
PCP-C (SrfA-C)	Ser→Ala	-	291
Stearoyl-ACP-ACP-Desaturase	Phosphoserin	-	524
ACP-LpxD	4'Phosphopantethein	1091	468

Tabelle 4.1 Größe der Kontaktflächen der Komplexe zwischen *carrier* und Interaktionspartner.

Obwohl DltC, ACPs und PCPs den gleichen Faltungstyp aufweisen, unterscheiden sie sich hinsichtlich ihrer Aminosäurezusammensetzung. Die ACPs sind saure Proteine und können an positiv geladene Regionen der Interaktionspartner binden, während z.B. die Interaktion zwischen dem PCP und der C-Domäne aus Srf A-C hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen beschrieben wird. Für die Interaktion im alternativen DltA-DltC-Komplex (Position A) können sowohl polare, als auch hydrophobe Kontakte gefunden werden (Kapitel 3.2.4.).

Die Größe der Interaktionsfläche im produktiven DltA-DltC-Komplex beträgt 1093 Å² und ist deutlich größer als die Interaktionsfläche der Position A des alternativen DltA-DltC-Komplexes (404 Å²). Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass der

4'-Phosphopantethein-Cofaktor mit ca. 330 Å² deutlich zur Kontaktfläche im produktiven Komplex beiträgt. Die Größe der Kontaktfläche in der Position A des alternativen DltA-DltC-Komplexes liegt dabei zwischen der Größe des PCP-C-Komplexes (SrfA-C) (291 Å²) und der des Stearoyl-ACP-ACP-Desaturase-Komplexes (524 Å²) (Tabelle 4.1). Dabei wurde im PCP-C-Komplex das entsprechende Serin zu einem Alanin mutiert, während Serin im Stearoyl-ACP-ACP-Desaturase-Komplex eine Phosphatmodifikation trägt. Im alternativen DltA-DltC-Komplex konnte dabei keine Modifikation von Serin₃₆ beobachtet werden. Die Funktion der Interaktionen zwischen *carrier*-Proteinen und deren Interaktionspartnern ist dabei die Katalyse der entsprechenden Reaktion, so dass die Ausbildung eines stabilen Komplexes nicht das Ziel dieser Interaktion darstellt. Kleine, vielseitige Kontaktflächen ohne konserviertes Bindemotiv zwischen *carrier*-Proteinen und deren Interaktionspartnern sind dafür die Voraussetzung. Die beobachtete Interaktion zwischen DltA und DltC im alternativen Komplex erscheint somit ebenfalls wahrscheinlich.

2007 konnte die Kristallstruktur der PCP-C-Bi-Domäne aus dem TycC5/6-Modul gelöst werden (Samel et al., 2007). Die Bindung des PCP erfolgt hierbei ebenfalls weit entfernt vom katalytischen Zentrum der C-Domäne. Ser₄₃ (Bindestelle des 4'-Phosphopantethein-Cofaktors) des PCPs und das katalytisch wichtige His₂₂₄ der C-Domäne sind mit 47 Å zu weit voneinander entfernt, um durch die Länge des Cofaktors (20 Å) überbrückt zu werden. Die Funktion dieser Interaktion konnte dabei nicht geklärt werden. Es wurde vermutet, dass die Domänenanordnung in der Interaktion des PCP mit einer A-oder einer *upstream*-liegenden C-Domäne eine Rolle spielen könnte. Es wurde jedoch auch die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass die PCP-C-Domänen Interaktion durch die Kristallpackung induziert wurde.

Es gibt keine eindeutigen Hinweise darauf, dass weitere Proteine an den DltA-DltC-Komplex binden und mit DltC an der alternativen Bindestelle interagieren können. Es muss daher auch berücksichtigt werden, dass die beobachtete alternative Bindung ebenfalls durch die Kristallpackung bedingt wurde.

4.2.3. Konservierungsgrad der Interaktion zwischen DltA und DltC

Beim Vergleich der DltA-Sequenzen zwischen *Bacillus subtilis* und anderen gram-positiven Bakterien kann festgestellt werden, dass die Regionen der Substratbindetasche zu 88% identisch und im Vergleich mit anderen *Bacillus*-Stämmen zu 94% identisch ist.

Für den Bereich der DltC-Bindung im produktiven Komplex (Abbildung 4.6 (b) und (d)) kann sowohl zwischen den verschiedenen gram-positiven Stämmen als auch innerhalb der Gattung *Bacillus* eine hohe Konservierung festgestellt werden, während im Bereich der Bindung von DltC an die Position A des alternativen Komplexes (Abbildung 4.6 (a) und (c)) keine Konservierung zu erkennen ist.

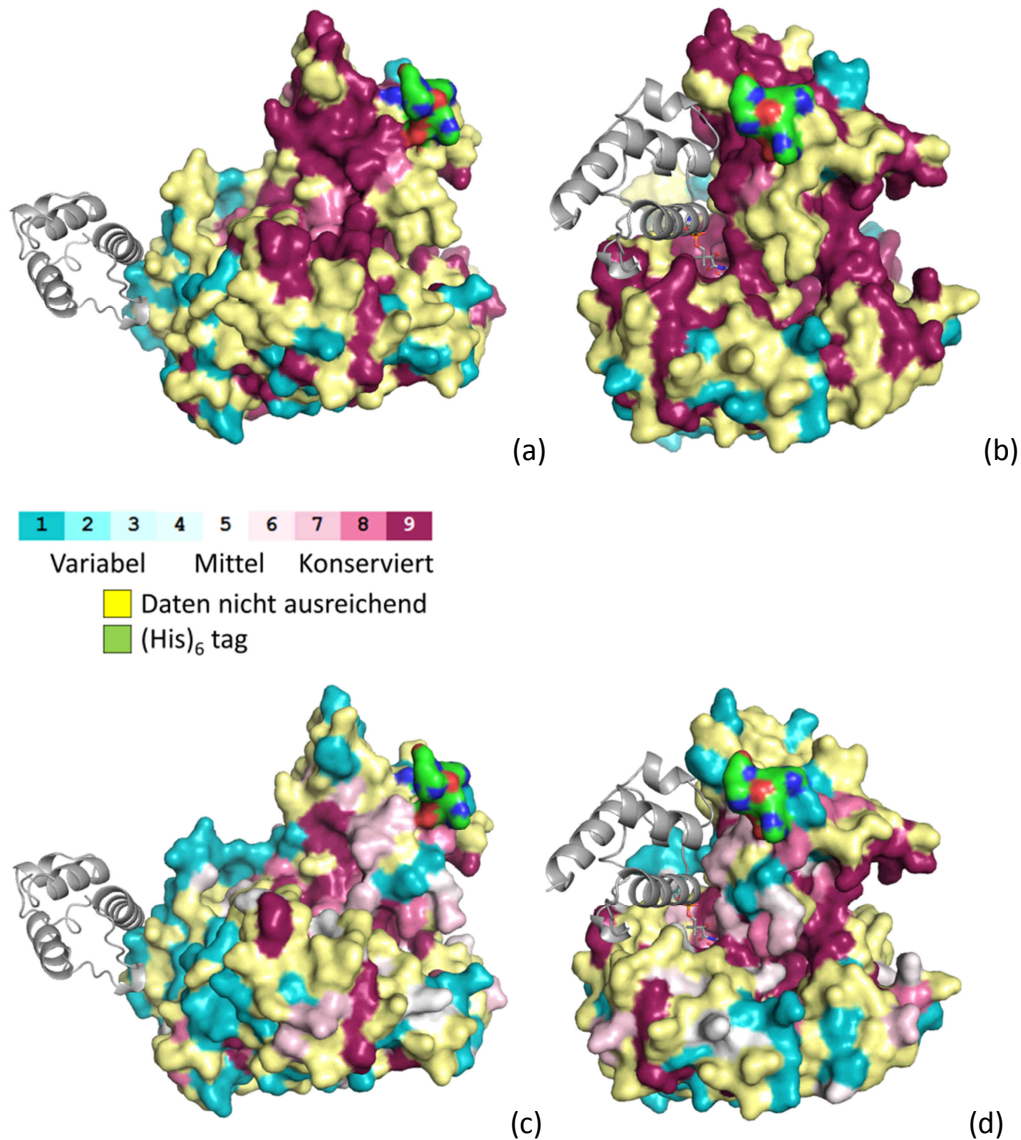


Abbildung 4.6 **Konservierung der DltC-Bindestellen.** (a)/(b) **Innerhalb der Spezies *Bacillus subtilis*.** Das Konservierungs-Modells wurde mittels ConSurf-Server unter Verwendung der Proteinsequenzen von *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus amyloliquefaciensis*, *Bacillus thuringiensis* erstellt. (c)/(d) **Innerhalb gram-positiver Bakterien.** Das Konservierungs-Modell wurde mittels ConSurf-Server unter Verwendung der Proteinsequenzen von *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus* erstellt. DltA (aus dieser Arbeit) ist entsprechend des Konservierungsgrades koloriert.

4.2.4. Existiert die alternative Bindung von DltC an DltA in Lösung?

Durch NMR-spektroskopische Titrations von DltA zu ¹⁵N-markiertem DltC konnte durch Analyse der Intensitätsabnahme der entsprechenden Peaks Aminosäuren von DltC identifiziert werden, die zur Interaktion mit DltA beitragen. Unabhängig davon, ob *holo*-DltC oder die Cofaktor-freie Variante S36A verwendet wurde, und ob die Experimente in An- oder Abwesenheit von AMP durchgeführt wurden, welches in DltA die Transfer-Konformation erzeugen kann, konnten nahezu die gleichen Aminosäuren von DltC identifiziert werden. Dabei stellt sich die Frage, ob in diesem Experiment unter allen Bedingungen die gleiche DltA-DltC-Interaktion beobachtet wurde oder ob zwei mögliche DltC-Bindestellen existieren. Sowohl im produktiven, als auch in der Position A des alternativen Komplexes geht der

Großteil der Kontakte von Helix II und III des DltC aus, was ebenso für andere *carrier*-Protein-Komplexe beschrieben werden konnte (Kapitel 4.2.2.). Der Vergleich der Ergebnisse zusätzlicher Experimente soll klären, ob eine Bindung von DltC nach der Position A des alternativen Komplexes in Lösung wahrscheinlich erscheint, oder ob dieser Komplex einen Kristallisationsartefakt darstellt.

Die IM-MS-Experimente weisen auf eine Flexibilität der offenen Konformation von DltA hin, so dass ohne Nukleotid ein Gleichgewicht zwischen der offenen, der Adenylierungs- sowie der Transfer-Konformation vorliegen könnte. Demzufolge könnte die Bindung von DltC an DltA in der offenen Konformation dazu führen, dass DltA ebenfalls die Transfer-Konformation einnimmt. Somit könnten bei den NMR-Titrationsexperimenten sowohl in An-, als auch in Abwesenheit von AMP das DltA innerhalb der produktiven DltA-DltC-Interaktion in der Transfer-Konformation vorgelegen haben. Aufgrund der hohen zellulären ATP-Konzentrationen kann der offenen Konformation von DltA *in vivo* vermutlich keine Bedeutung zugeordnet werden.

Dennoch muss berücksichtigt werden, dass die mittels NMR identifizierte Aminosäuren von DltC auch an einer Interaktion zu DltA nach Position A des alternativen Komplexes beteiligt sind. Dabei kann jedoch festgestellt werden, dass diese identifizierten Aminosäuren von DltC eine deutlich größere Kontaktfläche vermuten lassen würden. Vor allem Bereiche der *loop I*-Region von DltC, welche Kontakte zur kleinen Domäne von DltA im produktiven Komplex ausbilden, tragen nicht zur Interaktion gemäß der Position A des alternativen Komplexes bei. Es kann anhand dieser Experimente jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass beide Komplex-Varianten innerhalb der Titrationsexperimente vorlagen.

Die mögliche Bindung von DltC entsprechend der Position B des alternativen DltA-DltC-Komplexes würde an die kleine Domäne des DltA erfolgen. An dieser Interaktion sind Aminosäuren von DltA beteiligt, die auch im produktiven DltA-DltC-Komplex für die Bindung des DltC verantwortlich sind. Die Bindung von DltC an DltA nach Position B im alternativen Komplex kann anhand der NMR-Titration als unwahrscheinlich angesehen werden, da keine der identifizierten Aminosäuren von DltC in dieser Position Kontakte zu DltA ausbilden. Daraus ergibt sich die Annahme, dass in Lösung die Position A des alternativen Komplexes als die wahrscheinlichere Variante des alternativen Komplexes angenommen werden kann.

Mittels IM-MS konnte eine äquimolare Stöchiometrie der DltA-DltC Bindung beobachtet werden, was zusätzlich mittels ITC- und NMR-Titration bestätigt werden konnte. Eine simultane Bindung von zwei DltC-Molekülen nach dem alternativen und produktiven Komplex kann demzufolge ausgeschlossen werden. Bei Analyse der Strukturen des produktiven und der Position A des alternativen DltA-DltC-Komplexes können durch die unterschiedlichen Kontaktflächen auch unterschiedliche Oberflächen für den DltA-DltC-Komplex vorgefunden werden. Die berechneten CCS von 3564 \AA^2 für den produktiven Komplex und 3812 \AA^2 für die Position A des alternativen Komplexes weisen eine Differenz von ca. 6,5% auf und sollten demnach mittels Ionenmobilitätsanalysen unterschieden werden können. Da unter allen gewählten Bedingungen nur ein Peak beobachtet werden konnte, kann vermutet werden, dass nur eine Variante des DltA-DltC-Komplexes vorhanden war. Zur Unterdrückung von artifiziellen Oligomeren wurden bei der nativen

Massenspektrometrie nur sehr geringe Konzentrationen der Proteine eingesetzt. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass niedrigaffine Bindungen dabei nicht detektiert werden konnten.

In ITC-Titrationsexperimenten konnte die höchste Affinität für die Interaktion zwischen *holo*-DltC und DltA in Anwesenheit des AMP beobachtet werden. In Abwesenheit des Cofaktors oder AMP sowie in Anwesenheit von AMPCPP können deutlich geringere Affinitäten beobachtet werden. Können diese niedrigen Affinitäten auf die Bindung von DltC an die Position A des alternativen Komplexes zurückgeführt werden? Um diese These zu prüfen, wurden Varianten von DltA (DltA RR/DltA RW) generiert, die eine Mutation innerhalb der möglichen DltC-Bindestelle der Position A des alternativen Komplexes aufweisen. Die Bindungseigenschaften dieser Varianten wurden mittels ITC mit DltA wt verglichen. Bei Verwendung der Varianten DltA RW bzw. RR bei den ITC-Titrationsexperimenten konnten in Anwesenheit von AMPCPP nahezu die gleichen thermodynamischen Parameter wie unter Verwendung von DltA wt erhalten werden. Eine Bindung von DltC in Anwesenheit von AMPCPP nach der Position A des alternativen Komplexes ist demnach unwahrscheinlich. Sowohl im produktiven, als auch im alternativen Komplex liegt DltA in der Transfer-Konformation vor. Dabei kann im alternativen Komplex keine Elektronendichte für den 4'-Phosphopantethein-Cofaktor des DltC beobachtet werden. Daher wurden die ITC-Titrationsexperimente in Anwesenheit von AMP ebenfalls unter Verwendung von *apo*-DltC S36A und DltA RW durchgeführt. Die Bindungseigenschaften sind vergleichbar zu der Titration unter Verwendung von DltA wt und machen daher nur den Beitrag des Cofaktors zur Bindung erneut deutlich.

Da die Bindung von DltC an die große Domäne des DltA im alternativen Komplex unabhängig von der kleinen Domäne erfolgt, wurde in ITC-Experimenten ebenfalls die Bindung von *holo*-DltC und *apo*-DltC S36A an die isolierte große Domäne des DltA analysiert. Durch die Abwesenheit der kleinen Domäne kann eine drastische Abnahme der Affinität von DltC für DltA beobachtet werden. In Anwesenheit des Cofaktors ist noch eine äußerst schwache Bindung zu vermuten, während in Abwesenheit des Cofaktors keine Interaktion mehr zu erkennen ist. Im produktiven Komplex werden Kontakte ausgehend von dem DltC-Cofaktor hauptsächlich zur großen Domäne des DltA ausgebildet, so dass in Abwesenheit der kleinen Domäne vermutlich noch eine schwache Interaktion möglich ist, während in Abwesenheit des Cofaktors diese nicht mehr ausgebildet werden kann.

Die Bindung von DltC an die Position B im alternativen DltA-DltC-Komplex konnte anhand der NMR-Titrationsexperimente ausgeschlossen werden. Dennoch wurden ebenfalls ITC-Experimente mit DltA wt und der Varianten *holo*-DltC A3 bzw. *apo*-DltC S36A A3 durchgeführt. In DltC A3 sind die Aminosäuren mutiert, die an der Bindung von DltC an DltA gemäß der Position B im alternativen Komplex beteiligt sind. Im Vergleich mit DltC wt konnten ebenfalls keine Unterschiede beobachtet werden, so dass die Bindestelle der Position B weiterhin als unwahrscheinlich angesehen werden kann.

Zudem war es nicht möglich, die Bindung von DltC an die die Subdomäne A des DltA durch Ausbildung einer Disulfidbrücke zu stabilisieren. Schlussfolgernd kann daher festgestellt werden, dass eine Bindung von DltC nach der Position A oder B im alternativen DltA-DltC-

Komplex anhand der durchgeführten Experimente in Lösung nicht bestätigt werden konnte. Ob dieser Komplex eine Funktion innerhalb der DltA-katalysierten D-Alanylierung von DltC einnehmen kann soll in Kapitel 4.3. diskutiert werden.

4.2.5. Kann DltC an DltA in verschiedenen Konformationen binden?

Innerhalb der ITC-Experimente konnten unterschiedliche Affinitäten für die Bindung von DltC an DltA in Anwesenheit von AMP, AMPCPP oder in Abwesenheit eines Liganden beobachtet werden. Dies kann nicht auf die Ausbildung der alternativen Bindung von DltC an DltA zurückgeführt werden. Alle beobachteten Interaktionen sind entropisch getrieben, was häufig der Ausbildung hydrophober Kontakte in Protein-Protein-Interaktionen zugrunde liegt. Ist es möglich, dass DltC und DltA unter allen gewählten Bedingungen die gleiche Kontaktfläche ausbilden und dass die unterschiedlichen Affinitäten auf konformationelle Änderungen von DltA während der Interaktion mit DltC zurückgeführt werden können?

Beim Vergleich der freien Bindungsenthalpie der Titration von *holo*-DltC oder *apo*-DltC S36A zu DltA in An- und Abwesenheit des AMP können unterschiedliche freie Bindungsenthalpien (und damit unterschiedliche Affinitäten) beobachtet werden. Beim Vergleich der Differenzen von ΔG bei der Bindung von DltC an DltA in der offenen und Transfer-Konformation ergeben sich für *holo*-DltC und *apo*-DltC S36A nahezu die gleichen Differenzen ($\Delta\Delta G = 2019 \text{ cal mol}^{-1}$ für *holo*- und $\Delta\Delta G = 1880 \text{ cal mol}^{-1}$ für *apo*-DltC). Der beobachtete Unterschied könnte demnach einen für den Übergang der offenen zur Transfer-Konformation des DltA nötigen energetischen Aufwand darstellen, da die Konformationen durch unterschiedliche Muster an Wasserstoffbrückenbindungen charakterisiert sind. Die für die Konformationsänderung aufgebrauchte Energie ist Teil der beobachteten Bindungsenergie. Eine durch die Konformationsänderung stattfindende Verringerung der beobachteten Bindungsenthalpie spiegelt sich somit in einer Abnahme der Affinität wider. Aus diesem Grund kann für die Interaktion von DltC mit der offenen Konformation ein deutlich höherer K_D -Wert erzielt werden (Abbildung 4.7). Es kann vermutet werden, dass die Energie der Anhydrid-Spaltung während der DltA-katalysierten Reaktion genutzt wird, um die Energie zur Konformationsänderung bereitzustellen.

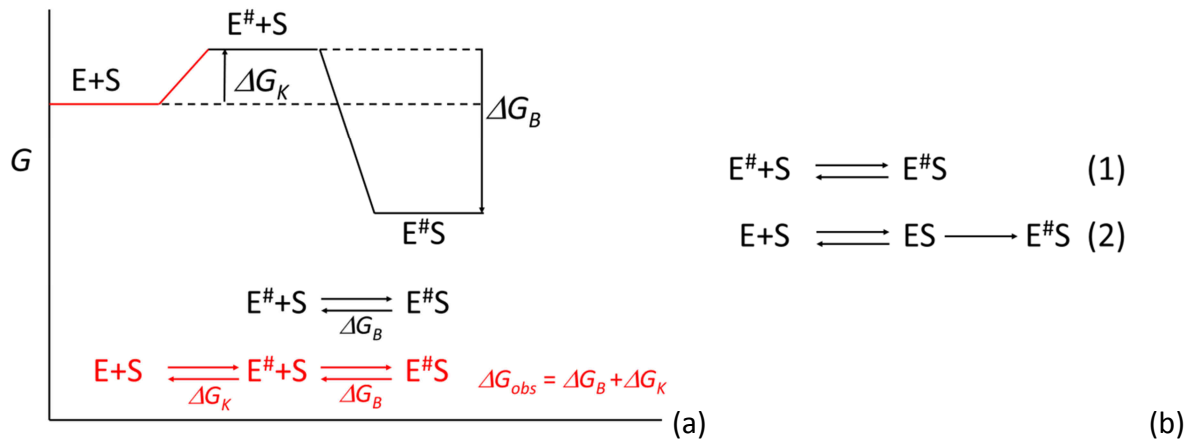


Abbildung 4.7 **Konformationelle Änderungen von DltA und verwandten Proteinen. (a) Schema der freien Enthalpien für die Interaktion von DltA und DltC.** Die Interaktion in Anwesenheit von AMP ist schwarz und in Abwesenheit von AMPCPP rot gekennzeichnet. E = Enzym (DltA) in der offenen bzw. Adenylierungs-Konformation, $E^{\#}$ = Enzym (DltA) in der Transfer-Konformation, S = Substrat (DltC), $E^{\#}S$ = DltA-DltC-Komplex mit DltA in der Transfer-Konformation. **(b) Modell für die Interaktion von PheA mit Phe.** In Anwesenheit von AMP oder AMPCPP (1) oder in Anwesenheit von ATP (2). $E^{\#}$ = Enzym (PheA) mit gebundenem AMP oder AMPCPP, E = Enzym (PheA) mit gebundenem ATP, S = Phe (Substrat).

Wurden Titrationsexperimente von DltC zu DltA in Anwesenheit des nichthydrolysierbaren ATP-Analogons AMPCPP durchgeführt, konnte eine Bindung beobachtet werden, die der Affinität der offenen Form ähnelt. Analog zur Bindung von *holo*-DltC an DltA in der offenen bzw. Transfer-Konformation ist diese Bindung ebenfalls eine entropisch getriebene Interaktion, die durch positive ΔS - und ebenfalls positive ΔH -Beiträge gekennzeichnet ist. Ein Übergang der Adenylierungs-Konformation in die Transfer-Konformation ohne Abspaltung des Pyrophosphates konnte für DltA aus *Bacillus subtilis* bis dato nicht beobachtet werden, wird jedoch für den Reaktionsmechanismus des DltA aus *Bacillus cereus* vermutet (Du and Luo, 2014). Im DltA kann die Bindung des ATP ohne vorherige Konformationsänderung der Aminosäuren in der Substratbindetasche aus sterischen Gründen nicht erfolgen, da die Nukleotidbindetasche in der Transfer-Konformation durch Ausbildung einer Salzbrücke zwischen Arg407 und Glu297 blockiert wird (Abbildung 4.8 (a)). Für das DltA-verwandte Protein LC-FACS (*Long chain fatty acyl-CoA synthetase*) aus *Saccharomyces cerevisiae* konnte eine Kristallstruktur in der Transfer-Konformation in Anwesenheit des nichthydrolysierbaren ATP-Analogons AMPNPP beobachtet werden (Hisanaga et al., 2004). Die Bindung des AMPNPP im aktiven Zentrum erfolgt hierbei abweichend von der ATP-Bindung anderer verwandter Proteine. Innerhalb der LC-FACS liegt ein Tryptophan anstelle des Arg407 vor, so dass durch die fehlende Salzbrücke kein Ausschluss des β - und γ -Phosphats des ATP erfolgt. Eine Überlagerung des LC-FACS mit DltA (*R.m.s.d.* 3,149 Å) zeigt jedoch auf, dass Arg407 dennoch nicht mit dem β - und γ -Phosphat des Nukleotides kollidieren würde (Abbildung 4.8 (b)). Von STEVENS et al. 2006 wurde für PheA eine schwächere Bindung des ATP-Analogon AMPCPP im Vergleich mit ATP beschrieben, was auf unterschiedliche Bindungslängen- und Winkel der P-C-P im Vergleich zur P-O-P Bindung zurückgeführt wurde. Interessanterweise wurden dabei unterschiedliche Bindungsmodi der Aminosäure Phe an das Enzym PheA in Anwesenheit von ATP, AMPCPP oder AMP beobachtet. Unter Verwendung von ATP wurde

ein zweistufiges Bindungsereignis erhalten, was auf einen *induced fit*-Mechanismus für die Bindung der Substrate Phe und ATP zurückgeführt wurde. In Anwesenheit von AMP oder AMPCPP hingegen wurden Ergebnisse erzielt, die auf ein einstufiges Bindungsereignis hindeuten, was auf die Interaktion mit der Produkt-freisetzenden Form hindeutet (Abbildung 4.7 (b)). Des Weiteren wurde unter Verwendung von AMP und AMPCPP ähnliche Assoziations- und Dissoziationsraten für die Bindung des Substrates PheA erzielt, so dass in Anwesenheit von AMP oder AMPCPP eine ähnliche Konformation vermutet wurde (Stevens et al., 2006). Im Vergleich der publizierten mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen ergibt sich die Möglichkeit, dass durch die Bindung des AMPCPP DltA ebenfalls die Transfer-Konformation einnehmen könnte.

Jedoch muss zudem berücksichtigt werden, dass aufgrund der niedrigen Affinität von AMPCPP zu DltA unter den gewählten Bedingungen nur 75% des DltA im Komplex mit dem ATP-Analogen vorlagen. Es muss daher in Betracht gezogen werden, dass ein signifikanter Anteil des DltA während der Titrationsexperimente in der offenen, Nukleotid-freien Form vorlag und die Interaktion zwischen DltC und DltA ausgehend von der offenen Konformation des DltA erfolgen könnte.

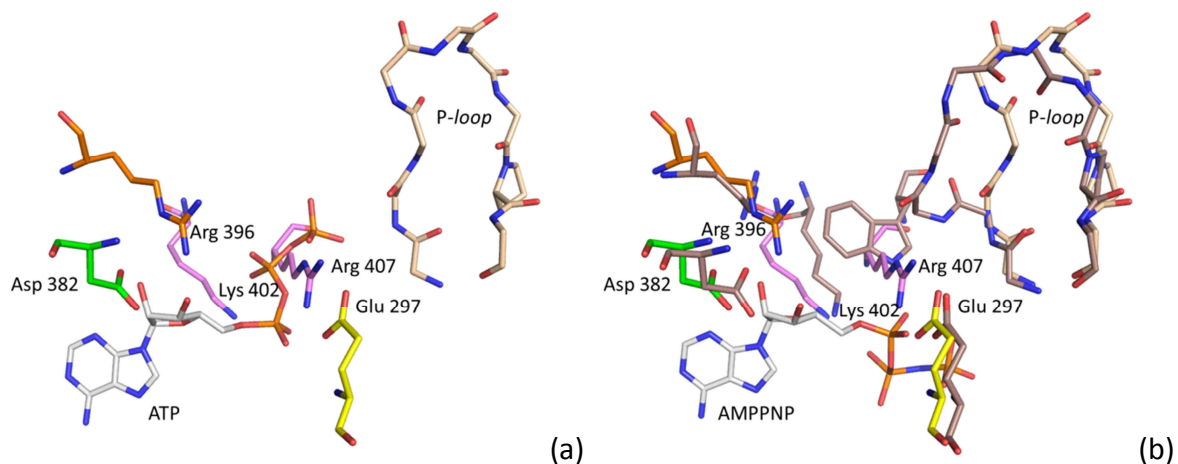


Abbildung 4.8 **Modelle der ATP-(Analogon)-Bindung von DltA in der Transfer-Konformation. (a) DltA von *Bacillus subtilis* in der Transfer-Konformation mit ATP.** ATP von DltA aus *Bacillus cereus* in der Adenylierungs-Konformation. Die Salzbrücke zwischen Glu297 und Arg407 führt zum sterischen Ausschluss des β - und γ -Phosphates des ATP in der Transfer-Konformation (DltA von *Bacillus subtilis* aus dieser Arbeit, ATP aus DltA von *Bacillus cereus*, pdb-Code 3FCC (Osman et al., 2009)). **(b) DltA von *Bacillus subtilis* in der Transfer-Konformation mit AMPCPP.** AMPCPP aus LC-FACS in der Transfer-ähnlichen-Konformation. Die Bindung des ATP-Analogen AMPCPP erfolgt abweichend von der ATP-Bindung. Die Farbgebung von DltA ist analog zu Abbildung 1.4. LC-FACS (pdb-Code 1V25 (Hisanaga et al., 2004)) ist lachsfarben koloriert.

Für weitere Analysen, ob die Unterschiede in den beobachteten Affinitäten auf konformationelle Änderungen des DltA zurückgeführt werden können, wurde die Änderung der spezifischen Wärmekapazität bei der Interaktion von DltC mit DltA analysiert. Für Komplex-Bildungsreaktionen ist die erhaltene Änderung der molaren Wärmekapazität stets negativ, da der gebildete Komplex eine geringere molare Wärmekapazität aufweist als die nicht-gebundenen Interaktionspartner. Die Abnahme resultiert aus einer Änderung der Oberflächen-Hydratisierung zwischen den einzelnen Komponenten und dem Komplex und ist damit direkt linear zur Änderung der polaren und apolaren Lösungsmittel-zugänglichen

Oberfläche. Die Änderung der Wärmekapazität kann somit als eine spezifische Größe für die Charakterisierung der DltA-DltC-Kontaktfläche herangezogen werden (Spolar et al., 1992; Sturtevant, 1977; Xie and Freire, 1994; Gomez et al., 1995). Für die Interaktion von *holo*-DltC mit DltA in Anwesenheit von AMP kann ein ΔC_p von $-787,7 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ und für *holo*-DltC mit DltA in Anwesenheit von AMPCPP kann ein ähnlicher ΔC_p von $-700,2 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ erhalten werden. Konformationsänderungen von DltA können ebenfalls einen Beitrag zum beobachteten ΔC_p liefern, da eine Änderung der Konformation ebenfalls eine Änderung der Lösungsmittel-zugänglichen Oberflächen nach sich zieht. Die geringen Unterschiede der molaren Wärmekapazität geben jedoch einen Hinweis auf eine gleiche Kontaktfläche zwischen DltC und DltA in Anwesenheit von AMP und AMPCPP. Für die Kontaktfläche zwischen DltC und DltA im produktiven Komplex kann mittels PISA-Server eine Größe von 1093 \AA^2 und im alternativen Komplex in der Position A mit 404 \AA^2 berechnet werden. Anhand des ΔC_p können Größen der Kontaktflächen mit 1623 \AA^2 in Anwesenheit von AMP und mit 1593 \AA^2 in Anwesenheit von AMPCPP berechnet werden. Dabei erscheint die Bindung von DltC an DltA nach dem produktiven Komplex unter beiden Bedingungen als wahrscheinlicher. Die empirisch ermittelte Formel zur Berechnung der Interaktionsfläche basiert auf der Lösungsmittelzugänglichkeit von verschiedenen Atomtypen. Die ermittelten Kontaktflächen unterliegen experimentellen Abweichungen und stellen demzufolge nur Näherungen dar. Die Unterschiede zwischen den berechneten und experimentell ermittelten Kontaktflächen kann zudem auf zusätzliche enthalpische Beiträge zur apparenten Bindungsenthalpie (Konformationsänderungen), oder auf den Einschluss von Wassermolekülen in der Kontaktfläche zurückgeführt werden.

Häufig sind an Komplexbildungen auch Protonierungsreaktionen beteiligt. Sowohl in Anwesenheit von AMP, als auch von AMPCPP kann eine Protonenübertragung vom Puffer auf den DltA-DltC-Komplex beobachtet werden. Als potentielle Kandidaten für die Aufnahme eines Protons können Histidine in Betracht gezogen werden. Der pK_s-Wert für die Imidazol-Seitenkette liegt mit 6,04 im neutralen Bereich. Durch Änderung der chemischen Umgebung kann dieser jedoch erhöht oder erniedrigt werden, wodurch eine Protonenaufnahme als auch -abgabe im neutralen Bereich ermöglicht werden kann. In der Kontaktfläche zwischen DltA und DltC im produktiven Komplex ist das His404 des DltA an der Bindung von DltC und dessen Cofaktor beteiligt. Die Bindung von DltC könnte sich in einer Erhöhung des pK_s des Histidins widerspiegeln, wodurch eine Protonenaufnahme während der Interaktion an dieser Position möglich erscheint. Da sowohl bei der Interaktion von DltC an DltA in Anwesenheit von AMP, als auch von AMPCPP eine Protonierung beobachtet werden kann, ist dies ebenfalls ein Hinweis dafür, dass unter beiden Bedingungen die gleiche Kontaktfläche ausgebildet wird.

Für die ITC-Titrationsexperimente in Anwesenheit von AMP kann ohne Cofaktor ein 3,5-fach höherer K_D -Wert und in Abwesenheit eines Nukleotides ein 2,7-fach höherer K_D -Wert erhalten werden, da sowohl für die Interaktion mit der Transfer-, als auch mit der offenen Konformation die Anwesenheit des Cofaktors im DltC die Affinität zu DltA erhöht. An der Bindung des Cofaktors sind Aminosäuren der kleinen und der großen Domäne des DltA beteiligt.

4.3. Reaktionsmodell der DltA-katalysierten D-Alanylierung des DltC

Für die Analyse der Reaktion, die durch DltA und verwandte Proteine katalysiert wird, wurden in der Literatur verschiedene Assays beschrieben (Tabelle 4.2). Die daraus resultierenden kinetischen und thermodynamischen Parameter weisen jedoch teilweise große Unterschiede auf.

Proteine	Assay	K_M bzw. $K_{S/A}$ (μM)	k_{cat} (min^{-1})	Referenz
B.s. DltA+DltC	AMP-Freisetzung	530,9±116,5(D-Ala)	192	diese Arbeit
B.s. DltA+DltC	AMP-Freisetzung	192,3±22,0 (ATP)	378	diese Arbeit
B.s. DltA	AMP-Freisetzung	8,2±1,3 (holo DltC)	84	diese Arbeit
B.s. DltA	AMP-Freisetzung	95,5±26,0 (ATP)	6	diese Arbeit
B.s. DltA	ATP/PPi Austausch	13,6±4,1 (D-Ala)	-	(May et al., 2005)
B.s. DltA	ATP/PPi Austausch	8,04±1,73 (holo DltC)	48949	(May et al., 2005)
B.c. DltA	Phosphat-Nachweis	1100 (D-Ala)	1,5	(Du et al., 2008)
B.c. DltA+CoA	Phosphat-Nachweis	30 (D-Ala)	10,9	(Du and Luo, 2014)
B.c. DltA+CoA	Phosphat-Nachweis	10 (ATP)	12,9	(Osman et al., 2009)
PheA-(<i>apo</i>)PCP-E	ATP/PPi Austausch	70 (L-Phe)	690	(Luo et al., 2001)
PheA-(<i>apo</i>)PCP-E	kontinuierlich	30 (L-Phe)	0,06	(Luo et al., 2001)
PheA-(<i>holo</i>)PCP-E	kontinuierlich	30 (L-Phe)	0,07	(Luo et al., 2001)
PheA	kontinuierlich	0,6 (L-Phe)	0,08	(Stevens et al., 2006)
Acetyl-CoA-Synthase	kontinuierlich	6047 (Acetat)	16608	(Reger et al., 2007)
4-Chlorbenzoat: CoA-Ligase	kontinuierlich	308 (ATP)	2400	(Chang et al., 1997)

Tabelle 4.2 **Zusammenfassung der kinetischen Parameter der Reaktionen, katalysiert durch DltA und verwandte Proteine.** Die ATP/PPi Austausch-Reaktion basiert auf der Reversibilität der Adenylatbildung und erfasst nur die erste Halbreaktion. In der kontinuierlichen Methode wurde unter Verwendung eines gekoppelten photometrischen Assays die Pyrophosphat-Freisetzung kontinuierlich gemessen. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sind hervorgehoben. Im Phosphatnachweis wurde die Phosphatkonzentration mittels Malachtgrün bestimmt. *B.s.* = *Bacillus subtilis*, *B.c.* = *Bacillus cereus*.

Die in dieser Arbeit erzielten thermodynamischen sowie kinetischen Parameter ergeben ebenfalls teilweise starke Unterschiede zu den bereits veröffentlichten Ergebnissen der DltA- (*Bacillus subtilis*) katalysierten Reaktion.

Für die DltA-katalysierte Reaktion in Abhängigkeit der DltC-Konzentration konnte in dieser Arbeit ein K'_A von 8,2 μM erhalten werden. Dieser stimmt mit dem von MAY et al. beschriebenen K_M von 8,04 μM sehr gut überein (May et al., 2005). Im Gegensatz dazu können gravierende Unterschiede der k_{cat} -Werte festgestellt werden. Während in dieser Arbeit eine Wechselzahl von 84 min^{-1} beobachtet werden konnte, wurde von MAY et al. ein k_{cat} von 48949 min^{-1} beschrieben. Dieser liegt in der Größenordnung der für Acetyl-CoA-Synthetase ermittelten Geschwindigkeiten von 16608 min^{-1} . Aufgrund der niedrigen Affinität für das Substrat Acetat ($K_M = 6047 \mu\text{M}$) ergibt sich dabei jedoch nur eine katalytische Effizienz von $4,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Reger et al., 2007). Mit 2400 min^{-1} konnten hohe Geschwindigkeiten ebenfalls für die 4-Chlorbenzoat: Coenzym A Ligase beschrieben werden (Chang et al., 1997). Dennoch stellt die beschriebene katalytische Effizienz von $8,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ kein Vergleich mit der von MAY beschriebene Effizienz von $1,01 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ dar, die demnach durch eine Diffusionslimitierung beschrieben ist (May et al., 2005).

Zudem wurde eine Substratinhibierung bei DltC-Konzentrationen größer 15 μM beschrieben, welche in dieser Arbeit jedoch nicht beobachtet werden konnte. Bei DltC Konzentrationen größer 70 μM konnte eine Abnahme der Maximalgeschwindigkeit beobachtet werden, die vermutlich auf die Produktion von ADP zurückzuführen ist. Dieses Phänomen wurde bereits beschrieben und auf eine Reaktion des gebildeten Adenylats mit ATP unter Bildung von 2 ADP zurückgeführt (Luo and Walsh, 2001). Zudem konnte für die ACV-Synthase bei hohen ATP-Konzentrationen und geringen AMP-Akzeptor Substrat-Konzentrationen die Bildung von AMP-P-P-AMP (Ap_4A) beobachtet werden, was ebenfalls auf die Bindung eines zweiten ATP-Moleküls zurückgeführt werden kann (Kallow et al., 2002). Dieses bindet dabei mit einer geringen Affinität, wobei das γ -Phosphat die ursprüngliche Position des β -Phosphates aus dem ersten ATP-Molekül einnimmt (Kallow et al., 2002). Für die DltA-verbundene Leuchtkefer-Luziferase sind zudem zwei kinetisch unterscheidbare ATP-Bindestellen an der Synthese des Oxyluziferins beteiligt (Deluca and McElroy, 1984). Für DltA liegen bis dato keine Hinweise auf eine zweite ATP-Bindestelle vor. Unter Berücksichtigung der erzielten Ergebnisse für verwandte Proteine stellt das Vorkommen einer zweiten ATP-Bindestelle jedoch eine mögliche Erklärung für die beobachtete ADP-Produktion in Gegenwart hoher DltC-Konzentrationen dar. Es kann jedoch nicht geklärt werden, ob die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit auf die resultierende Abnahme der ATP-Konzentration zurückzuführen ist, oder ob ADP gegeben falls als Inhibitor der Reaktion fungiert. Es kann vermutet werden, dass die von MAY et al. beobachtete Substratinhibition ebenfalls auf dieses Phänomen zurückgeführt werden kann.

Die in dieser Arbeit erzielten Parameter ähneln denen, die für DltA aus *Bacillus cereus* beschrieben wurden (Osman et al., 2009; Du et al., 2008; Du and Luo, 2014). In Abwesenheit von DltC konnte ein k_{cat} von $1,5 \text{ min}^{-1}$ erhalten werden, der dem in dieser Arbeit beobachteten k_{cat} von 6 min^{-1} ähnelt. Anstelle des DltC wurde dabei Coenzym A als Substrat-Mimetikum verwendet (Osman et al., 2009). In Anwesenheit des CoA konnte eine Erhöhung des k_{cat} auf $12,9 \text{ min}^{-1}$ erzielt werden. Dieser ist jedoch niedriger als die k_{cat} -Werte in dieser Arbeit ($84\text{-}378 \text{ min}^{-1}$), die in Anwesenheit von *holo*-DltC erhalten wurden. Der Unterschied dabei könnte auf die Verwendung des CoA als DltC-Mimetikum zurückgeführt werden. Die Affinitäten von DltA aus *Bacillus cereus* für ATP ($K_M = 10 \mu\text{M}$) und D-Ala ($K_M = 30 \mu\text{M}$) sind deutlich höher als die Affinitäten des DltA von *Bacillus subtilis* für ATP ($K'_S = 192 \mu\text{M}$) und D-Ala ($K'_S = 531 \mu\text{M}$). Dabei ähneln die thermodynamischen Parameter, die in dieser Arbeit anhand der AMP-Freisetzung bestimmt wurden, denen, die mittels ITC-Titrationsexperimente erzielt wurden. In Abwesenheit des Cofaktors kann keine Zunahme der AMP-Freisetzung pro Zeiteinheit in Abhängigkeit der DltC-Konzentration beobachtet werden.

Unter den gewählten Bedingungen erfolgt vermutlich eine Hydrolyse des Thioesters, welcher nach Übertragung des D-Ala auf die freie Thiolgruppe des 4'-Phosphopantethein-Cofaktors gebildet wird. Dadurch wird mehr AMP generiert, als die verwendeten DltC Konzentrationen ermöglichen würden. Dies kann durch den leicht basischen pH der Reaktionsbedingungen *in vitro* verursacht werden. Die Hydrolyse des gebildeten Adenylats wurde bereits für 18:0-*holo*-ACP beschrieben und durch Absenken des pH-Wertes auf 6,1 sowie verringern der

Temperatur verlangsamt (Zornetzer et al., 2006). Die Thioester-Hydrolyse könnte *in vivo* jedoch auch eine kinetische Kontrolle der Beladung des DltC bewirken, da DltA ebenfalls in der Lage ist, mit einer geringeren Effizienz das D-Ala auf andere ACPs und PCPs zu übertragen (Heaton and Neuhaus, 1994).

Unter Berücksichtigung aller thermodynamischen und kinetischen Parameter nach der Annahme von DltC als Aktivator (*in vitro*) kann ein vereinfachtes Reaktionsmodell aufgestellt werden (Abbildung 4.9). Dabei ist DltA in Abwesenheit des DltC in der Lage, unter Verbrauch eines D-Ala und ATP ein AMP zu generieren. Die AMP-Bildung wird jedoch durch die Anwesenheit des DltC beschleunigt. Die Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit in Abwesenheit des DltC kann die Zelle *in vivo* vor einer ATP-Verschwendung schützen. Nach dem Satz von Hess ist die für die Reaktion aufgebrauchte Gesamtenthalpie unabhängig vom gewählten Reaktionsweg. Dementsprechend sollte $\Delta G_S + \Delta G'_A = \Delta G_A + \Delta G'_S$ sein. In diesem Fall kann jedoch eine Diskrepanz beobachtet werden ($-12,9 \text{ kcal mol}^{-1} \neq -10,7 \text{ kcal mol}^{-1}$). Ungenauigkeiten in den experimentell erhaltenen Parametern sowie weitere energetische Beiträge (z.B. konformationelle Änderungen) können diese Abweichung erklären. Zudem wurde zur Vereinfachung des Modells die Bindung des D-Ala nicht berücksichtigt, die jedoch auch einen energetischen Beitrag leistet.

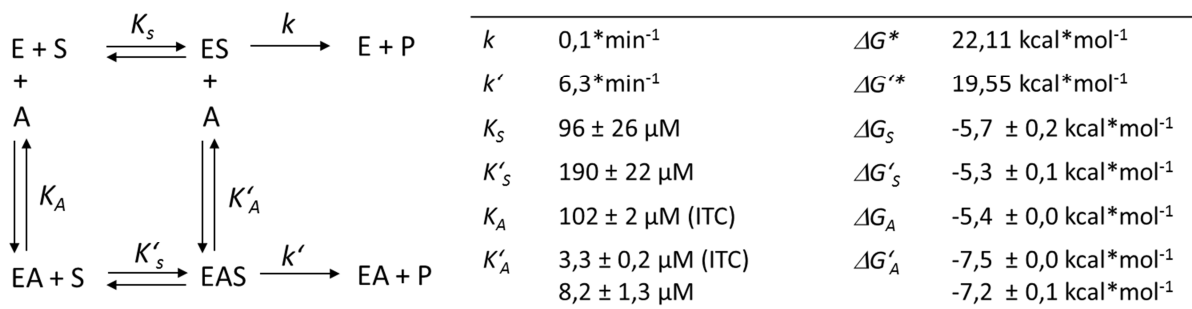


Abbildung 4.9 **Modell eines reversiblen Aktivators *in vitro***. k = Geschwindigkeitskonstante, K = Dissoziationskonstante, ΔG = freie Enthalpie der Komplexbildungsreaktion, ΔG^* = Aktivierungsenthalpie für die Ausbildung des Übergangszustandes, E = Enzym (DltA), A = Aktivator (*holo*-DltC), S = Substrat (ATP), D-Ala wird analog zu DltC ebenfalls wieder freigesetzt und kann demzufolge auch als Aktivator angenommen werden. Da die Experimente jedoch stets mit einem großen Überschuss an D-Ala durchgeführt wurden, findet es in diesem Modell keine Berücksichtigung. Der K'_S -Wert für D-Ala beträgt $530,9 \text{ } \mu\text{M}$.

Die mittels ITC beobachtete Affinität von DltA für AMPCPP liegt ca. zwischen 500 und 700 μM . Aufgrund der hohen zellulären ATP-Konzentration (im millimolaren Bereich), kann *in vivo* eine Sättigung von DltA mit ATP angenommen werden. Die zellulären Konzentrationen von D-Ala hingegen liegen im Bereich von ca. 100 μM , so dass in diesem Fall keine Sättigung mit D-Ala zu erwarten ist (Manning et al., 1974).

Zudem kann unter Berücksichtigung der verschiedenen Konformationen des DltA, der experimentell erhaltenen thermodynamischen Parameter und unter Vernachlässigung der Adenylierungs-Reaktion in Abwesenheit von DltC ein mögliches vereinfachtes Reaktionsschema für die DltA-katalysierte D-Alanylierung des DltC *in vivo* aufgestellt werden (Abbildung 4.10). Für die Bindung von ATP und D-Ala an DltA kann ein sequentiell zufälliger Mechanismus vermutet werden, da die Anwesenheit des ersten Substrates keine

Auswirkungen auf die Affinität des zweiten Substrates hat. In Stevens et al. 2006 wurde innerhalb von *steady-state*-Messungen ebenfalls keine präferierte Reihenfolge der Bindung der Substrate Phe und ATP an das Enzym PheA beobachtet. Unter nicht *steady-state*-Bedingungen konnte jedoch eine kinetische Kontrolle für die Bindung des ATP vor dem Phe beobachtet werden, so dass dadurch von einer geordnet sequentiellen Bindung ausgegangen wurde. In dieser Arbeit wurden alle Messungen nur unter *steady-state*-Bedingungen durchgeführt, so dass keine Ergebnisse vorliegen, ob die Bindung von ATP und D-Ala an DltA ebenfalls einer kinetischen Kontrolle unterliegt.

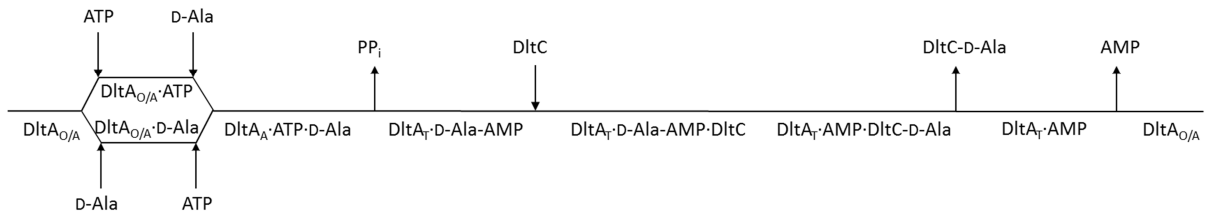


Abbildung 4.10 **Modell des Reaktionsschemas für die DltA-katalysierte D-Alanylierung von DltC *in vivo*.** DltA_O offene Konformation, DltA_A Adenylierungs-Konformation, DltA_T Transfer-Konformation

Nach der Bindung von ATP und D-Ala geht DltA von der offenen zur Adenylierungs-Konformation über, in der die Bildung des Intermediates D-Ala-Adenylyat erfolgt. Durch die Abspaltung des Pyrophosphates wird der Übergang von der Adenylierungs-zur Transfer Konformation induziert (Yonus et al., 2008). Die Bindung von DltC erfolgt an DltA in der Transfer-Konformation und folgt dabei dem Ping-Pong Mechanismus, da dieses an das gebildete Reaktionsintermediat DltA·D-Ala-AMP bindet. Es kommt dabei nicht zur Bildung des quaternären Komplexes DltA·ATP·D-Ala·DltC, wie es für die von DltA-katalysierte Reaktion von *Bacillus cereus* beschrieben wurde (Du and Luo, 2014). Aus den experimentellen Bedingungen kann nicht eindeutig geklärt werden, ob die Dissoziation des D-alanylierten DltC und AMP simultan, sequentiell zufällig oder sequentiell geordnet verläuft. Die Kristallisation von DltA (aus dieser Arbeit und pdb-Code 3E7X, (Yonus et al., 2008)) erfolgte in Anwesenheit von ATP, D-Alanin und DltC und weist im aktiven Zentrum ein AMP Molekül auf. Es kann daher vermutet werden, dass AMP nach der Reaktion im aktiven Zentrum verbleiben kann. Ebenfalls kann nicht geklärt werden, ob die Bindung eines neuen ATP und D-Ala nach der Dissoziation des AMP erfolgt, oder ob eine Verdrängung des AMP durch Bindung der Substrate erfolgt.

Ein ähnliches Modell wurde bereits für die Acyl-CoA-Synthase anhand von Röntgenkristallstrukturen mit diversen Liganden vermutet (Kochan et al., 2009) und konnte nun für DltA durch kinetische, strukturelle und thermodynamische Daten verifiziert werden.

4.3.1. Hat der alternative DltA-DltC-Komplex eine Funktion innerhalb der DltA-katalysierten Reaktion?

Durch Verwendung von DltA RW (Mutation der Bindestelle A) und DltC A3 (Mutation der Bindestelle B) konnte innerhalb der ITC-Experimente die alternative Bindung von DltC nach Position A oder B des alternativen Komplexes nicht nachgewiesen werden. Dabei stellt sich

die Frage, ob diese Interaktion eine Funktion innerhalb der DltA-katalysierten D-Alanylierung von DltC aufweist?

Vorstellbar wäre dabei, dass die beobachtete Bindung von DltC an die Position A des alternativen Komplexes dem katalytisch inaktiven Michaelis-Komplex entspricht, bevor DltC eine produktive Bindung mit DltA eingeht, die eine Übertragung des D-Ala auf DltC ermöglicht. Eine weitere Möglichkeit könnte darin bestehen, dass die alternative Bindung von DltC an die Position A eine allosterische Regulation der DltA-katalysierten Reaktion bewirkt.

Im Vergleich von DltA RW mit wt Dlt ergeben sich für die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der DltC-Konzentration erhöhte K'_A - sowie V'_m -Werte. Wird die Abhängigkeit der gemessenen Reaktionsgeschwindigkeit von der DltA RW- und DltA wt-Konzentration verglichen, kann eine geringfügig höhere Aktivität für die Variante RW in Abwesenheit des DltC festgestellt werden. Es kann dabei nicht ausgeschlossen werden, dass die eingeführten Mutationen eine allosterische Beeinflussung des aktiven Zentrums des DltA bewirken. Die Anwesenheit des DltC hat unter Berücksichtigung der K'_A -Werte von DltA RW und DltA wt für DltC den gleichen aktivierenden Effekt auf die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit.

Eine eventuelle allosterische Beeinflussung des aktiven Zentrums durch die eingeführten Mutationen könnte sich auf die Stabilität des gebildeten DltA-DltC-Komplexes und somit auf den K'_A -Wert auswirken, ohne dabei das energetische Niveau des Übergangszustandes zu beeinflussen, was ebenfalls zu einer Erhöhung des k_{cat} führt (Abbildung 4.11). Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der ATP-Konzentration sowie der K_S -Wert für ATP sind analog zu DltA wt.

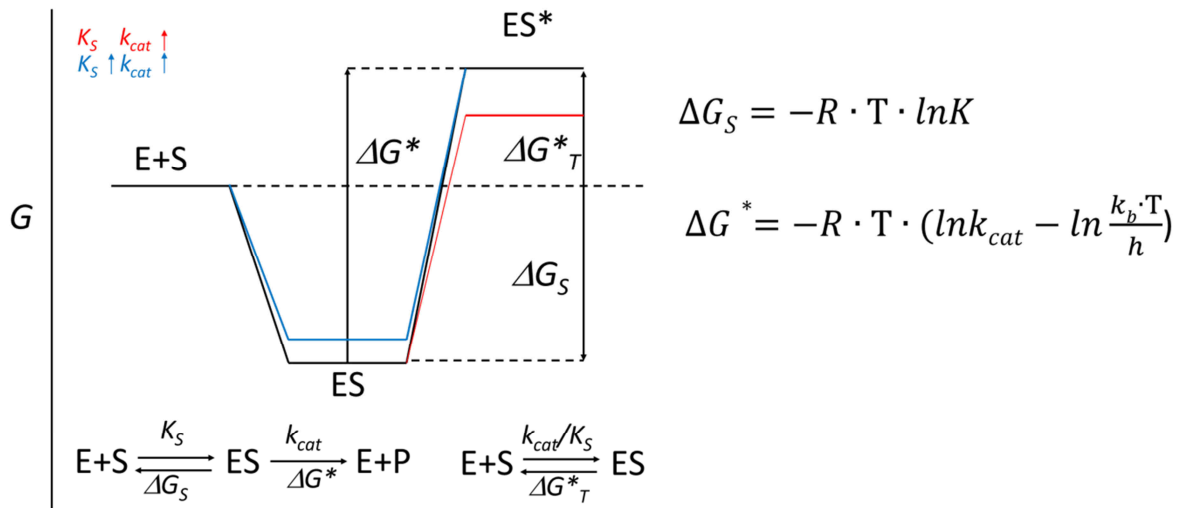


Abbildung 4.11 **Schema der freien Enthalpien für die DltA katalysierte Reaktion.** Die Schemata der freien Enthalpien der Reaktion von DltA wt und *holo*-DltC ist schwarz, von DltA RW und *holo*-DltC blau und von DltA wt und *holo*-DltC A3 rot dargestellt. E = Enzym (DltA) S = Substrat (ATP), ES = Enzym-Substrat-Komplex, ES* = Übergangszustand des Enzym-Substrat-Komplexes, P = Produkt (AMP).

Interessanterweise kann für *holo*-DltC A3 und DltA wt ein erhöhter k_{cat} unter Beibehaltung des K'_A -wertes festgestellt werden. Die Erhöhung der Wechselzahl des Enzyms ist auf ein Absenken der freien Aktivierungsenthalpie des Enzym-Substrat-Komplexes zurückzuführen

(Abbildung 4.11). Das Einführen der A3 Mutation in *holo*-DltC führt zu geringen Änderungen in der Sekundärstruktur im Vergleich zum *holo*-DltC wt, was mittels der fern-UV/CD-Spektroskopie bestätigt werden konnte. Die Struktur des *holo*-DltC A3 könnte somit eher komplementär zu DltC im Übergangszustand des katalytischen DltA-DltC-Komplexes, als zu dem nicht aktivierten DltA-DltC-Komplex sein. Aus dieser Beobachtung kann jedoch keine Aussage zur Relevanz des alternativen Komplexes gemacht werden. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass der k_{cat} (in Abhängigkeit der Konzentration von *holo*-DltC A3) mit $6,2 \text{ min}^{-1}$ dem k_{cat} in Abhängigkeit der ATP-Konzentration ($6,3 \text{ min}^{-1}$) entspricht. Diese Übereinstimmung wäre unter Verwendung von *holo*-DltC zu erwarten, da die Wechselzahl einer enzymkatalysierten Reaktion unabhängig davon ist, ob die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der ATP, D-Ala oder DltC-Konzentration gemessen wurde. Unter Verwendung der gleichen Protein-Varianten und Substrate ist eine gleiche Wechselzahl zu erwarten. Dementsprechend können Abweichungen zwischen *holo*-DltC und *holo*-DltC A3 auch auf die Proteinpräparation zurückgeführt werden.

Schlussfolgernd kann dem alternativen Komplex innerhalb der DltA-katalysierten Reaktion keine eindeutige Funktion zugeordnet werden. Für DltA RW konnte ein erhöhter K'_A - und V'_m -Wert für die DltC-abhängige Reaktion festgestellt werden. Allerdings weist die DltA RW in Abwesenheit des DltC eine höhere Grundaktivität auf.

4.4. Zusammenfassende Diskussion der erzielten Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden neben der Kristallstruktur von DltA mit $1,6 \text{ \AA}$ zwei Strukturen des DltA-DltC-Komplexes mit einer Auflösung von $3,2 \text{ \AA}$ und $1,9 \text{ \AA}$ beschrieben. Die Funktion des produktiven Komplexes ($3,2 \text{ \AA}$) kann in der Übertragung des aktivierten D-Ala von DltA auf den 4'-Phosphopantethein des DltC gesehen werden (Abbildung 4.12).

DltC bindet an die Transfer-Konformation von DltA, die durch Zugabe des AMP stabilisiert werden kann. Die Affinität von DltA für *holo*-DltC ist dabei höher, als für die Cofaktor-freie Variante *apo*-DltC S36A, da der DltC-Cofaktor ebenfalls zur Bindung beiträgt. In Abwesenheit von AMP kann eine niedrigere Affinität für die DltA-DltC-Interaktion beobachtet werden, die vermutlich auf eine konformationelle Änderung des DltA zurückzuführen ist. Die Relevanz des alternativen Komplexes mit zwei potentiellen DltC-Bindestellen konnte nicht geklärt werden, da bei allen durchgeführten Experimenten kein Ergebnis erzielt werden konnte, welches eine eindeutige Präsenz des alternativen DltA-DltC-Komplexes bestätigt.

Innerhalb der NMR-spektroskopischen Titration von DltA zu ^{15}N -markiertem DltC konnte eine Kontaktfläche von DltC für die Interaktion mit DltA identifiziert werden, die sowohl dem produktiven Komplex, als auch der Position A des alternativen Komplexes zugeordnet werden kann. Die Bindung nach Position B kann hingegen ausgeschlossen werden. Es wurden DltA- und DltC-Varianten erstellt, die eine Bindung von DltC an die Position A (DltA RW) oder an die Position B (DltC A3) des alternativen Komplexes abschwächend sollen. Mittels ITC-Experimente konnte jedoch unter keiner Bedingung ein abweichendes Bindungsverhalten der Varianten im Vergleich zu den wt-Proteinen beobachtet werden.

Die kinetischen Analysen ergaben geringe Unterschiede zwischen den wt-Proteinen und den Varianten. Jedoch konnte in Abwesenheit des *holo*-DltC bereits eine unterschiedliche

Grundaktivität der Variante DltA RW festgestellt werden, so dass die Ergebnisse nicht eindeutig interpretiert werden können.

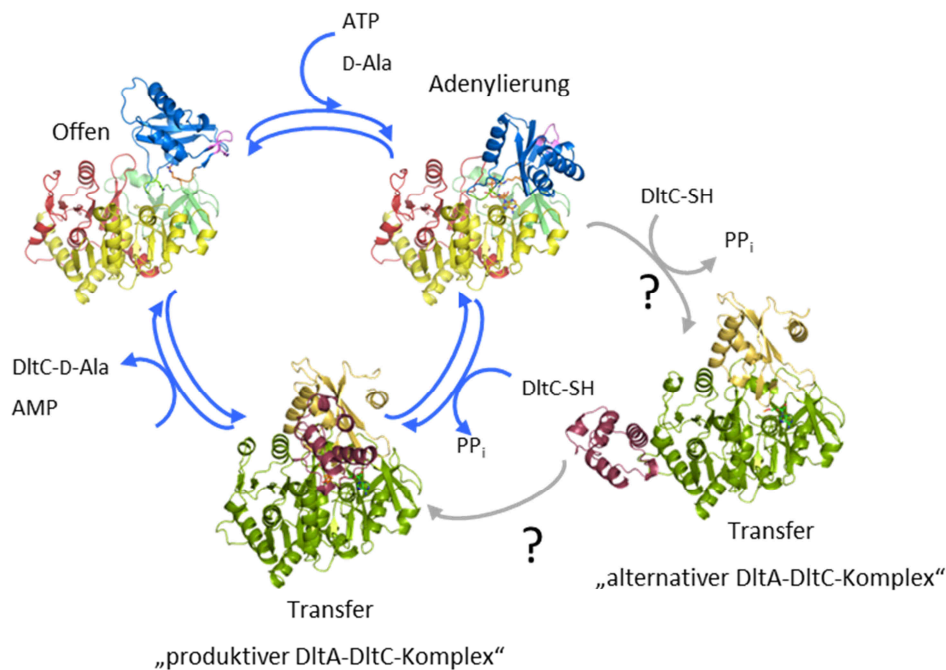


Abbildung 4.12 Neues Modell für den DltA-Reaktionszyklus.

IM-MS-Experimente liefern ebenfalls Hinweise auf das Vorkommen von nur einer Spezies des DltA-DltC-Komplexes in Lösung, welche anhand der erzielten Ergebnisse vermutlich dem produktiven Komplex zugeordnet werden kann. Gleichzeitig konnte mittels IM-MS, ITC sowie NMR-Titrations-Experimenten eine äquimolare Bindung von DltC zu DltA beobachtet werden. Demnach kann eine simultane Bindung von DltC nach dem produktiven und alternativen Komplex ausgeschlossen werden.

Neben dem Vergleich der thermodynamischen und kinetischen Parameter zwischen wt und Varianten konnte eine umfangreiche Charakterisierung der Bindung des DltC an DltA und dem damit verbundenen D-Ala-Transfer erfolgen. Die erhaltenen Parameter weichen teilweise stark von denen ab, die bereits für DltA und DltC aus *Bacillus subtilis* beschrieben wurden, sind jedoch mit denen aus *Bacillus cereus* vergleichbar. Allerdings können im Vergleich der thermodynamischen und kinetischen Parameter der Interaktion verwandter Proteine untereinander ebenfalls starke Abweichungen festgestellt werden. Für die Bindung von ATP und D-Ala kann ein sequentiell zufälliger Mechanismus vermutet werden, während die Bindung des DltC an das gebildete DltA-D-Ala-Adenylat nach dem Ping-Pong-Mechanismus erfolgt.

Schlussfolgernd kann festgestellt werden, dass für DltA verschiedene Konformationen bestätigt werden konnten, die das von YONUS et al. beschriebene Reaktionsmodell belegen und erweitern könnten (Abbildung 4.12). Allerdings konnten keine Ergebnisse erzielt werden, die eine Präsenz des alternativen Komplexes in Lösung eindeutig belegen.

5. Zusammenfassung

Lipoteichonsäuren sind wichtige Zellbestandteile gram-positiver Bakterien und beeinflussen die Virulenz sowie die Fähigkeit sich an ändernde Umweltbedingungen anzupassen. Modifikationen dieser Lipoteichonsäuren sind wichtige Mechanismen zur Regulation der elektrochemischen Eigenschaften der Membran. Die bedeutendste ist die D-Alanylierung, welche von den Proteinen des *dlt*-Operons durchgeführt wird. DltA, eine D-Alanin: D-alanyl-carrier-Protein-Ligase, katalysiert die Aktivierung des D-Alanin mit Hilfe von ATP und überträgt dieses auf den 4'-Phosphopantethein-Cofaktor des DltC. Die Überexpression des *dltA* Gens kann als eine Ursache in der Entwicklung der Resistenz von *MRSA* gegenüber dem Reserveantibiotikum Daptamycin beschrieben werden. Die Proteine des *dlt*-Operons stellen somit ein interessantes Ziel für die Entwicklung neuer Wirkstoffe zur Bekämpfung von Infektionen dar, verursacht durch gram-positive Bakterien.

2008 wurde von YONUS et al. ein Reaktionsmodell postuliert indem DltA, in Abhängigkeit des Reaktionsverlaufes und der damit verbundenen Substrat- oder Produktbindung, unterschiedliche Konformationen einnehmen kann. Innerhalb dieser Arbeit konnte anhand limitierter Proteolyse und nativer Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie konformationelle Änderungen in Abhängigkeit des gebundenen Nukleotides bestätigt werden. Weiterhin konnte mittels CD- und NMR-Spektroskopie gezeigt werden, dass die Abwesenheit des 4'-Phosphopantethein-Cofaktors keine signifikante Auswirkung auf die DltC-Konformation hat.

In dieser Arbeit werden zwei Röntgenkristallstrukturen des DltA-DltC-Komplexes beschrieben. Die erste Struktur repräsentiert einen produktiven Komplex, in dem DltC zwischen der großen und kleinen Domäne von DltA bindet. Der Cofaktor des DltC ist dabei direkt in Richtung des aktiven Zentrums des DltA gerichtet und ermöglicht eine Übertragung des aktivierten D-Alanins von DltA auf DltC. Der zweite Komplex hingegen ist durch eine alternative Interaktion zwischen DltC und der großen Domäne von DltA gekennzeichnet. Die Übertragung des aktivierten D-Alanins erscheint dabei unwahrscheinlich, da die Bindung von DltC weit entfernt vom aktiven Zentrum des DltA erfolgt.

NMR-spektroskopische Titrations von DltA zu ¹⁵N-markiertem DltC belegen ein mögliches Vorkommen beider Varianten in Lösung, während native Ionenmobilitäts-Massenspektrometrie-Analysen das Vorkommen einer Variante des DltA-DltC-Komplexes aufzeigen. Um die Relevanz des alternativen Komplexes näher zu beschreiben, wurde die entsprechende Bindungsstelle von DltC an DltA mutiert (DltA RW). Ein Vergleich der Bindungseigenschaften von DltC an DltA wt und die Variante DltA RW mittels ITC-Experimente brachte keine signifikanten Unterschiede in den energetischen Bindungsparametern zum Vorschein. Die höchste Affinität zwischen DltA und DltC kann dabei in Anwesenheit von AMP, welches in DltA die Transfer-Konformation stabilisiert, beobachtet werden. Die ATP induzierte Adenylierungs-Konformation und die Nukleotid-freie offene Konformation weisen eine 40-fache niedrigere Affinität zu DltC auf. Dabei konnte gezeigt werden, dass dies vermutlich auf eine notwendige konformationelle Änderung von

DltA für die Interaktion mit DltC zurückgeführt werden kann. Die Anwesenheit des DltC-Cofaktors führt ebenfalls zu einer Erhöhung der Affinität zu DltA, so dass eine Konformations- und Cofaktor-abhängige Interaktion von DltA und DltC festgestellt werden kann.

Für die Charakterisierung der DltA-katalysierten D-Alanylierung des DltC wurde ein diskontinuierlicher chromatographischer Assay etabliert der eine simultane Abnahme des Substrates (ATP) und Zunahme des Produktes (AMP) ermöglicht. Die basale katalytische Aktivität des DltA in Abwesenheit des DltC und die Erhöhung der Effizienz in Anwesenheit des D-Alanin Akzeptors DltC folgt dabei der Auswertung nach dem Modell eines reversiblen Aktivators. Der gebildete Thioester zwischen dem Cofaktor des DltC und dem D-Alanin ist *in vitro* durch eine hohe Hydrolysegeschwindigkeit gekennzeichnet, so dass kontinuierlich freies DltC generiert wird. Analog der ITC-Experimente konnte unter Verwendung der Varianten keine eindeutigen Änderungen der katalytischen Effizienz beobachtet werden. Die Bindung des DltC erfolgt dabei nach dem Ping-Pong-Mechanismus nach der Bildung des D-Ala-Adenylats und der Pyrophosphatabspaltung und führt nicht zur Bildung eines quaternären DltA·D-Ala·ATP·DltC-Komplexes.

Literaturverzeichnis

- Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkoczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C., and Zwart, P.H. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* *66*, 213-221.
- Afonine, P.V., Grosse-Kunstleve, R.W., Echols, N., Headd, J.J., Moriarty, N.W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T.C., Urzhumtsev, A., Zwart, P.H., and Adams, P.D. (2012) Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* *68*, 352-367.
- Andersson, C.S., Lundgren, C.A.K., Magnusdottir, A., Ge, C.R., Wieslander, A., Molina, D.M., and Hogbom, M. (2012) The Mycobacterium tuberculosis Very-Long-Chain Fatty Acyl-CoA Synthetase: Structural Basis for Housing Lipid Substrates Longer than the Enzyme. *Structure* *20*, 1062-1070.
- Armstrong, J.J., Baddiley, J., and Buchanan, J.G. (1959) Structure of Teichoic Acid from the Walls of Bacillus-Subtilis. *Nature* *184*, 248-249.
- Babbitt, P.C., Kenyon, G.L., Martin, B.M., Charest, H., Slyvestre, M., Scholten, J.D., Chang, K.H., Liang, P.H., and Dunawaymariano, D. (1992) Ancestry of the 4-Chlorobenzoate Dehalogenase - Analysis of Amino-Acid-Sequence Identities Among Families of Acyl-Adenyl Ligases, Enoyl-Coa Hydratases Isomerases, and Acyl-Coa Thioesterases. *Biochemistry* *31*, 5594-5604.
- Babu, M., Greenblatt, J.F., Emili, A., Strynadka, N.C.J., Reithmeier, R.A.F., and Moraes, T.F. (2010) Structure of a SLC26 Anion Transporter STAS Domain in Complex with Acyl Carrier Protein: Implications for E. coli YchM in Fatty Acid Metabolism. *Structure* *18*, 1450-1462.
- Bains, J., and Boulanger, M.J. (2007) Biochemical and structural characterization of the paralogous benzoate CoA Ligases from Burkholderia xenovorans LB400: Defining the entry point into the novel benzoate oxidation (box) pathway. *Journal of Molecular Biology* *373*, 965-977.
- Beis, I., and Newsholme, E.A. (1975) The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem.J.* *152*, 23-32.
- Bertani, G. (1951) Studies on Lysogenesis .1. the Mode of Phage Liberation by Lysogenic Escherichia-Coli. *Journal of Bacteriology* *62*, 293-300.
- Bertsche, U., Yang, S.J., Kuehner, D., Wanner, S., Mishra, N.N., Roth, T., Nega, M., Schneider, A., Mayer, C., Grau, T., Bayer, A.S., and Weidenmaier, C. (2013) Increased Cell Wall Teichoic Acid Production and D-alanylation Are Common Phenotypes among Daptomycin-Resistant Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Clinical Isolates. *Plos One* *8*.
- Bianconi, M.L. (2003) Calorimetric determination of thermodynamic parameters of reaction reveals different enthalpic compensations of the yeast hexokinase isozymes. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 18709-18713.
- Boucher, H.W., and Sakoulas, G. (2007) Perspectives on daptomycin resistance, with emphasis on resistance in Staphylococcus aureus. *Clinical Infectious Diseases* *45*, 601-608.
- Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T., and Warren, G.L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* *54*, 905-921.
- Buckstein, M.H., He, J., and Rubin, H. (2008) Characterization of nucleotide pools as a function of physiological state in Escherichia coli. *J.Bacteriol.* *190*, 718-726.

- Bushley, K.E., Raja, R., Jaiswal, P., Cumbie, J.S., Nonogaki, M., Boyd, A.E., Owensby, C.A., Knaus, B.J., Elser, J., Miller, D., Di, Y.M., McPhail, K.L., and Spatafora, J.W. (2013) The Genome of *Tolypocladium inflatum*: Evolution, Organization, and Expression of the Cyclosporin Biosynthetic Gene Cluster. *Plos Genetics* 9.
- Butterworth, P.H., Baum, H., and Porter, J.W. (1967) A modification of the Ellman procedure for the estimation of protein sulfhydryl groups. *Arch.Biochem.Biophys.* 118, 716-723.
- Caboche, S., Pupin, M., Leclere, V., Fontaine, A., Jacques, P., and Kucherov, G. (2008) NORINE: a database of nonribosomal peptides. *Nucleic Acids Research* 36, D326-D331.
- Chang, K.H., Xiang, H., and 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., and Richardson, D.C. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 66, 12-21.
- Childs, W.C., Taron, D.J., and Neuhaus, F.C. (1985) Biosynthesis of D-Alanyl-Lipoteichoic Acid by *Lactobacillus-Casei* - Interchain Transacylation of D-Alanyl Ester Residues. *Journal of Bacteriology* 162, 1191-1195.
- Collins, L.V., Kristian, S.A., Weidenmaier, C., Faigle, M., van Kessel, K.P.M., van Strijp, J.A.G., Gotz, F., Neumeister, B., and Peschel, A. (2002) *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice. *Journal of Infectious Diseases* 186, 214-219.
- Conti, E., Franks, N.P., and 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., and Brick, P. (1997) Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *Embo Journal* 16, 4174-4183.
- Crosby, J., and Crump, M.P. (2012) The structural role of the carrier protein - active controller or passive carrier. *Natural Product Reports* 29, 1111-1137.
- Davis, I.W., Murray, L.W., Richardson, J.S., and Richardson, D.C. (2004) MOLPROBITY: structure validation and all-atom contact analysis for nucleic acids and their complexes. *Nucleic Acids Res.* 32, W615-W619.
- Debabov, D.V., Heaton, M.P., Zhang, Q., Stewart, K.D., Lambalot, R.H., and Neuhaus, F.C. (1996a) The D-Alanyl carrier protein in *Lactobacillus casei*: cloning, sequencing, and expression of *dltC*. *J.Bacteriol.* 178, 3869-3876.
- Debabov, D.V., Heaton, M.P., Zhang, Q.Y., Stewart, K.D., Lambalot, R.H., and Neuhaus, F.C. (1996b) The D-alanyl carrier protein in *Lactobacillus casei*: Cloning, sequencing, and expression of *dltC*. *Journal of Bacteriology* 178, 3869-3876.
- Debabov, D.V., Kiriukhin, M.Y., and Neuhaus, F.C. (2000) Biosynthesis of lipoteichoic acid in *Lactobacillus rhamnosus*: role of *DltD* in D-alanylation. *J.Bacteriol.* 182, 2855-2864.
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G.W., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A. (1995) Nmrpipe - A Multidimensional Spectral Processing System Based on Unix Pipes. *Journal of Biomolecular Nmr* 6, 277-293.
- Deluca, M., and Mcelroy, W.D. (1984) 2 Kinetically Distinguishable Atp Sites in Firefly Luciferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123, 764-770.
- Dieckmann, R., Pavela-Vrancic, M., von Dohren, H., and Kleinkauf, H. (1999) Probing the domain structure and ligand-induced conformational changes by limited proteolysis of tyrocidine synthetase 1. *Journal of Molecular Biology* 288, 129-140.

- Dijkstra, A.J., and Keck, W. (1996) Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport. *Journal of Bacteriology* *178*, 5555-5562.
- Diven, W.F., Scholz, J.J., and Johnston, R.B. (1964) PURIFICATION AND PROPERTIES OF THE ALANINE RACEMASE FROM *BACILLUS SUBTILIS*. *Biochim Biophys Acta* *85*.
- Doyle, R.J., and Marquis, R.E. (1994) Elastic, flexible peptidoglycan and bacterial cell wall properties. *Trends in Microbiology* *2*, 57-60.
- Du, L., He, Y., and Luo, Y. (2008) Crystal structure and enantiomer selection by D-alanyl carrier protein ligase DltA from *Bacillus cereus*. *Biochemistry* *47*, 11473-11480.
- Du, L., and Luo, Y. (2014) Thiolation-enhanced substrate recognition by D-alanyl carrier protein ligase DltA from *Bacillus cereus*. *F1000Res.* *3*, 106-120.
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* *60*, 2126-2132.
- Evans, S.E., Williams, C., Arthur, C.J., Burston, S.G., Simpson, T.J., Crosby, J., and Crump, M.P. (2008) An ACP Structural Switch: Conformational Differences between the Apo and Holo Forms of the Actinorhodin Polyketide Synthase Acyl Carrier Protein. *Chembiochem* *9*, 2424-2432.
- Fairbanks, G., Steck, T.L., and Wallach, D.F. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* *10*, 2606-2617.
- Findlow, S.C., Winsor, C., Simpson, T.J., Crosby, J., and Crump, M.P. (2003) Solution structure and dynamics of oxytetracycline polyketide synthase acyl carrier protein from *Streptomyces rimosus*. *Biochemistry* *42*, 8423-8433.
- Fischer, W. (1988) Physiology of Lipoteichoic Acids in Bacteria. *Advances in Microbial Physiology* *29*, 233-302.
- Fischer, W. (1990) Bacterial phosphoglycolipids and lipoteichoic acids. M.Kates (ed) *Handbook of lipid research*, vol VI. Glycolipids, phosphoglycolipids and sulfoglycolipids. Plenum Press, Inc. New York 123-124.
- Fischer, W., Rosel, P., and Koch, H.U. (1981) Effect of alanine ester substitution and other structural features of lipoteichoic acids on their inhibitory activity against autolysins of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* *146*, 467-472.
- Franks, N.P., Jenkins, A., Conti, E., Lieb, W.R., and Brick, P. (1998) Structural basis for the inhibition of firefly luciferase by a general anesthetic. *Biophysical Journal* *75*, 2205-2211.
- Freire, E. (1994) Statistical Thermodynamic Analysis of Differential Scanning Calorimetry Data - Structural Deconvolution of Heat-Capacity Function of Proteins. *Numerical Computer Methods*, Pt B *240*, 502-530.
- Gehring, A.M., Mori, I., and Walsh, C.T. (1998) Reconstitution and characterization of the *Escherichia coli* enterobactin synthetase from EntB, EntE, and EntF. *Biochemistry* *37*, 2648-2659.
- Gocht, M., and Marahiel, M.A. (1994) Analysis of Core Sequences in the D-Phe Activating Domain of the Multifunctional Peptide Synthetase Tyca by Site-Directed Mutagenesis. *Journal of Bacteriology* *176*, 2654-2662.
- Goldberg, R.N., Kishore, N., and Lennen, R.M. (2002) Thermodynamic quantities for the ionization reactions of buffers. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* *31*, 231-370.
- Gomez, J., Hilser, V.J., Xie, D., and Freire, E. (1995) The Heat-Capacity of Proteins. *Proteins-Structure Function and Genetics* *22*, 404-412.
- Gotz, F. (2002) *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology* *43*, 1367-1378.

- Goujon, M., McWilliam, H., Li, W.Z., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J., and Lopez, R. (2010) A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research* **38**, W695-W699.
- Gross, M., Cramton, S.E., Gotz, F., and Peschel, A. (2001) Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces. *Infection and Immunity* **69**, 3423-3426.
- Grzesiek, S., Stahl, S.J., Wingfield, P.T., and Bax, A. (1996) The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry* **35**, 10256-10261.
- Gulick, A.M., Starai, V.J., Horswill, A.R., Homick, K.M., and 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.
- Gupta, S., Modak, R., Namita, S., and Surolia, A. (2009) Partial molar volumes of acyl carrier proteins are related to their states of acylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **380**, 763-768.
- Guy, J.E., Whittle, E., Moche, M., Lengqvist, J., Lindqvist, Y., and Shanklin, J. (2011) Remote control of regioselectivity in acyl-acyl carrier protein-desaturases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 16594-16599.
- Haas, R., Koch, H.U., and Fischer, W. (1984) Alanyl Turnover from Lipoteichoic Acid to Teichoic-Acid in *Staphylococcus-Aureus*. *Fems Microbiology Letters* **21**, 27-31.
- Harwood, C.R., and S.M.Cutting (1990) Chemically defined growth media and supplements. *Molecularbiological methods for Bacillus* **548**.
- Heaton, M.P., and Neuhaus, F.C. (1992) Biosynthesis of D-Alanyl-Lipoteichoic Acid - Cloning, Nucleotide-Sequence, and Expression of the *Lactobacillus-Casei* Gene for the D-Alanine-Activating Enzyme. *Journal of Bacteriology* **174**, 4707-4717.
- Heaton, M.P., and Neuhaus, F.C. (1994) Role of the D-Alanyl Carrier Protein in the Biosynthesis of D-Alanyl-Lipoteichoic Acid. *Journal of Bacteriology* **176**, 681-690.
- Hisanaga, Y., Ago, H., Nakagawa, N., Hamada, K., Ida, K., Yamamoto, M., Hori, T., Arie, Y., Sugahara, M., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., and Miyano, M. (2004) Structural basis of the substrate-specific two-step catalysis of long chain fatty acyl-CoA synthetase dimer. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 31717-31726.
- Holak, T.A., Kearsley, S.K., Kim, Y., and Prestegard, J.H. (1988) 3-Dimensional Structure of Acyl Carrier Protein Determined by Nmr Pseudoenergy and Distance Geometry Calculations. *Biochemistry* **27**, 6135-6142.
- Hori, K., Yamamoto, Y., Minetoki, T., Kurotsu, T., Kanda, M., Miura, S., Okamura, K., Furuyama, J., and Saito, Y. (1989) Molecular-Cloning and Nucleotide-Sequence of the Gramicidin-S Synthetase 1 Gene. *Journal of Biochemistry* **106**, 639-645.
- Jogl, G., and Tong, L. (2004) Crystal structure of yeast acetyl-coenzyme A synthetase in complex with AMP. *Biochemistry* **43**, 1425-1431.
- Johnson, B.A., and Blevins, R.A. (1994) Nmr View - A Computer-Program for the Visualization and Analysis of Nmr Data. *Journal of Biomolecular Nmr* **4**, 603-614.
- Johnson, M.A., Peti, W., Herrmann, T., Wilson, I.A., and Wuthrich, K. (2006) Solution structure of As11650, an acyl carrier protein from *Anabaena* sp PCC 7120 with a variant phosphopantetheinylation-site sequence. *Protein Science* **15**, 1030-1041.
- Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* **66**, 125-132.
- Kallow, W., Pavela-Vrancic, M., Dieckmann, R., and von Dohren, H. (2002) Nonribosomal peptide synthetases-evidence for a second ATP-binding site. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **1601**, 93-99.

- Kantardjieff, K.A., and Rupp, B. (2003) Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Science* 12, 1865-1871.
- Kim, Y., Kovrigin, E.L., and Eletr, Z. (2006) NMR studies of Escherichia coli acyl carrier protein: Dynamic and structural differences of the apo- and holo-forms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 341, 776-783.
- Kim, Y., and Prestegard, J.H. (1989) A Dynamic-Model for the Structure of Acyl Carrier Protein in Solution. *Biochemistry* 28, 8792-8797.
- Koch, H.U., Döker, R., and Fischer, W. (1985) Maintenance of D-alanine ester substitution of lipoteichoic acid by reesterification in Staphylococcus aureus. *Journal of Bacteriology* 164, 1211-1217.
- Kochan, G., Pilka, E.S., von Delft, F., Oppermann, U., and Yue, W.W. (2009) Structural Snapshots for the Conformation-dependent Catalysis by Human Medium-chain Acyl-coenzyme A Synthetase ACSM2A. *Journal of Molecular Biology* 388, 997-1008.
- Koglin, A., Mofid, M.R., Lohr, F., Schafer, B., Rogov, V.V., Blum, M.M., Mittag, T., Marahiel, M.A., Bernhard, F., and Dotsch, V. (2006) Conformational switches modulate protein interactions in peptide antibiotic synthetases. *Science* 312, 273-276.
- Konijnenberg, A., Butterer, A., and Sobott, F. (2013) Native ion mobility-mass spectrometry and related methods in structural biology. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1834, 1239-1256.
- Koprivnjak, T., Mlakar, V., Swanson, L., Fournier, B., Peschel, A., and Weiss, J.P. (2006) Cation-induced transcriptional regulation of the dlt operon of Staphylococcus aureus. *Journal of Bacteriology* 188, 3622-3630.
- Krissinel, E., and Henrick, K. (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 60, 2256-2268.
- Krissinel, E., and Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J.Mol.Biol.* 372, 774-797.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C., and Walsh, C.T. (1996) A new enzyme superfamily - The phosphopantetheinyl transferases. *Chemistry & Biology* 3, 923-936.
- 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., and Higgins, D.G. (2007) Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Lebedev, A.A., Young, P., Isupov, M.N., Moroz, O.V., Vagin, A.A., and Murshudov, G.N. (2012) JLigand: a graphical tool for the CCP4 template-restraint library. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 68, 431-440.
- Lee, T.V., Johnson, L.J., Johnson, R.D., Koulman, A., Lane, G.A., Lott, J.S., and Arcus, V.L. (2010) Structure of a Eukaryotic Nonribosomal Peptide Synthetase Adenylation Domain That Activates a Large Hydroxamate Amino Acid in Siderophore Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 285, 2415-2427.
- Li, Q., Khosla, C., Puglisi, J.D., and Liu, C.W. (2003) Solution structure and backbone dynamics of the holo form of the frenolicin acyl carrier protein. *Biochemistry* 42, 4648-4657.
- Liu, Y., Zheng, T.F., and Bruner, S.D. (2011) Structural Basis for Phosphopantetheinyl Carrier Domain Interactions in the Terminal Module of Nonribosomal Peptide Synthetases. *Chemistry & Biology* 18, 1482-1488.

- Luo, L.S., Burkart, M.D., Stachelhaus, T., and Walsh, C.T. (2001) Substrate recognition and selection by the initiation module PheATE of gramicidin S synthetase. *Journal of the American Chemical Society* *123*, 11208-11218.
- Luo, L.S., and Walsh, C.T. (2001) Kinetic analysis of three activated phenylalanyl intermediates generated by the initiation module PheATE of gramicidin S synthetase. *Biochemistry* *40*, 5329-5337.
- Manning, J.M., MERRIFIELD, J.E., Jones, W.M., and GOTSCHLI, E.C. (1974) Inhibition of Bacterial-Growth by Beta-Chloro-D-Alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *71*, 417-421.
- Marahiel, M.A., Stachelhaus, T., and Mootz, H.D. (1997) Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical Reviews* *97*, 2651-2673.
- Masoudi, A., Raetz, C.R.H., Zhou, P., and Pemble, C.W. (2014) Chasing acyl carrier protein through a catalytic cycle of lipid A production. *Nature* *505*, 422-+.
- Matthews, B.W. (1968) Solvent Content of Protein Crystals. *Journal of Molecular Biology* *33*, 491-&.
- May, J.J., Finking, R., Wiegeshoff, F., Weber, T.T., Bandur, N., Koert, U., and Marahiel, M.A. (2005) Inhibition of the D-alanine : D-alanyl carrier protein ligase from *Bacillus subtilis* increases the bacterium's susceptibility to antibiotics that target the cell wall. *Febs Journal* *272*, 2993-3003.
- May, J.J., Kessler, N., Marahiel, M.A., and Stubbs, M.T. (2002) Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 12120-12125.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2007) Phaser crystallographic software. *J.Appl.Crystallogr.* *40*, 658-674.
- McMahon, M.D., Rush, J.S., and Thomas, M.G. (2012) Analyses of MbtB, MbtE, and MbtF Suggest Revisions to the Mycobactin Biosynthesis Pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology* *194*, 2809-2818.
- Miao, V., Coeffet-LeGal, M.F., Brian, P., Brost, R., Penn, J., Whiting, A., Martin, S., Ford, R., Parr, I., Bouchard, M., Silva, C.J., Wrigley, S.K., and Baltz, R.H. (2005) Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry. *Microbiology-Sgm* *151*, 1507-1523.
- Mitchell, C.A., Shi, C., Aldrich, C.C., and Gulick, A.M. (2012) Structure of PA1221, a nonribosomal peptide synthetase containing adenylation and peptidyl carrier protein domains. *Biochemistry* *51*, 3252-3263.
- Murshudov, G.N., Skubak, P., Lebedev, A.A., Pannu, N.S., Steiner, R.A., Nicholls, R.A., Winn, M.D., Long, F., and Vagin, A.A. (2011) REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* *67*, 355-367.
- Nakatsu, T., Ichiyama, S., Hiratake, J., Saldanha, A., Kobashi, N., Sakata, K., and Kato, H. (2006) Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. *Nature* *440*, 372-376.
- Nesterenko, M.V., Tilley, M., and Upton, S.J. (1994) A Simple Modification of Blums Silver Stain Method Allows for 30 Minute Detection of Proteins in Polyacrylamide Gels. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* *28*, 239-242.
- Neuhaus, F.C., and Baddiley, J. (2003) A continuum of anionic charge: Structures and functions of D-Alanyl-Teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* *67*, 686-+.
- Neuhaus, F.C., Heaton, M.P., Debatov, D.V., and Zhang, Q.Y. (1996) The *dlt* operon in the biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid in *Lactobacillus casei*. *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease* *2*, 77-84.

- Nguyen, C., Haushalter, R.W., Lee, D.J., Markwick, P.R.L., Bruegger, J., Caldara-Festin, G., Finzel, K., Jackson, D.R., Ishikawa, F., O'Dowd, B., McCammon, J.A., Opella, S.J., Tsai, S.C., and Burkart, M.D. (2014) Trapping the dynamic acyl carrier protein in fatty acid biosynthesis. *Nature* *505*, 427-431.
- Oku, Y., Kurokawa, K., Matsuo, M., Yamada, S., Lee, B.L., and Sekimizu, K. (2009) Pleiotropic Roles of Polyglycerolphosphate Synthase of Lipoteichoic Acid in Growth of *Staphylococcus aureus* Cells. *Journal of Bacteriology* *191*, 141-151.
- Osman, K.T., Du, L., He, Y., and Luo, Y. (2009) Crystal structure of *Bacillus cereus* D-alanyl carrier protein ligase (DltA) in complex with ATP. *J.Mol.Biol.* *388*, 345-355.
- Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to Measure and Predict the Molar Absorption-Coefficient of A Protein. *Protein Science* *4*, 2411-2423.
- Parris, K.D., Lin, L., Tam, A., Mathew, R., Hixon, J., Stahl, M., Fritz, C.C., Seehra, J., and Somers, W.S. (2000) Crystal structures of substrate binding to *Bacillus subtilis* holo-(acyl carrier protein) synthase reveal a novel trimeric arrangement of molecules resulting in three active sites. *Structure with Folding & Design* *8*, 883-895.
- Perego, M., Glaser, P., Minutello, A., Strauch, M.A., Leopold, K., and Fischer, W. (1995) Incorporation of D-alanine into lipoteichoic acid and wall teichoic acid in *Bacillus subtilis*. Identification of genes and regulation. *J.Biol.Chem.* *270*, 15598-15606.
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R.W., Kalbacher, H., Jung, G., and Gotz, F. (1999) Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 8405-8410.
- Peypoux, F., Bonmatin, J.M., and Wallach, J. (1999) Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology* *51*, 553-563.
- Pfennig, S., and Stubbs, M.T. (2012) Flexing and stretching in nonribosomal Peptide synthetases. *Chem.Biol.* *19*, 167-169.
- Ploskon, E., Arthur, C.J., Evans, S.E., Williams, C., Crosby, J., Simpson, T.J., and Crump, M.P. (2008) A mammalian type I fatty acid synthase acyl carrier protein domain does not sequester acyl chains. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 518-528.
- Rausch, C., Weber, T., Kohlbacher, O., Wohlleben, W., and Huson, D.H. (2005) Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) using transductive support vector machines (TSVMs). *Nucleic Acids Research* *33*, 5799-5808.
- Reger, A.S., Carney, J.M., and 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., and 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.
- Reichmann, N.T., Cassona, C.P., and Grundling, A. (2013) Revised mechanism of D-alanine incorporation into cell wall polymers in Gram-positive bacteria. *Microbiology-Sgm* *159*, 1868-1877.
- Reuter, K., Mofid, M.R., Marahiel, M.A., and Ficner, R. (1999) Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme Sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily. *Embo Journal* *18*, 6823-6831.
- Rock, C.O., and Garwin, J.L. (1979) Preparative Enzymatic-Synthesis and Hydrophobic Chromatography of Acyl-Acyl Carrier Protein. *Journal of Biological Chemistry* *254*, 7123-7128.

- Roujeinikova, A., Baldock, C., Simon, W.J., Gilroy, J., Baker, P.J., Stuitje, A.R., Rice, D.W., Slabas, A.R., and Rafferty, J.B. (2002) X-ray crystallographic studies on butyryl-ACP reveal flexibility of the structure around a putative acyl chain binding site. *Structure* *10*, 825-835.
- Samel, S.A., Schoenafinger, G., Knappe, T.A., Marahiel, M.A., and Essen, L.O. (2007) Structural and functional insights into a peptide bond-forming bidomain from a nonribosomal peptide synthetase. *Structure* *15*, 781-792.
- Schmelz, S., and Naismith, J.H. (2009) Adenylate-forming enzymes. *Current Opinion in Structural Biology* *19*, 666-671.
- Sharma, A.K., Sharma, S.K., Surolia, A., Surolia, N., and Sarma, S.P. (2006) Solution structures of conformationally equilibrium forms of holo-acyl carrier protein (PfACP) from *Plasmodium falciparum* provides insight into the mechanism of activation of ACPs. *Biochemistry* *45*, 6904-6916.
- Shockman, G.D., DaneoMoore, L., Kariyama, R., and Massidda, O. (1996) Bacterial walls, peptidoglycan hydrolases, autolysins, and autolysis. *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease* *2*, 95-98.
- Smith, D.P., Knapman, T.W., Campuzano, I., Malham, R.W., Berryman, J.T., Radford, S.E., and Ashcroft, A.E. (2009) Deciphering drift time measurements from travelling wave ion mobility spectrometry-mass spectrometry studies. *European Journal of Mass Spectrometry* *15*, 113-130.
- Smith, S., and Tsai, S.C. (2007) The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Natural Product Reports* *24*, 1041-1072.
- Spolar, R.S., Livingstone, J.R., and Record, M.T. (1992) Use of Liquid-Hydrocarbon and Amide Transfer Data to Estimate Contributions to Thermodynamic Functions of Protein Folding from the Removal of Nonpolar and Polar Surface from Water. *Biochemistry* *31*, 3947-3955.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D., and Marahiel, M.A. (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & Biology* *6*, 493-505.
- Stevens, B.W., Lilien, R.H., Georgiev, I., Donald, B.R., and Anderson, A.C. (2006) Redesigning the PheA domain of gramicidin synthetase leads to a new understanding of the enzyme's mechanism and selectivity. *Biochemistry* *45*, 15495-15504.
- Strieker, M., Tanovic, A., and Marahiel, M.A. (2010) Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Current Opinion in Structural Biology* *20*, 234-240.
- Sturtevant, J.M. (1977) Heat-Capacity and Entropy Changes in Processes Involving Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *74*, 2236-2240.
- Sundlov, J.A., Shi, C., Wilson, D.J., Aldrich, C.C., and Gulick, A.M. (2012) Structural and functional investigation of the intermolecular interaction between NRPS adenylation and carrier protein domains. *Chem.Biol.* *19*, 188-198.
- Swoboda, J.G., Campbell, J., Meredith, T.C., and Walker, S. (2010) Wall Teichoic Acid Function, Biosynthesis, and Inhibition. *Chembiochem* *11*, 35-45.
- Tanovic, A., Samel, S.A., Essen, L.O., and Marahiel, M.A. (2008) Crystal structure of the termination module of a nonribosomal peptide synthetase. *Science* *321*, 659-663.
- Tellgmann, G. (1998) Messung der Reaktionsenthalpie von Teilreaktionen der visuellen Kaskade. Dissertation.
- Tellinghuisen, J. (2008) Isothermal titration calorimetry at very low c. *Analytical Biochemistry* *373*, 395-397.
- Thwaites, J.J., and Mendelson, N.H. (1991) Mechanical-Behavior of Bacterial-Cell Walls. *Advances in Microbial Physiology* *32*, 173-222.

- Volkman, B.F., Zhang, Q.Y., Debabov, D.V., Rivera, E., Kresheck, G.C., and Neuhaus, F.C. (2001) Biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid: The tertiary structure of apo-D-alanyl carrier protein. *Biochemistry* *40*, 7964-7972.
- Ward, J.B. (1981) Teichoic and Teichuronic Acids - Biosynthesis, Assembly, and Location. *Microbiological Reviews* *45*, 211-243.
- Weber, T., Baumgartner, R., Renner, C., Marahiel, M.A., and Holak, T.A. (2000) Solution structure of PCP, a prototype for the peptidyl carrier domains of modular peptide synthetases. *Structure with Folding & Design* *8*, 407-418.
- Wecke, J., Madela, K., and Fischer, W. (1997) The absence of D-alanine from lipoteichoic acid and wall teichoic acid alters surface charge, enhances autolysis and increases susceptibility to methicillin in *Bacillus subtilis*. *Microbiology-Uk* *143*, 2953-2960.
- Wecke, J., Perego, M., and Fischer, W. (1996) D-alanine deprivation of *Bacillus subtilis* teichoic acids is without effect on cell growth and morphology but affects the autolytic activity. *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease* *2*, 123-129.
- Weidenmaier, C., Kokai-Kun, J.F., Kristian, S.A., Chanturiya, T., Kalbacher, H., Gross, M., Nicholson, G., Neumeister, B., Mond, J.J., and Peschel, A. (2004) Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nature Medicine* *10*, 243-245.
- Weissman, K.J., and Muller, R. (2008) Protein-protein interactions in multienzyme megasynthetases. *Chembiochem* *9*, 826-848.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F., and Lin, L.N. (1989) Rapid Measurement of Binding Constants and Heats of Binding Using A New Titration Calorimeter. *Analytical Biochemistry* *179*, 131-137.
- Woessner, D.E. (1996) Brownian motion and its effects in NMR chemical exchange and relaxation in liquids. *Concepts in Magnetic Resonance* *8*, 397-421.
- Wong, H.C., Liu, G.H., Zhang, Y.M., Rock, C.O., and Zheng, J. (2002) The solution structure of acyl carrier protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry* *277*, 15874-15880.
- Xia, G.Q., Kohler, T., and Peschel, A. (2010) The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology* *300*, 148-154.
- Xie, D., and Freire, E. (1994) Structure-Based Prediction of Protein-Folding Intermediates. *Biophysical Journal* *66*, A180.
- Xu, G.Y., Tam, A., Lin, L., Hixon, J., Fritz, C.C., and Powers, R. (2001) Solution structure of B-subtilis acyl carrier protein. *Structure* *9*, 277-287.
- Yonus, H., Neumann, P., Zimmermann, S., May, J.J., Marahiel, M.A., and 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.
- Yother, J. (2011) Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and Other Bacteria: Paradigms for Polysaccharide Biosynthesis and Regulation. *Annual Review of Microbiology*, Vol 65 *65*, 563-581.
- Zettler, J., and Mootz, H.D. (2010) Biochemical evidence for conformational changes in the cross-talk between adenylation and peptidyl-carrier protein domains of nonribosomal peptide synthetases. *Febs Journal* *277*, 1159-1171.
- Zhang, Y.M., Wu, B.N., Zheng, J., and Rock, C.O. (2003) Key residues responsible for acyl carrier protein and beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase (FabG) interaction. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 52935-52943.

Zimmermann, S. Strukturelle Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen DltA und DltC. 2011.
Ref Type: Thesis/Dissertation

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

Abkürzungsverzeichnis

A-Domäne	Adenylierungs-Domäne
ACP	<i>acyl carrier protein</i>
AMP	Adenosin 5'-Monophosphat
AMPCPP	α,β -Methylenadenosin 5'-Triphosphat
AMPNPP	Adenosine-5'-[(α,β)imido]-Triphosphate
ADP	Adenosin 5'-Diphosphat
AP ₄ A	AMP-P-P-AMP
<i>apo</i> -DltC	DltC ohne 4'Phosphopantethein-Cofaktor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASA	<i>accessible surface area</i>
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
Bis-Tris-Propan	1,3-Bis(tris(hydroxymethyl)-methylaminopropan)
C ₅₅ -P	Undecaprenyl-Phosphat
4-CBA	4-Chlorbenzyl-CoA
CCS	<i>collision cross section</i>
CD	Cirkulardichroismus
C-Domäne	Kondensations-Domäne
Co A	Coenzym A
DltA _N	große Domäne von DltA
DltA RR	DltA E125R/E128R
DltA RW	DltA E125R/E128W
DltC A3	DltC Q5A/D9A/N48A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5',5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
E	Enzym
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
E-Domäne	Epimerisierungsdomäne
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	<i>electrospray ionisation</i>
FAS	<i>fatty acid syntethase</i>
FPLC	<i>fast performance liquid chromatography</i>
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HF	<i>high fidelity</i>
<i>holo</i> -DltC	DltC mit 4'Phosphopantethein-Cofaktor
HP	<i>high performance</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>

HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i>
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalacto-pyranosid
L	Ligand
LB	Luria Bertoni
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MPD	2-Methyl-2,3-pentandiol
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
NEB	New England Biolabs
NMR	<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>
NRP	nicht-ribosomales Peptid
NRPS	Nicht-ribosomale-Peptid-Synthase
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
P	Protein oder Produkt
PAGE	<i>polyacrylamid gelelectrophoresis</i>
PCP	<i>peptidyl carrier protein</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	<i>protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
PKS	Polyketid-Synthase
PPant	4'-Phosphopantethein
rpm	<i>rotations per minute</i>
S	Substrat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TE-Domäne	Thioesterase-Domäne
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TROSY	<i>Transverse relaxation optimized spectroscopy</i>
wt	Wildtyp

Anhang

Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Acetonitril	Roth, Karlsruhe
Acrylamid (Rotiphorese)	Roth, Karlsruhe
Adenosin 5'-Monophosphat (Na-Salz)	Fluka, Steinheim
Adenosin 5'-Diphosphat (Na-Salz)	AppliChem, Darmstadt
Adenosin 5'-Triphosphat (Na-Salz)	Fluka, Steinheim
α,β -Methylenadenosin 5'-Triphosphat	Jena Bioscience, Jena
Agar	AppliChem, Darmstadt
Agarose	Roth, Karlsruhe
D-Alanin	Fluka, Steinheim
Ameisensäure	Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid (^{14}N)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidisulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Bis-Tris-Propan	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Cobalt(II)-chlorid	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blau R250	Merck, Darmstadt
5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol	AppliChem, Darmstadt
Eisen(III)-citrat	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	VWR; Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
α -D-Glukose Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Glutathion (oxidiert)	AppliChem, Darmstadt
Glutathion (reduziert)	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Guanidin Hydrochlorid	NIGU Chemie, Waldkraiburg
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kupfer(II)-chlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Mangan(II)-chlorid	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe

Natriummolybdat	Roth, Karlsruhe
Natriumselenit	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumthiosulfat	Roth, Karlsruhe
Nickel(II)-chlorid	Roth, Karlsruhe
Propan-2-ol	VWR; Darmstadt
Salzsäure	VWR; Darmstadt
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe
Tetrabutylammoniumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	Roth, Karlsruhe
Triethylammoniumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Trypton	Roth, Karlsruhe
Zink(II)-sulfat	Roth, Karlsruhe

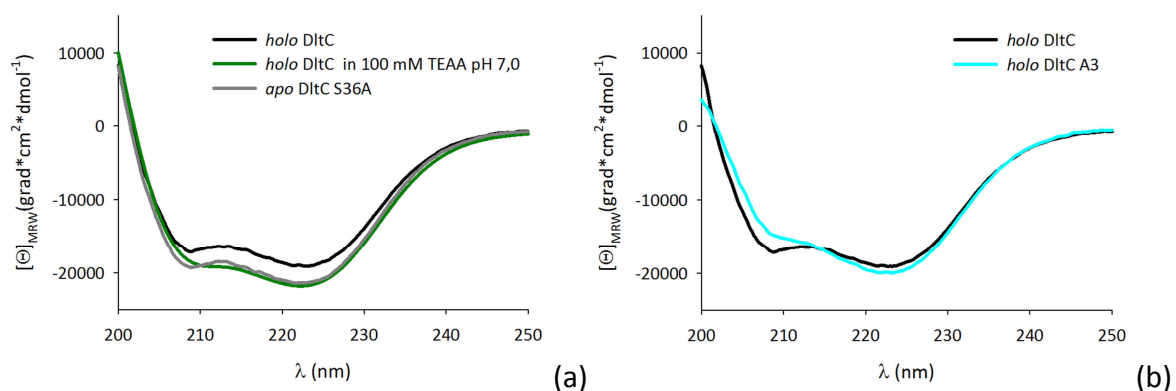
Tabelle 0.1 verwendete Chemikalien

Spektroskopische Analyse der Proteinvarianten

Zur Analyse, ob die Protein-Varianten DltC S36A, DltC S36C, DltC A3, DltC S36A A3, DltA RW, DltA RR, DltA E125C sowie die isolierte große Domäne des DltA strukturell den Wildtyp Proteinen entsprechen wurden CD- sowie 1D-NMR-spektroskopische Messungen durchgeführt.

CD-Spektroskopie

Zum Vergleich der Sekundärstrukturen wurden fern-UV-CD-Spektren im Bereich von 200-250 nm aufgenommen (Abbildung 0.1). Die Konzentration der eingesetzten Proteine betrug 1 mg/ml. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Messungen in 50 mM HEPES/NaOH, 150 mM NaCl, 2 mM TCEP, pH 7,8 bei 25°C durchgeführt. Als weitere Bedingung wurde 100 mM TEAA (Triethylammoniumacetat) pH 7,0 verwendet, da dieses bei der nativen Massenspektrometrie eingesetzt wurde.



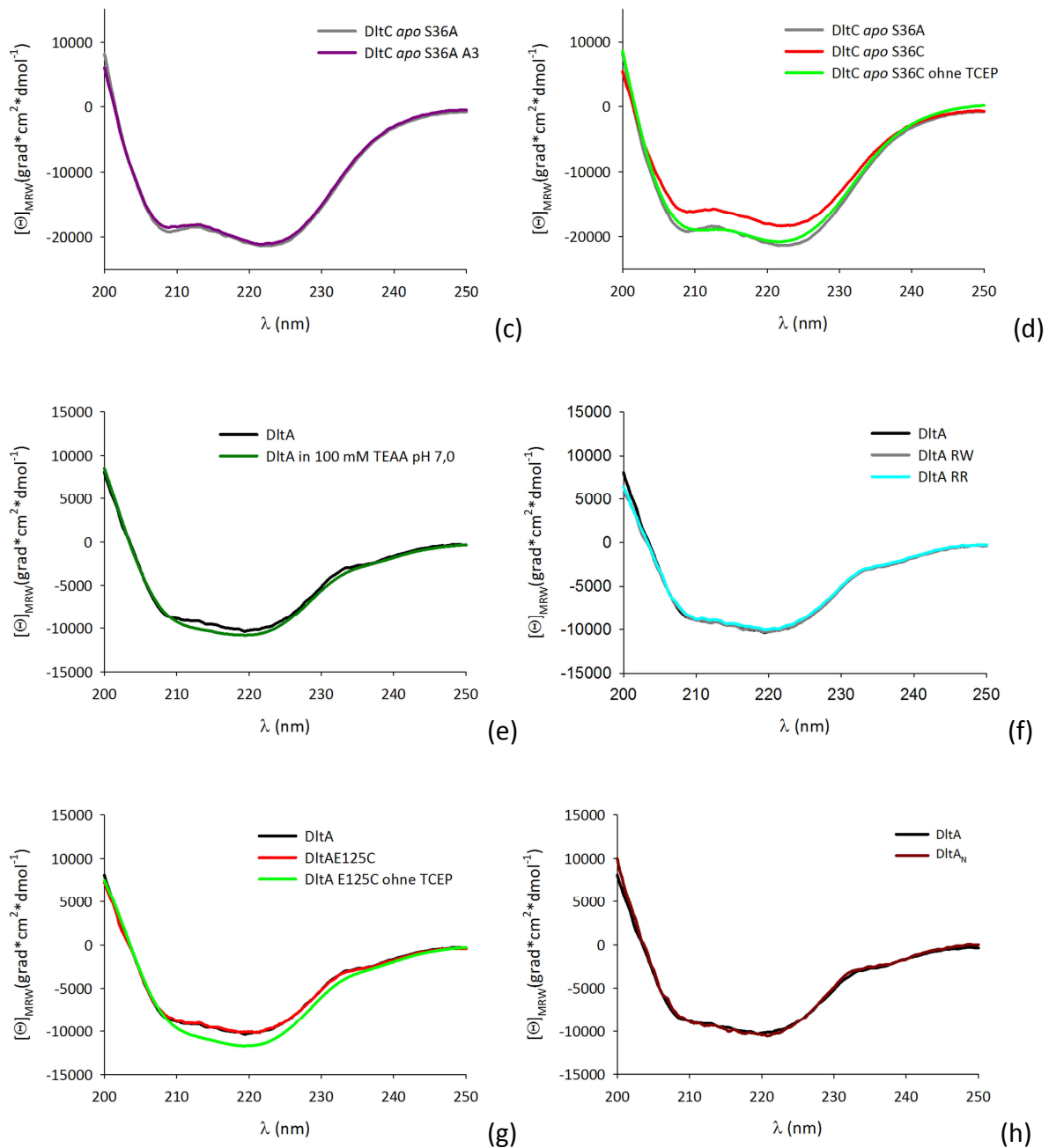
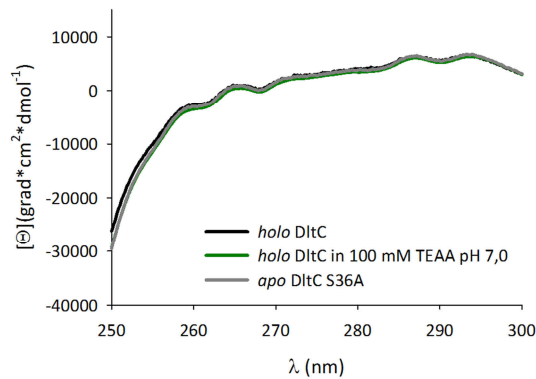


Abbildung 0.1 Fern-UV CD-Spektren von DltC-Varianten (a-d) und DltA-Varianten (e-h).

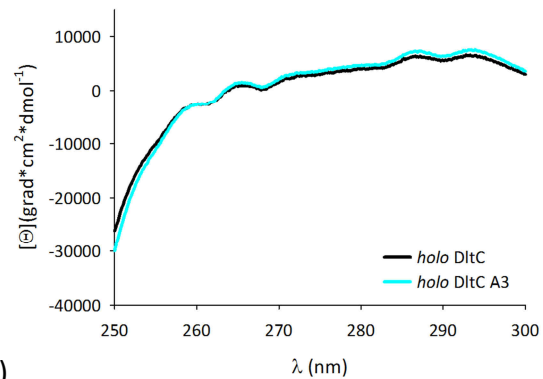
Es ist ersichtlich, dass die in DltA inserierten Mutationen keine signifikanten Änderungen der Sekundärstrukturen bewirken. Die große Domäne des DltA (DltA_N) weist ebenfalls den gleichen Anteil an Sekundärstrukturelementen wie der Wildtyp auf. Mit Ausnahme von *holo*-DltC A3 können für die DltC-Varianten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Bei der Variante *holo*-DltC A3 kommt es zu einer kleinen Amplitudenänderung des Extremums bei 208 nm, was auf eventuelle konformationelle Änderungen zurückgeführt werden kann. Sowohl die Variante DltA E125C als auch die Variante *apo*-DltC S36C weisen unter nicht-reduzierenden Bedingungen ebenfalls die Amplitudenänderung bei 208 nm im Fern-UV-CD-Spektrum auf, was auf die Ausbildung von Disulfidbrücken und die dadurch

mögliche Änderung der Sekundärstruktur zurückgeführt werden kann. Der gleiche Effekt wird durch die Änderung des Puffers zu 100 mM TEAA pH 7,0 beobachtet.

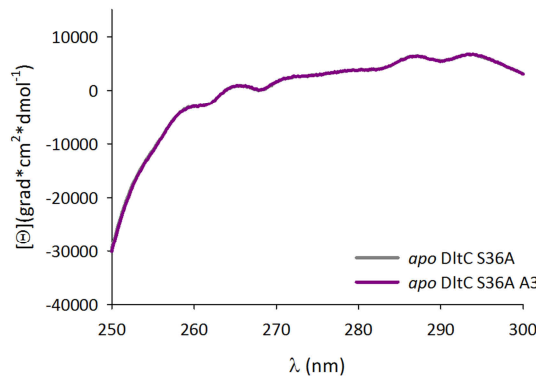
Nah-UV-CD-Spektren liefern Aussagen über die chemische Umgebung aromatischer Aminosäuren und können demzufolge ebenfalls zum Vergleich der Proteinvarianten herangezogen werden (Anhang Abbildung 0.2). Es wurden die gleichen Konzentrationen und Puffer wie für die Aufnahme der fern-UV-CD-Spektren verwendet.



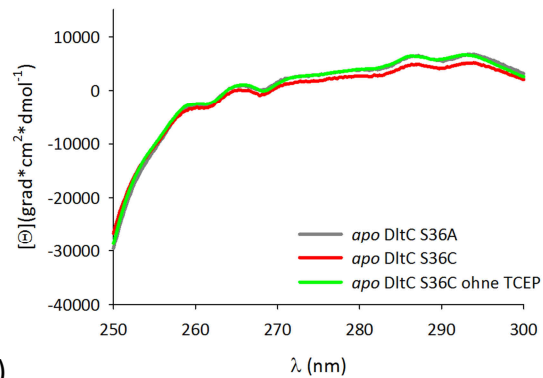
(a)



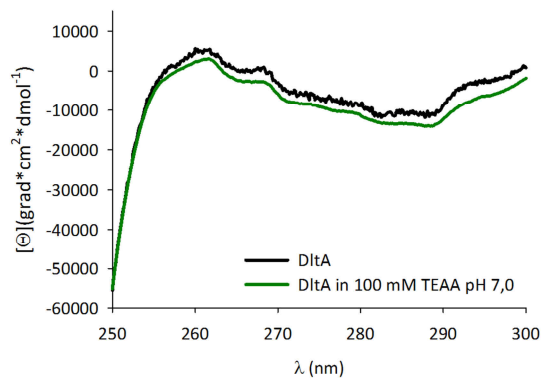
(b)



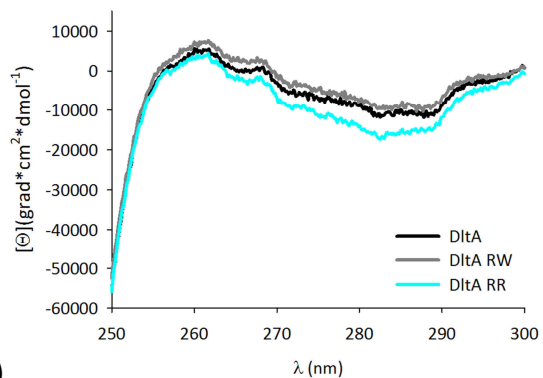
(c)



(d)



(e)



(f)

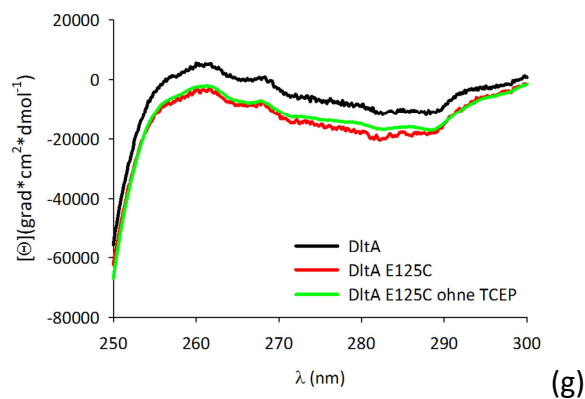


Abbildung 0.2 Nah-UV-CD-Spektren von DltC-Varianten (a-d) und DltA-Varianten (e-g).

Signale im Bereich von 255-279 nm können dem Phenolring des Phenylalanins, von 275-285 nm dem Hydroxyphenylring des Tyrosins und von 285-305 nm dem Indolring des Tryptophans zugeordnet werden. Signale von Disulfidbrücken erstrecken sich über den gesamten gemessenen Bereich. Die Nah-UV-Spektren der Varianten von DltC und DltA weisen, mit Ausnahme von der Variante DltA E125C, im aufgenommenen Bereich keine signifikanten Abweichungen auf. Dort kann eine Signalinversion beobachtet werden. Da die Inversion auch unter reduzierenden Bedingungen beobachtet werden konnte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Mutation strukturelle Änderungen verursacht wurden.

¹H-NMR-Spektroskopie

Protonen-Resonanz-Spektren von Proteinen lassen aufgrund der limitierten Auflösung keine direkte Zuordnung einzelner Resonanzlinien zu. Das ¹H-Resonanzspektrum ist jedoch charakteristisch für jedes Protein, so dass Strukturvergleiche zwischen Wildtyp und Varianten möglich sind. Typische Resonanzbereiche sind Tabelle 0.2 in zusammengefasst.

Strukturelement	Chemische Verschiebung (ppm)
CH ₃ -	-0,5-1
Hβ/-CH ₂ -	1,5-4
Hα	3,5-5
NH-	6-9,5
aromatische Aminosäuren	7-9

Tabelle 0.2 Chemische Verschiebungen von Strukturelementen in Proteinen.

Bei Analyse der Varianten DltA, DltA RW sowie DltA RR sind keine signifikanten Abweichungen zu erkennen (Abbildung 0.3).

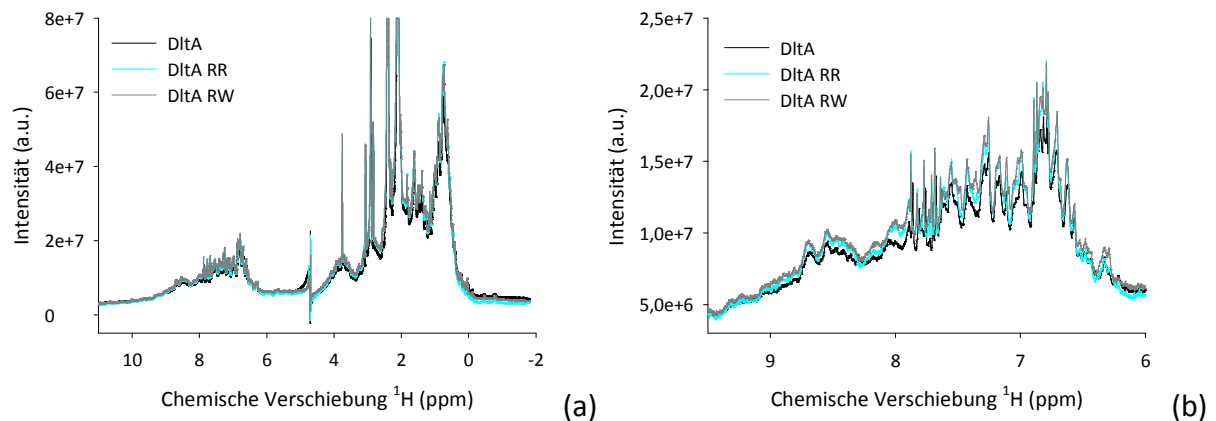


Abbildung 0.3 ^1H -Spektren von DltA. (a) Bereich 2-11 ppm (b) Detailansicht Bereich 6-10 ppm

Beim Vergleich der Varianten *holo*-DltC, *holo*-DltC A3 und *apo*-DltC S36A im Bereich zwischen 6-9,5 ppm sind deutlichere Unterschiede zu erkennen, die sowohl die Intensitätsverhältnisse, als auch die chemische Verschiebung der Peaks betreffen (Abbildung 0.4). Diese Abweichungen können jedoch nicht den Proton-Resonanzen der Seitenketten der ausgetauschten Aminosäuren zugeordnet werden. Vor allem bei *holo* DltC A3 sind deutliche Unterschiede im Vergleich zu *holo* DltC zu erkennen, die auf eine Änderung der chemischen Umgebung des Proteinerückgrates zurückgeführt werden können.

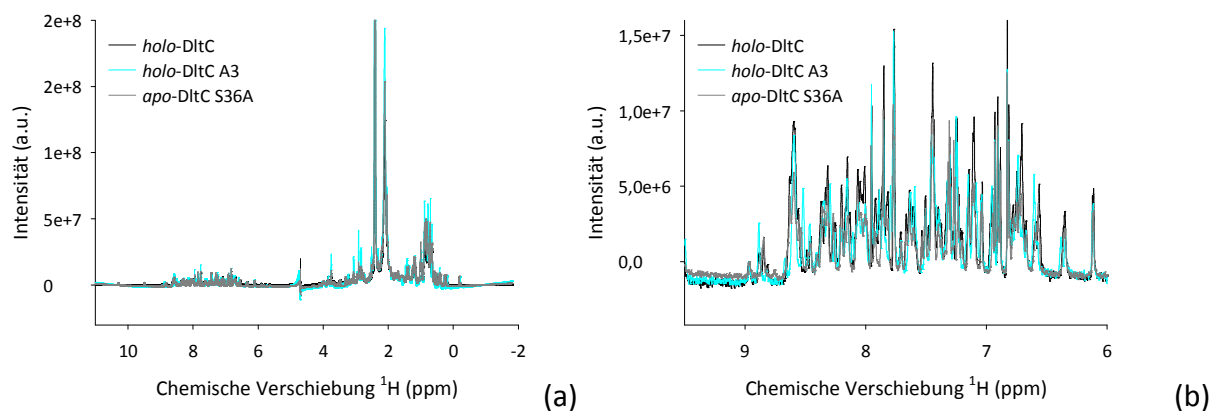


Abbildung 0.4 ^1H -Spektren von DltC. (a) Bereich -2-11 ppm (b) Detailansicht Bereich 6-10 ppm.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mittels CD- und ^1H -NMR-Spektroskopie mit Ausnahme der Varianten DltC A3 und DltA E125C keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und Varianten beobachtet werden kann, so dass von deren strukturellen Integrität ausgegangen werden kann.

Analyse der frei-zugänglichen Thiolgruppen

In der Kristallstruktur des *holo*-DltC (pdb-Code 4BPH, (Zimmermann, 2011)) konnte die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den 4'-Phosphopantethein-Cofaktoren von zwei benachbarten *holo*-DltC-Molekülen beobachtet werden. Zur Analyse, ob in Lösung unter nicht-reduzierenden Bedingungen intermolekulare Disulfidbrücken ausgebildet werden

können, wurde die Zugänglichkeit der freien Thiolgruppen von *holo*-DltC, *apo*-DltC S36A sowie DltA mittels Ellman-Test (Abbildung 2.1) ermittelt. Die eingesetzten Proteinkonzentrationen betragen dabei 20 μ M, 60 μ M sowie 10 μ M. Die Ergebnisse sind in zusammengefasst

Protein	Anzahl Thiolgruppen	Anzahl ermittelter Thiolgruppen
<i>holo</i> -DltC	2	0,7 (1)
<i>holo</i> -DltC (reduziert)	2	1,8 (2)
<i>apo</i> -DltC S36A	1	1,0 (1)
DltA	6	6,4 (6)

Tabelle 0.3 Zusammenfassung der ermittelten freien Thiolgruppen nach ELLMAN.

Obwohl der 4'-Phosphopantethein-Cofaktor von *holo*-DltC ebenfalls eine Thiolgruppe besitzt, wurde unter nicht-reduzierenden Bedingungen die gleiche Anzahl an Thiolgruppen wie bei der Cofaktor-freien Variante *apo*-DltC S36A detektiert. Nach Inkubation von *holo*-DltC in 2 mM DTT und anschließender Abtrennung des Reduktionsmittels über 5x5 ml *desalting*-Säulen konnten nach ELLMAN jedoch zwei freie Thiolgruppen bestimmt werden. Eine Dimerisierung in Lösung über die 4'-Phosphopantethein-Cofaktoren kann daher vermutet werden kann. Mittels ESI-Massenspektrometrie-Analyse konnte zudem das Vorkommen von *holo*-DltC-Dimeren beobachtet werden (Abbildung 0.6).

Massenspektrometrische Analyse

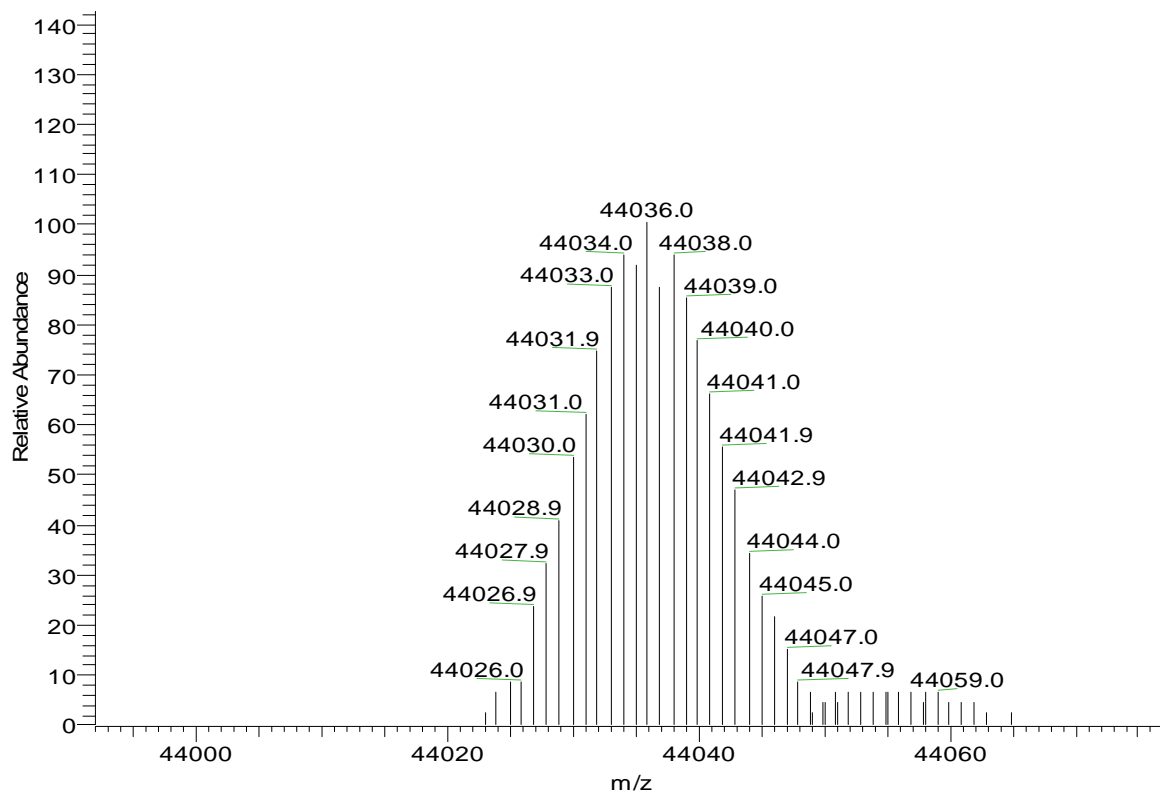


Abbildung 0.5 ESI-MS von DltA nach tryptischem Verdau. Die theoretische Masse des Fragmentes nach Spaltung von Lys402 beträgt 44036 Da.

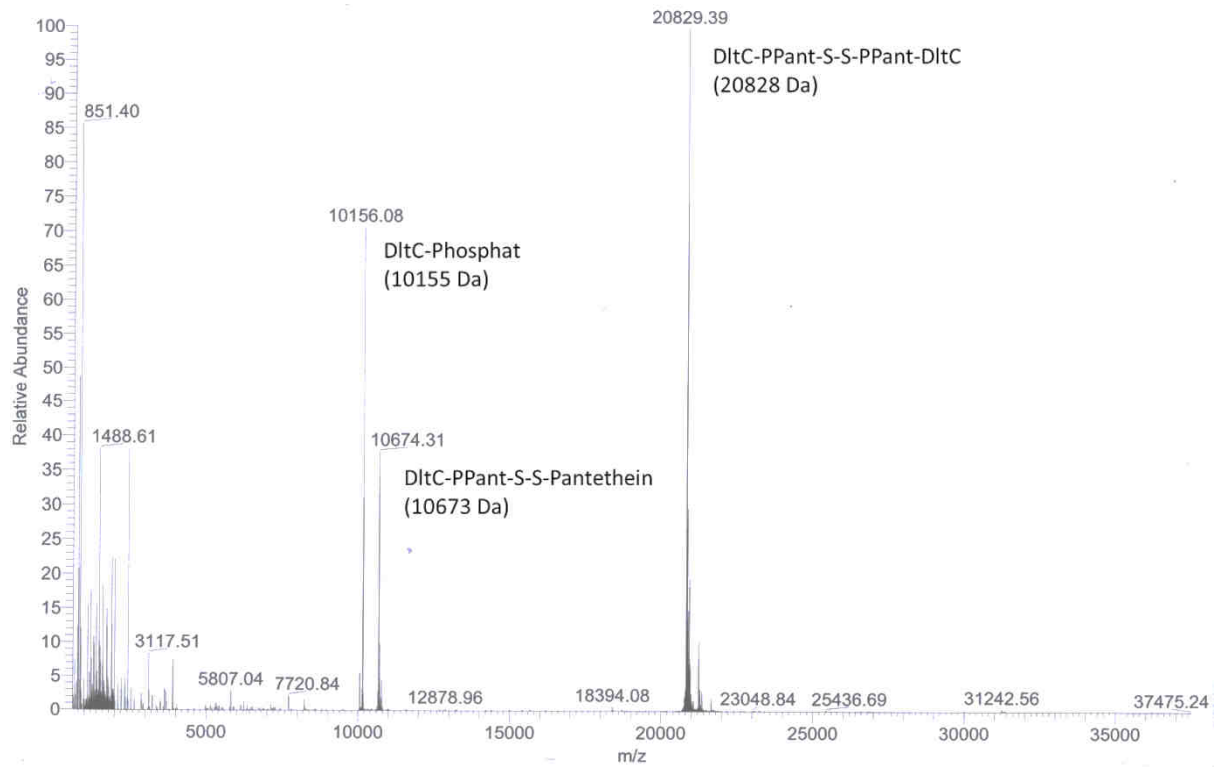
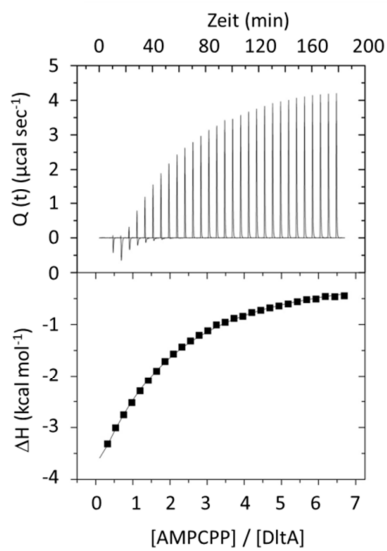
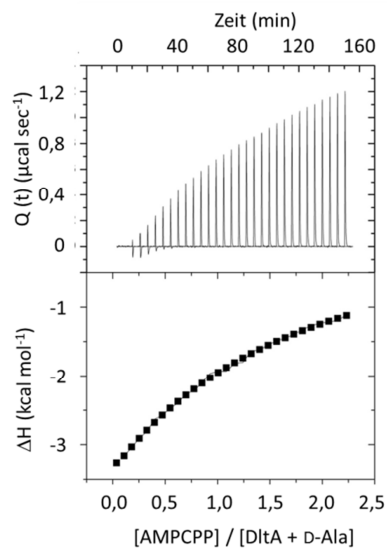


Abbildung 0.6 *holo*-DltC ESI-MS. Die theoretischen Massen der Varianten von *holo*-DltC sind in der Abbildung dargestellt.

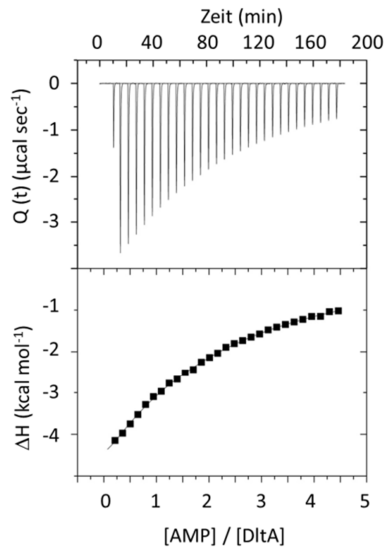
Isothermale Titrationskalorimetrie



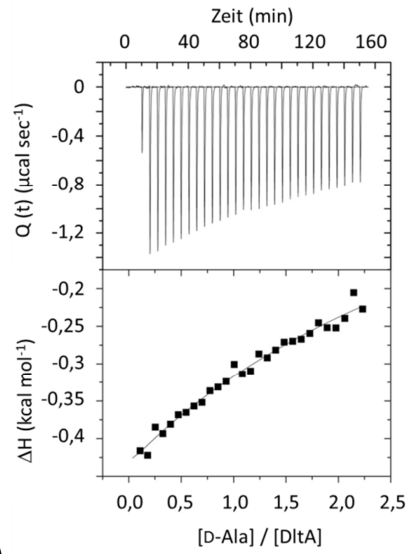
(a)



(b)

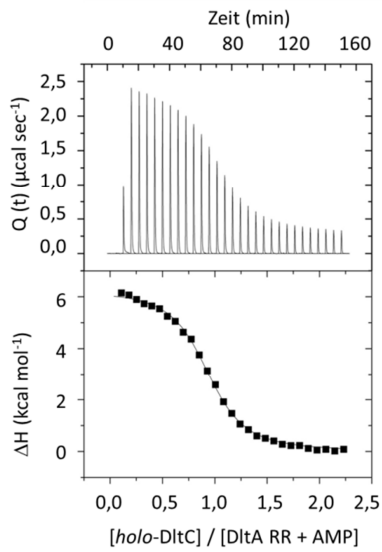


(c)

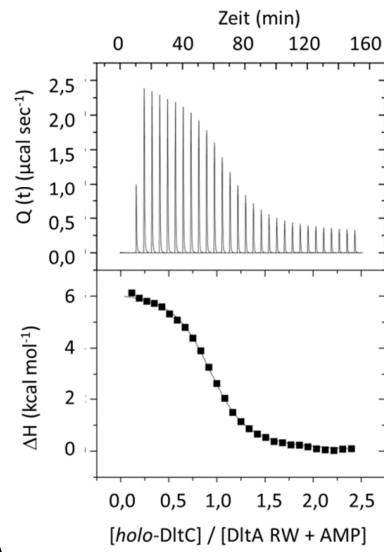


(d)

Abbildung 0.7 ITC-Experimente der Titration von Liganden zu DltA. (a) Titration von AMPCPP zu DltA. (b) Titration von APCPP zu DltA in Anwesenheit von 3 mM D-Ala. (c) Titration von AMP zu DltA. (d) Titration von D-Ala zu DltA.



(a)



(b)

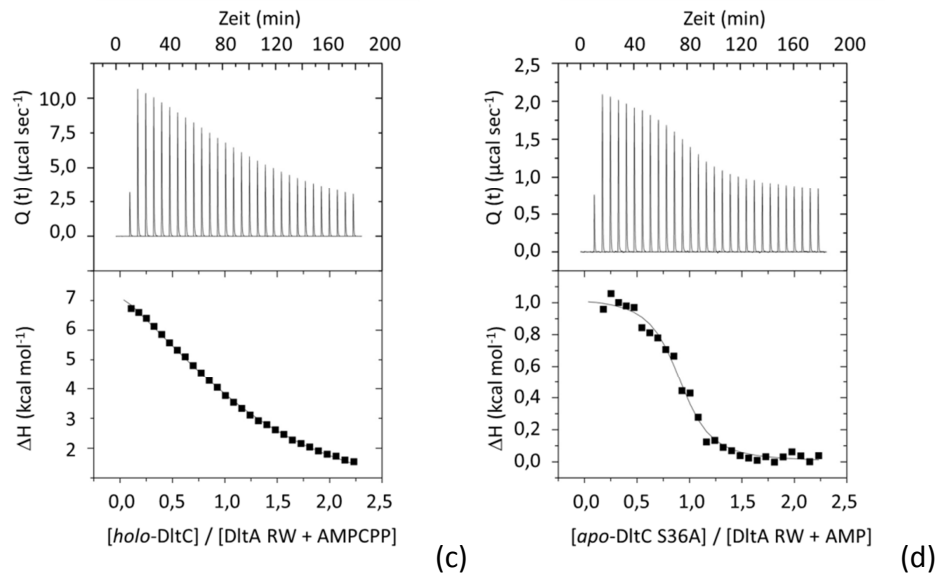


Abbildung 0.8 ITC-Experimente: Titration von DltC zu DltA RR oder RW. Alle Experimente wurden bei 298,15 K in 50 mM HEPES/NaOH, 150 mM NaCl, 2 mM TCEP, 10 mM MgCl₂, pH 7,8 mit 3 mM AMP oder 1 mM AMPCPP durchgeführt. (a) *holo*-DltC titriert zu DltA RR+AMP. (b) *holo*-DltC titriert zu DltA RW+AMP. (c) *holo*-DltC titriert zu DltA RW+AMPCPP. (d) *apo*-DltC S36A titriert zu DltA RW+AMP.

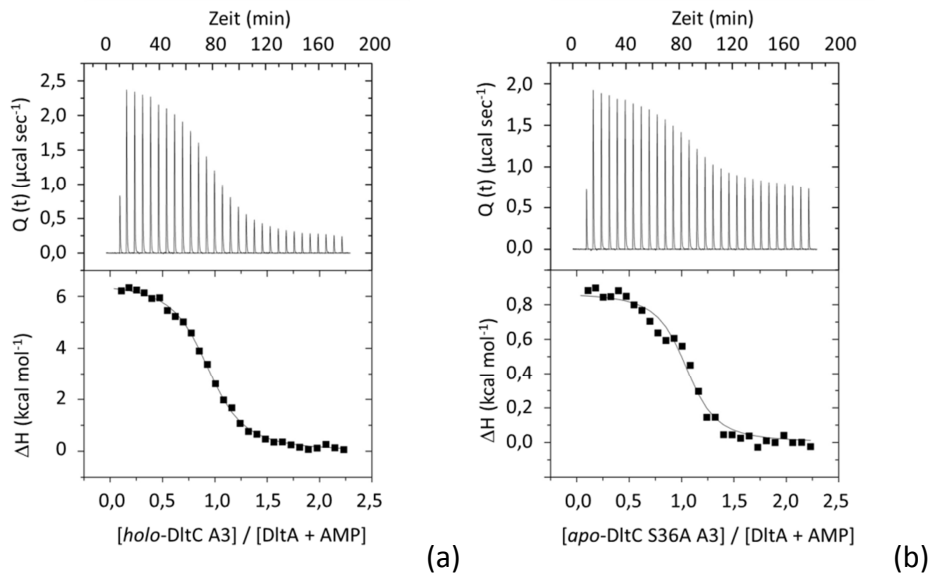
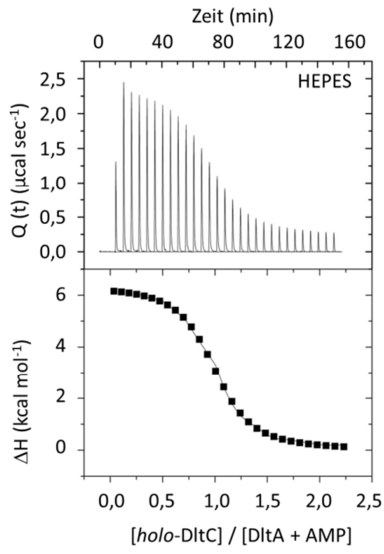
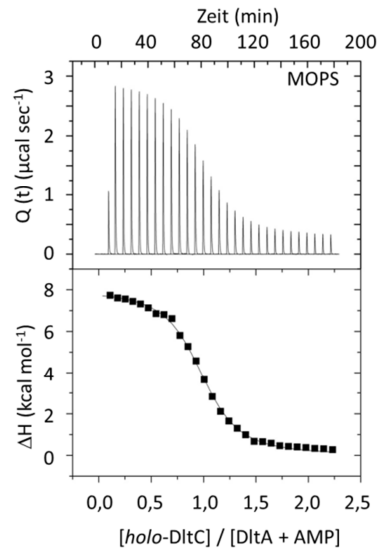


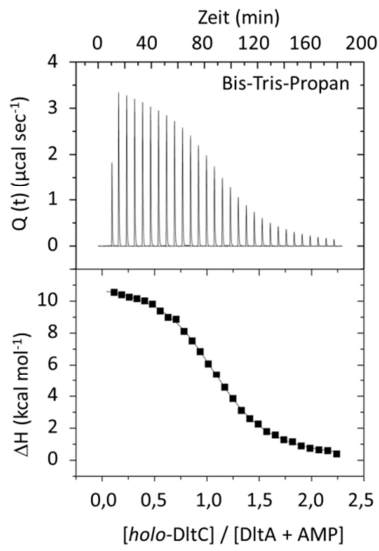
Abbildung 0.9 ITC-Experimente: Titration von *holo*-DltC A3 oder *apo*-DltC S36A A3 zu DltA. Alle Experimente wurden bei 298,15 K in 50 mM HEPES pH 7,8, 150 mM NaCl, 2 mM TCEP, 10 mM MgCl₂ und 3 mM AMP durchgeführt.



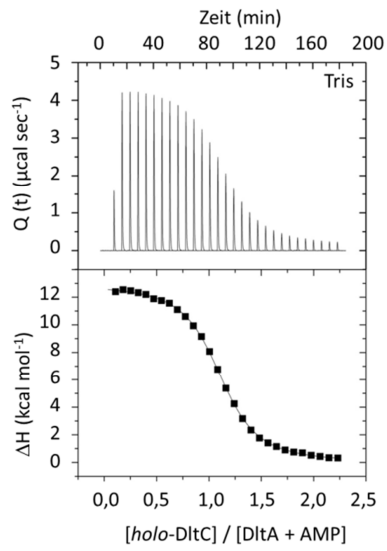
(a)



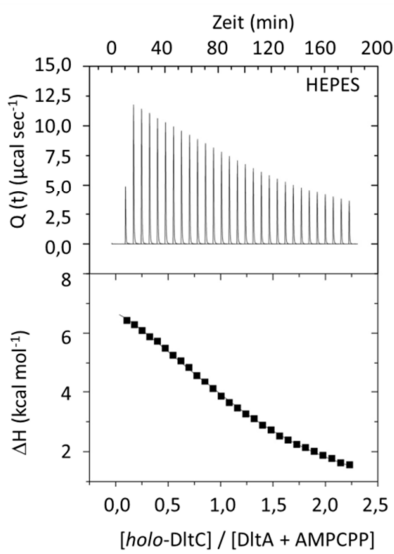
(b)



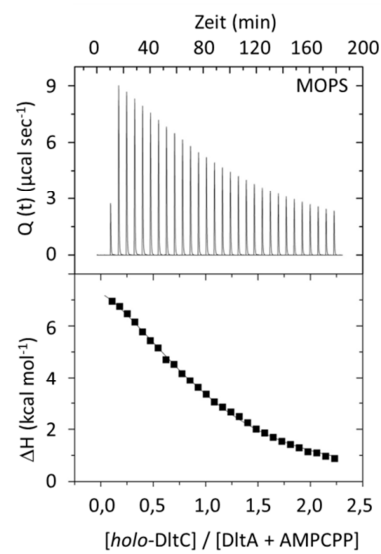
(c)



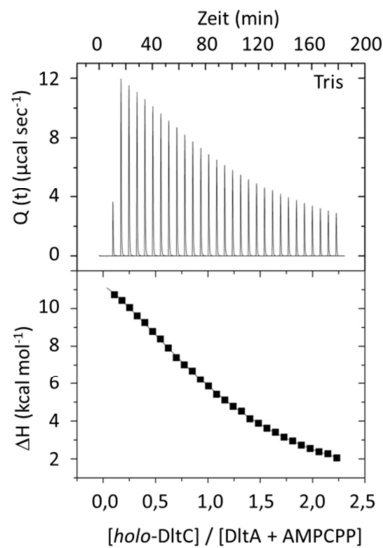
(d)



(e)

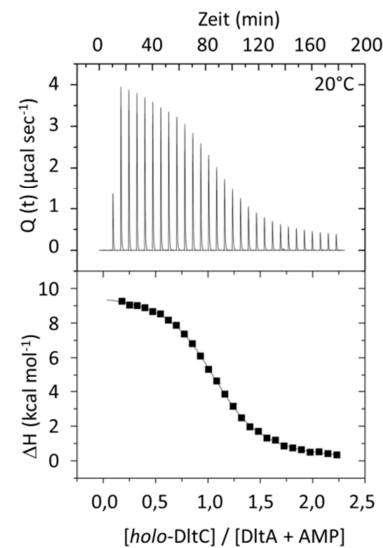


(f)

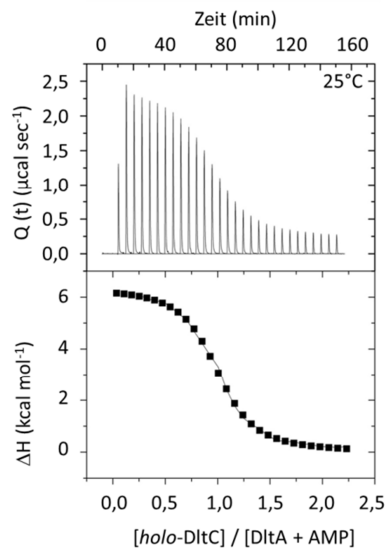


(g)

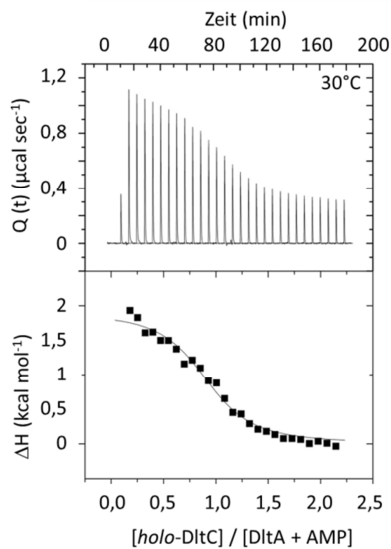
Abbildung 0.10 ITC-Experimente: Titration von *holo* DltC zu DltA in verschiedenen Puffern. Alle Experimente wurden bei 298,15 K in 50 mM des jeweiligen Puffer (pH 7,8) 150 mM NaCl, 2 mM TCEP, 10 mM MgCl₂, 3 mM AMP oder 2 mM AMPCPP durchgeführt (a-d): *holo* DltC zu DltA (AMP) (a) in HEPES (b) in MOPS (c) in Bis-Tris-Propan (d) in Tris/HCl (e-g) *holo* DltC zu DltA (AMPCPP) (e) in HEPES (f) in MOPS (g) in Tris/HCl.



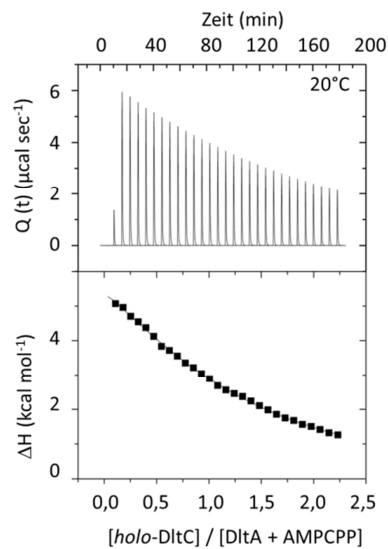
(a)



(b)



(c)



(d)

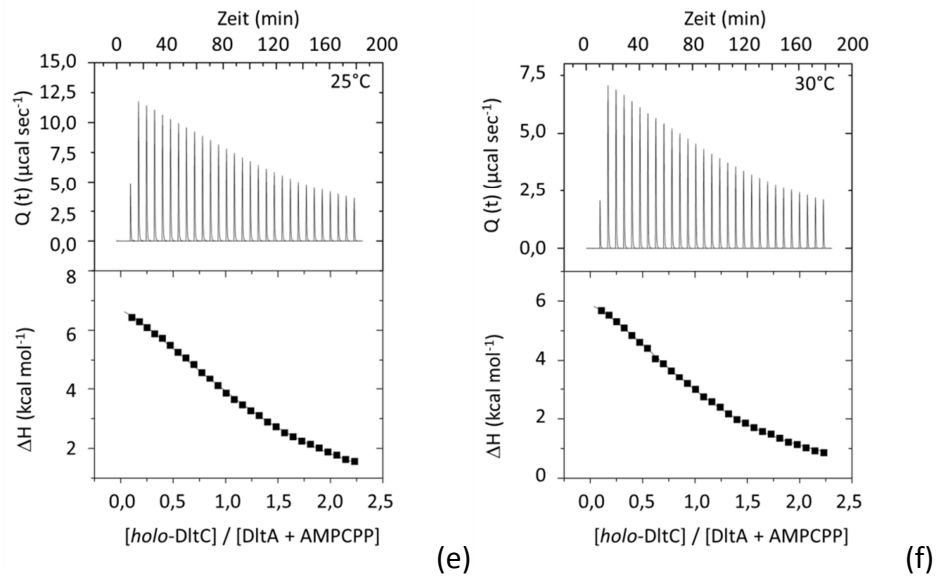


Abbildung 0.11 **Titration von *holo-DltC* zu *DltA* bei verschiedenen Temperaturen.** Alle Experimente wurden in 50 mM HEPES pH 7,8, 150 mM NaCl, 2 mM TCEP, 10 mM $MgCl_2$, 3 mM AMP oder 2 mM AMPCPP durchgeführt. **(a-c) *holo-DltC* und *DltA* + AMP.** (a) 20°C. (b) 25°C. (c) 30°C. **(d-f) *holo-DltC* und *DltA* + AMPCPP.** (d) 20°C. (e) 25°C. (f) 30°C.

Eigene Publikationen

Kattner, C., Pfennig S., Massari, P., Tanabe, M. (2015), One-Step Purification and Porin Transport Activity of the Major Outer Membrane Proteins P2 from *Haemophilus influenzae*, FomA from *Fusobacterium nucleatum* and PorB from *Neisseria meningitides*, Appl Biochem Biotechnol. (accepted)

Herbst, S., Masada, N., Pfennig, S., Ihling, CH., Cooper, DM., Sinz A. (2013), Structural insights into calmodulin/adenylyl cyclase 8 interaction, Anal Bioanal Chem., 27, 405 (29):9333-42

Pfennig, S., and Stubbs, M.T. (2012), Flexing and stretching in nonribosomal Peptide synthetases, Chem.Biol. 19, 167-169.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Sabrina Pfennig

geboren am 03. Februar 1985 in Wolfen

Familienstand: ledig

Ausbildung

- | | |
|-----------------|--|
| Seit 01/ 2015 | wissenschaftliche Mitarbeiterin (PostDoc), Ludwig-Maximilians-Universität München, Adolf-Butenandt-Institut, Molekularbiologie, Arbeitsgruppe Dr. Felix Müller-Planitz |
| 03/2014-10/2014 | wissenschaftliche Mitarbeiterin (Elternzeitvertretung), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, „Zentrum für Innovationskompetenz“ HALOmem, Arbeitsgruppe Dr. Mikio Tanabe |
| 10/2009-02/2014 | wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Institut für Biochemie und Biotechnologie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Milton T. Stubbs

Thema: „Strukturelle und thermodynamische Charakterisierung der DltA-DltC-Interaktion und kinetische Analyse der DltA katalysierten D-Alanylierung des DltC“ |
| 10/2004-08/2009 | Studium der Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Abschluss: Diplom Biochemikerin
Thema der Diplomarbeit: „Expression und Reinigung von Ras und Ezrin(FERM) und Analyse ihrer Interaktion“
angefertigt an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Milton T. Stubbs |
| 06/2004 | Abitur, Anne-Frank Gymnasium Sandersdorf |

Eidesstattliche Erklärung

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

„Strukturelle und thermodynamische Charakterisierung der DltA-DltC-Interaktion und kinetische Analyse der DltA katalysierten D-Alanylierung des DltC“

selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Ich erkläre die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die vorliegende Dissertation an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Bewerbung eines Doktorgrades eingereicht zu haben.

Germering, 23.06.2015

Sabrina Pfennig

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde an der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg unter Leitung von Prof. Dr. Milton T. Stubbs angefertigt. Hiermit möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein großes Dankeschön gilt Prof. Dr. Milton T. Stubbs für das fortwährende Interesse an dem bearbeiteten Projekt, den Freiheiten in der Planung und Durchführung der Experimente sowie der Möglichkeit der Teilnahme an zahlreichen wissenschaftlichen Tagungen.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Ralph P. Golbik für das Interesse an meinem Projekt, der ständigen Diskussionsbereitschaft sowie der vielen hilfreichen und freundlichen Ratschläge.

Bei Dr. Michael Kovermann möchte ich mich für Durchführung der NMR-Experimente, der hilfreichen Diskussion sowie für die geduldige Beantwortung all meiner Fragen zum Thema NMR-Spektroskopie bedanken.

Bei Annika Butterer und Prof. Dr. Frank Sobott möchte ich mich für die Durchführung der nativen Massenspektrometrie-Experimente, der Diskussionsbereitschaft und der Gastfreundschaft bedanken. Es hat sehr viel Spaß gemacht und ich habe viel gelernt.

Ich möchte mich bei Dr. Constanze Breithaupt für die hilfreichen Tipps bei der Lösung der Kristallstrukturen und beim Anfertigen dieser Arbeit bedanken.

Ein großes Dankeschön gilt Pia Rosenburg, Uwe Fandrich, Cynthia Kaulbach, Matthias Schöpfer, Heidi Auerswald und Konstantin Schmidt, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andrea Sinz, insbesondere Dr. Sabine Herbst, Dr. Christian Ihling und Michael Zorn danke ich für die Durchführung der Massenspektrometrie-Analysen.

Ich möchte mich bei der Arbeitsgruppe für die Diskussionsbereitschaft bedanken. Ein besonderer Dank gilt Anja Greschuchna, Pia Rosenburg und Camila Cotrim für die schöne Arbeitsatmosphäre im Labor.

Ich danke allen Mitgliedern des GRK 1026 für die Diskussionsbereitschaft und für die schönen und interessanten Meetings. Ein großer Dank gilt dabei allen GRK-Koordinatoren für die Unterstützung.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern der Biotechnologie für die freundliche und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre und die schönen Kaffeepausen bedanken.

Der größte Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und vor allem Marco für die Unterstützung und aufmunternden Worte, insbesondere beim Anfertigen dieser Arbeit.

Danke!