

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Institut für Biochemie und Biotechnologie



**Strukturelle und biochemische Charakterisierung von  
O-Carbamoyltransferasen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

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

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Stefan Görlich

geboren am 12. August 1985 in Oschatz

Gutachter:

1. Prof Dr. Milton T. Stubbs
2. PD Dr. Stefan König
3. Prof. Dr. Uwe T. Bornscheuer

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.11. 2015

Wer neben den Wissenschaften noch andere Ergänzungen sucht,  
muß die wahre Süßigkeit derselben noch nicht geschmeckt haben.

- Gotthold Ephraim Lessing -

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>CARBAMOYLPHOSPHAT UND CARBAMOYLTRANSFERASEN</b>	<b>1</b>
1.1.1	N-CARBAMOYLTRANSFERASEN	3
1.1.2	O-CARBAMOYLTRANSFERASEN	5
1.1.2.1	TOBZ AUS <i>STREPTOALLOTEICHUS TENEBRARIUS</i>	6
1.1.3	S-CARBAMOYLTRANSFERASEN	10
<b>1.2</b>	<b>AMINOGLYKOSID-ANTIBIOTIKA (AGA)</b>	<b>12</b>
1.2.1	AGA-KLASSIFIZIERUNG UND AUFBAU	13
1.2.2	WIRKMECHANISMUS DER AGA	16
1.2.3	RESISTENZENTWICKLUNG GEGEN AGA	17
1.2.3.1	EXPRESSION AGA-MODIFIZIERENDER ENZYME	18
1.2.3.2	MODIFIZIERUNG DER 30S UNTEREINHEIT	19
1.2.3.3	VERÄNDERUNG DER AUFNAHME UND AUSSCHLEUß-MECHANISMEN	19
1.2.3.4	MEMBRANPROTEASEN	20
1.2.4	ENTWICKLUNG NEUER ANTIBIOTIKA	20
<b>1.3</b>	<b>AUSGANGSPUNKT DER ARBEIT UND ZIELSTELLUNG</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>24</b>
2.1.1	GERÄTE	24
2.1.2	CHEMIKALIEN	25
2.1.3	MEDIEN UND LÖSUNGEN	28
2.1.4	PUFFER	29
2.1.5	KITS	30
2.1.6	BAKTERIENSTÄMME UND PLASMIDE	30
2.1.7	OLIGONUKLEOTIDE	31
2.1.8	ENZYME UND STANDARDS	32

2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE UND MIKROBIOLOGISCHE METHODEN .....	33
2.2.1	PLASMIDPRÄPARATION UND SEQUENZIERUNG .....	33
2.2.2	BESTIMMUNG DER DNA-KONZENTRATION .....	33
2.2.3	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE .....	33
2.2.4	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR).....	34
2.2.5	ORTSGERICHTETE MUTAGENESE DER TOBZ-VARIANTEN.....	35
2.2.6	RESTRIKTIONSVERDAU .....	35
2.2.7	LIGATION VON DNA FRAGMENTEN.....	36
2.2.8	KOLONIE-PCR ZUM NACHWEIS DER ERFOLGREICHEN LIGATION .....	36
2.2.9	HERSTELLUNG CHEMOKOMPETENTER ZELLEN.....	37
2.2.9.1	HERSTELLUNG CHEMOKOMPETENTER <i>E. COLI</i> ZELLEN .....	37
2.2.9.2	HERSTELLUNG CHEMOKOMPETENTER <i>S. LIVIDANS TK 24</i> ZELLEN .....	37
2.2.10	TRANSFORMATION VON BAKTERIEN MIT PLASMID-DNA .....	38
2.2.10.1	TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i> ZELLEN .....	38
2.2.10.2	TRANSFORMATION VON <i>S. LIVIDANS TK 24</i> ZELLEN .....	38
2.3	PROTEINCHEMISCHE METHODEN .....	38
2.3.1	EXPRESSION VON MJ1051 IN <i>E. COLI ROSETTA (DE3)</i> ZELLEN .....	38
2.3.2	EXPRESSION VON SEMJ1051IN <i>E. COLI ROSETTA (DE3)</i> ZELLEN .....	39
2.3.3	EXPRESSION VON TOBZ IN <i>S. LIVIDANS TK 24</i> ZELLEN .....	39
2.3.4	ZELLERNTE UND AUFSCHLUSS.....	40
2.3.5	IMMOBILISIERTE METALLCHELAT-AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE .....	40
2.3.6	GRÖßENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE .....	41
2.3.7	ENTSALZUNGSSCHROMATOGRAPHIE .....	42
2.3.8	PROTEINKONZENTRIERUNG .....	42
2.4	BIOPHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG .....	42
2.4.1	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION .....	42
2.4.1.1	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION MITTELS BRADFORD-ASSAY .....	42
2.4.1.2	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION MITTELS UV/VIS-SPEKTROSKOPIE .....	43
2.4.2	SDS-PAGE .....	43
2.5	AKTIVITÄTSNACHWEIS .....	44
2.5.1	AKTIVITÄTSNACHWEIS MITTELS DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHIE .....	44
2.5.2	AKTIVITÄTSNACHWEIS MITTELS <i>RP</i> -HPLC .....	46

2.6	MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE DER SUBSTANZEN .....	47
2.7	ISOTHERMALE TITRATIONS-KALORIMETRIE (ITC) .....	47
2.8	ANALYTISCHE ULTRA-ZENTRIFUGATION .....	48
2.9	SYNTHESE VON MARKIERTEM CP .....	49
2.10	BIOAUTOGRAPHIE .....	50
2.11	KRISTALLISATION UND RÖNTGENKRISTALLSTRUKTURANALYSE .....	50
2.11.1	KRISTALLISATION VON PROTEINEN.....	50
2.11.2	SOAKING-EXPERIMENTE .....	51
2.11.3	DATENSAMMLUNG UND -PROZESSIERUNG .....	52
2.11.4	LÖSUNG DES PHASENPROBLEMS UND STRUKTURLÖSUNG .....	53
2.11.5	STRUKTURANPASSUNG UND -VERFEINERUNG .....	54
3	ERGEBNISSE DER CHARAKTERISIERUNG VON TOBZ.....	55
3.1	HERSTELLUNG VON TOBZ .....	55
3.1.1	EXPRESSION VON TOBZ IN <i>STREPTOMYCES LIVIDANS</i> TK 24 ZELLEN.....	55
3.1.2	REINIGUNG VON TOBZ.....	56
3.2	ENZYMATISCHE UND BIOPHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG VON TOBZ.....	58
3.2.1	DIE TOBZ-KATALYSIERTE CARBAMOYLIERUNG VON TOBRAMYCIN IST ATP-ABHÄNGIG .....	58
3.2.2	TOBZ BINDET SEINE SUBSTRATE MIT MIKROMOLARER AFFINITÄT .....	59
3.2.3	TOBZ ZEIGT EINE CP-ABHÄNGIGE ATP-PYROPHOSPHATASE-AKTIVITÄT .....	62
3.2.4	IDENTIFIZIERUNG EINES CARBAMAT-ADENYLAT ALS ZWISCHENPRODUKT .....	66
3.2.5	ANALYSE DER INITIALEN SCHRITTE DER CARBAMOYLIERUNG .....	68
3.2.6	IDENTIFIZIERUNG EINER ZUSÄTZLICHEN NUKLEOTIDBINDESTELLE AUßERHALB DER YRDC-ÄHNLICHEN DOMÄNE VON TOBZ .....	81
3.2.7	UNTERSUCHUNG ZUM CARBAMOYLTRANSFER IN DER KAE1-ÄHNLICHEN DOMÄNE .....	83
3.2.8	UNTERSUCHUNG ZUR SUBSTRATSPEZIFITÄT VON TOBZ.....	86
3.2.9	KINETISCHE UNTERSUCHUNG.....	90
3.3	NACHWEIS DER ANTIBIOTISCHEN WIRKUNG CARBAMOYLIERTER ANTIBIOTIKA.....	93

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE DER CHARAKTERISIERUNG DER PUTATIVEN O-CARBAMOYLTRANSFERASE MJ1051 .....</b>	<b>96</b>
4.1	HERSTELLUNG VON MJ1051 .....	98
4.1.1	KLONIERUNG UND EXPRESSION VON MJ1051.....	98
4.1.2	REINIGUNG VON MJ1051 .....	99
4.2	MJ1051 ZEIGT EINE CP-ABHÄNGIGE ATP-PYROPHOSPHATASE-AKTIVITÄT .....	103
4.3	KRISTALLISATION UND STRUKTURBESTIMMUNG VON MJ1051 .....	105
4.4	STRUKTUR VON MJ1051 UND VERGLEICH MIT TOBZ .....	108
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>117</b>
5.1	DIE O-CTASE TOBZ .....	117
5.1.1	VERGLEICH VON TOBZ MIT DEN CARBAMOYLTRANSFERASEN.....	117
5.1.2	TOBZ-KATALYSIERTE CARBAMOYLIERUNGSREAKTION.....	120
5.1.3	VERWANDTSCHAFT VON TOBZ ZUR S-CTASE HYPF UND T <sup>6</sup> A <sub>37</sub> -TRNA-MODIFIZIERUNG .....	129
5.1.4	SUBSTRATSPEZIFITÄT VON TOBZ IN BEZUG AUF DEN TERMINALEN AKZEPTOR	131
5.2	DAS ENZYM MJ1051 AUS <i>M. JANNASCHII</i> .....	135
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>143</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>144</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>160</b>

Abkürzungsverzeichnis:

2-DOS	2- <u>Desoxy</u> streptamin
Å	Ångström
AAC	Acetyltransferasen
ADP	<u>A</u> denosin <u>d</u> iphosphat
AE	<u>A</u> symmetrische <u>E</u> inheit
AGA	<u>A</u> minoglykosid- <u>A</u> ntibiotikum
AME	<u>A</u> GA- <u>m</u> odifizierende <u>E</u> nzyme
AMP	<u>A</u> denosin <u>m</u> onophosphat
AMPS	<u>A</u> denosin <u>m</u> onophosphat- <u>S</u>
ANT	Nukleotidyltransferasen
APH	Phosphotransferasen
APS	<u>A</u> mmoniumperoxidisulfat
ASKHA	<i>acetate and sugar kinases, Hsc70, actin</i>
ATC	<u>A</u> spartate- <u>T</u> rans <u>c</u> arbamoylase
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
AU	frei wählbare Einheit ( <i>arbitrary unit</i> )
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CA	<u>C</u> arbamoyl- <u>A</u> denylat
CAS	<u>C</u> arbamoyl- <u>A</u> denylat- <u>S</u>
CCP4	<i>collaborative computational projects 4</i>
CP	<u>C</u> arbamoyl <u>p</u> hosphat
CTase(n)	<u>C</u> arbamoyl <u>t</u> ransferase(n)
CTP	<u>C</u> ytidin <u>t</u> riphosphat
dATP	<u>D</u> esoxy <u>a</u> denosin <u>t</u> riphosphat
DC	<u>D</u> ünnschicht <u>c</u> hromatographie
dCTP	<u>D</u> esoxycytidin <u>t</u> riphosphat
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDPI(I)	<i>energy-dependent phase I(I)</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EtOH	Ethanol
HABA	<i>Hydroxyaminobuteroyl amide</i>
HEPES	2-(4-(2'- <u>H</u> ydroxyethyl)-1-piperazinyl)- <u>e</u> thansulfonsäure
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i>
Kae1	<i>kinase-associated endopeptidase 1</i>
KAS	Kasugamycin
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i>
LPS	<u>L</u> ipopolysaccharide
<i>M. jannaschii</i>	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>
MAD	<i>multi-wavelength anomalous dispersion</i>
MES	2-( <u>N</u> - <u>M</u> orpholino)ethansulfonsäure
MIC	<i>minimal inhibitory concentration</i>
MOPS	3-( <u>N</u> - <u>M</u> orpholino)propansulfonsäure



MPD	2-Methyl-2-4-pentandiol
MS	Massenspektrometrie
NEB 5'	Nebramycin 5'
OTC	Ornithin-Transcarbamoylase
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglycol
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PP <sub>i</sub>	anorganisches Pyrophosphat
PP <sub>i</sub> -ase	Pyrophosphatase
R <sub>meas</sub>	R <sub>measured</sub> auch als R <sub>rim</sub> <i>redundancy-independent merging</i> bekannt
rp-HPLC	reversed-phase high-performance liquid chromatography
RT	Raumtemperatur
<i>S. lividans</i>	<i>Streptomyces lividans</i>
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEC	size exclusion chromatography
SOC	super optimal broth with catabolite repression
SPC	Spectinomycin
SPMR	sporulation medium regeneration
STR	Streptomycin
Sua5	suppressor of upstream ATG 5
TBAB	Tetrabutylammoniumbromid
TES	2-[[1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl]amino]ethanesulfonic acid
TCA	Threonylcarbamoyl-AMP
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TOB	Tobramycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	tryptic soy broth
UV	Ultraviolett
VIS	sichtbares Spektrum des Lichtes
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
YeaZ	Bis zum Zeitpunkt der Abgabe kein Volltext verfügbar
YgjD	Bis zum Zeitpunkt der Abgabe kein Volltext verfügbar
YjeE	Bis zum Zeitpunkt der Abgabe kein Volltext verfügbar
YrdC	Bis zum Zeitpunkt der Abgabe kein Volltext verfügbar

Aus dem Englischen übernommene Begriffe, welche in der naturwissenschaftlichen Literatur allgemein gebräuchlich sind, sowie lateinische Artenbezeichnungen werden in *kursiver Schreibweise* dargestellt. Abkürzungen für Aminosäuren (Einbuchstabencode bzw. Dreibuchstabencode) werden gemäß der biochemischen Literatur verwendet.

## Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Übersicht über die verschiedenen Klassen der Carbamoyltransferasen .....	1
Abbildung 2: Schematische Übersicht über die katalysierten Reaktionen der Carbamoylphosphat-Synthetase .....	2
Abbildung 3: Quartärstruktur der humanen OTC und die schematische Übersicht der katalysierten Reaktion .....	3
Abbildung 4: Quartärstruktur der <i>E. coli</i> ATC und die schematische Übersicht der katalysierten Reaktion .....	4
Abbildung 5: Chemische Strukturen der Produkte verschiedener O-Carbamoyltransferase Reaktionen .....	5
Abbildung 6: Gen- <i>cluster</i> der Tobramycin Biosynthese aus <i>Streptoalloteichus tenebrarius</i> ..	6
Abbildung 7: Vermutete Reaktion katalysiert von TobZ zu Beginn dieser Arbeit .....	7
Abbildung 8: Struktur von TobZ aus zwei verschiedenen Blickwinkeln und Detaildarstellung der aktiven Zentren .....	7
Abbildung 9: Ladungsverteilung auf der inneren Oberfläche .....	9
Abbildung 10: Reaktionsfolge zur Synthese des Cyanid-Co-Faktors unter Beteiligung von HypF .....	10
Abbildung 11: Struktur von HypF und im Komplex mit HypE .....	11
Abbildung 12: Chemische Strukturen des Streptamin, des 2-Desoxystreptamin (2-DOS) und dem Streptomycin .....	13
Abbildung 13: Chemische Strukturen des 4,5-disubstituierten AGA Neomycin C und des 4,6-disubstituierten AGA Kanamycin A .....	13
Abbildung 14: Chemische Strukturen der monosubstituierten AGA Apramycin und Hygromycin B .....	14
Abbildung 15: Biosyntheseweg von Aminoglykosid-Antibiotika am Beispiel von Tobramycin bzw. Kanamycin A .....	15
Abbildung 16: 70S Ribosom aus <i>Thermus Thermophilus</i> und Bindung von Tobramycin .....	17
Abbildung 17: AGA-modifizierende Enzyme als Resistenzvermittlung am Beispiel von Kanamycin B .....	18
Abbildung 18: <i>rp</i> -HPLC-Analyse der Trennung von AMP, ADP und ATP .....	46
Abbildung 19: Expressionsvergleich von TobZ zwischen 20 mL und 1 L Expression .....	55
Abbildung 20: Reinigung von TobZ mittels immobilisierter Metallchelat-Affinitätschromatographie .....	56
Abbildung 21: Reinigung von TobZ mittels Größenausschlusschromatographie .....	57
Abbildung 22: DC-Analyse der Aktivität von TobZ <i>wt</i> in Abhängigkeit von CP, ATP und ADP .....	58
Abbildung 23: Kalorimetrische Titration von TobZ mit den Liganden CP, ATP und Tobramycin .....	60
Abbildung 24: Analytische Ultrazentrifugation von TobZ <i>wt</i> ohne und mit Liganden .....	62
Abbildung 25: TobZ-katalysierter CP-abhängiger ATP-Umsatz in An- und Abwesenheit des Akzeptors Tobramycin .....	63
Abbildung 26: Autoradiogramm des Umsatzes von <sup>32</sup> P-markierten Substraten .....	64
Abbildung 27: Einsatz von $\gamma$ <sup>32</sup> P-ATP deutet auf eine Freisetzung von PP <sub>i</sub> hin .....	65
Abbildung 28: TobZ-katalysierte <sup>32</sup> P-PP <sub>i</sub> Austauschreaktion .....	66
Abbildung 29: Bindung des Carbamoyl-AMP in den beiden Domänen von TobZ .....	67

Abbildung 30: Vergleich der Bindung von CP und AMPCPP sowie des Carbamoyl-Adenylates in der YrdC-ähnlichen Domäne von TobZ .....	68
Abbildung 31: Verlauf der <sup>18</sup> O-CP Synthese verfolgt mittels DC und Massenspektrum von <sup>18</sup> O-CP .....	70
Abbildung 32: Massenspektrum der Analyse von AMP .....	71
Abbildung 33: Massenspektrum der Analyse von Nebramycin 5' .....	71
Abbildung 34: DC-Analyse der Aktivität von TobZ <i>wt</i> in Abhängigkeit von ATPαS, dATP bzw. einer PP <sub>i</sub> -ase .....	72
Abbildung 35: Bindung der Liganden Carbamoyl-AMPS und PP <sub>i</sub> in der YrdC-ähnlichen Domäne von TobZ <i>wt</i> .....	73
Abbildung 36: Bindung des Liganden Carbamoyl-AMPS in der Kae1-ähnlichen Domäne von TobZ <i>wt</i> .....	74
Abbildung 37: DC-Analyse der Aktivität von TobZ T <sup>529</sup> A .....	74
Abbildung 38: Bindung von ATPαS in TobZ T <sup>529</sup> A .....	75
Abbildung 39: DC-Analyse der Aktivität von TobZ R <sup>445</sup> K .....	76
Abbildung 40: Bindung der Liganden in TobZ R <sup>445</sup> K .....	77
Abbildung 41: Bindung der Liganden in TobZ N <sup>439</sup> S .....	78
Abbildung 42: DC-Analyse der Aktivität von TobZ K <sup>443</sup> A .....	78
Abbildung 43: Bindung der Liganden in TobZ K <sup>443</sup> A .....	79
Abbildung 44: Bindung der Liganden in TobZ N <sup>528</sup> A .....	80
Abbildung 45: Stereoabbildung der Bindung von ATPαS außerhalb der YrdC-ähnlichen Domäne von TobZ <i>wt</i> .....	81
Abbildung 46: Vergleich der Kae1-ähnliche Domäne von TobZ in Abhängigkeit des Ligand-gebundenen Zustandes .....	83
Abbildung 47: DC-Analyse der Aktivität von TobZ H <sup>14</sup> N .....	84
Abbildung 48: Bindung der Liganden in TobZ H <sup>14</sup> N .....	84
Abbildung 49: Vergleich der Strukturen von TOB, KAN-A, KAN-B, DIB und G418 .....	86
Abbildung 50: DC-Analyse der Aktivität von TobZ <i>wt</i> in Abhängigkeit von Tobramycin, Kanamycin A, Dibekacin und G418 .....	86
Abbildung 51: DC-Analyse der Aktivität von TobZ <i>wt</i> in Abhängigkeit vom Akzeptor und einer PP <sub>i</sub> -ase .....	87
Abbildung 52: Bindungsanalyse von TobZ zu den Liganden Dibekacin, G418 und Tobramycin .....	88
Abbildung 53: Bindung von Dibekacin und G418 in TobZ <i>wt</i> .....	89
Abbildung 54: DC-Analyse der Aktivität von TobZ <i>wt</i> in Abhängigkeit von PP <sub>i</sub> und einer PP <sub>i</sub> -ase .....	90
Abbildung 55: Graphische Darstellung der Aktivität von TobZ <i>wt</i> in Abhängigkeit von PP <sub>i</sub> und einer PP <sub>i</sub> -ase .....	90
Abbildung 56: Graphische Darstellung des AMP-Umsatzes in Abhängigkeit des terminalen Akzeptors sowie von PP <sub>i</sub> und einer PP <sub>i</sub> -ase .....	92
Abbildung 57: DC-Analyse verschiedener Akzeptoren und Bioautogramm .....	94
Abbildung 58: DC-Analyse verschiedener Akzeptoren und Bioautogramm in Abhängigkeit einer APH(3') .....	95
Abbildung 59: Ausschnitt der codierten Gene von <i>M. jannaschii</i> .....	96
Abbildung 60: Aminosäuresequenzvergleich von Mj1051, Mj1058 und TobZ .....	97
Abbildung 61: Testexpression von MJ1051 .....	98

Abbildung 62: Reinigung von Mj1051 mittels erster IMAC.....	99
Abbildung 63: Reinigung von Mj1051 mittels SEC.....	100
Abbildung 64: Analyse der Co-gereinigten Nukleinsäuren und DNase bzw. RNase-Verdau .....	101
Abbildung 65: Reinigung von Mj1051 mittels zweiter IMAC .....	101
Abbildung 66: UV-Spektren von Mj1051 nach erster und zweiter IMAC .....	102
Abbildung 67: Analytische Ultrazentrifugation von Mj1051 .....	102
Abbildung 68: Graphische Übersicht der Aktivität von Mj1051 anhand der Verteilung von AMP, ADP und ATP .....	104
Abbildung 69: Proteinkristalle von Mj1051.....	105
Abbildung 70: Initiale Elektronendichtekarte von SeMj1051 bei einer Auflösung von 3,0 Å	107
Abbildung 71: Struktur von SeMj1051 und Vergleich mit TobZ.....	108
Abbildung 72: Oberfläche und Dimerisierung von Mj1051 und Vergleich mit TobZ .....	108
Abbildung 73: Bindung der Liganden in SeMj1051 und Vergleich mit TobZ.....	110
Abbildung 74: Bindung der Liganden in SeMj1051 im „Jeffamine“-Puffer und Vergleich mit TobZ N <sup>528</sup> A.....	111
Abbildung 75: Bindung der Liganden in SeMj1051 im „Jeffamine“-Puffer.....	112
Abbildung 76: Bindung der Liganden in Mj1051 in Abwesenheit von CP.....	113
Abbildung 77: Bindung der Liganden in SeMj1051 im „MPD“-Puffer und Vergleich mit TobZ K <sup>443</sup> A.....	114
Abbildung 78: Bindung der Liganden in SeMj1051 im „MPD“-Puffer bei pH 8 .....	115
Abbildung 79: Postulierter Mechanismus für TobZ unter Verwendung von <sup>18</sup> O-CP .....	121
Abbildung 80: Vorgeschlagener detaillierter Reaktionsmechanismus für die YrdC-ähnliche Domäne von TobZ.....	124
Abbildung 81: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus für die CAS-Bildung in der YrdC-ähnlichen Domäne von TobZ.....	127
Abbildung 82: Vorgeschlagener detaillierter Reaktionsmechanismus zum Carbamoyltransfer in der Kae1-ähnlichen Domäne von TobZ .....	128
Abbildung 83: Bindung von G418 und Amikacin im Decodierungszentrum der bakteriellen 16S-rRNA.....	133
Abbildung 84: Bindung von Tobramycin im aktiven Zentrum einer APH(2´) .....	134
Abbildung 85: Postulierte Reaktionsfolge von Mj1051 auf Basis der t <sup>6</sup> A <sub>37</sub> -tRNA-Biosynthese .....	140
Abbildung 86: Mögliche evolutive Entwicklung der S- und O-CTasen ausgehend von der t <sup>6</sup> A <sub>37</sub> -tRNA-Modifizierung.....	141
Abbildung 87: Sequenzalignment von TobZ, NovN und CmcH .....	160
Abbildung 88: Strukturelles Sequenzalignment von TobZ, Mj1051, HypF, StSua5 und PaKae1 .....	162
Abbildung 89: Analytische Ultrazentrifugation von TobZ in Anwesenheit von CP, ADP und TOB .....	166
Abbildung 90: DC-Analyse der Aktivität von TobZ <i>wt</i> in Abhängigkeit von <sup>18</sup> O-CP bzw. CP .....	167
Abbildung 91: Vergleich der potentiellen Dimere von TobZ zwischen den Raumgruppen P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 und P6 <sub>1</sub> 22.....	167
Abbildung 92: Vergleich der Ligand-gebundenen Strukturen von TobZ, Mj1051, HypF, StSua5 und PaKae1.....	168

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Übersicht über die ermittelten thermodynamischen Bindungsparameter von CP, ATP und Tobramycin an TobZ .....	61
Tabelle 2: Übersicht über die thermodynamischen Bindungsparameter von Dibekacin, G418 und Tobramycin an TobZ .....	88
Tabelle 3: Übersicht über die ermittelten $k_{cat}$ -Werte.....	91
Tabelle 4: Ermittelte Geschwindigkeitskonstanten von TobZ in Abhängigkeit des terminalen Akzeptors sowie von $PP_i$ und einer $PP_i$ -ase.....	92
Tabelle 5: Statistiken der Mj1051-apo Datensätze.....	106
Tabelle 6: Statistiken der SeMj1051 Datensätze.....	107

## 1 Einleitung

## 1.1 Carbamoylphosphat und Carbamoyltransferasen

Als Carbamoylierung bezeichnet man den Transfer einer Carbamoylgruppe, ursprünglich vom Substrat Carbamoylphosphat, auf ein Akzeptormolekül. Diese terminalen Akzeptoren sind vielfältig und reichen von Stoffwechselzwischenprodukten über Katabolismusbausteine bis hin zu Sekundärmetaboliten, wie zum Beispiel Antibiotika.

Die Carbamoylierung wird in biologischen Systemen durch die sogenannten Carbamoyltransferasen katalysiert. Sie spielen eine zentrale Rolle in allen drei Domänen des Lebens. Man unterscheidet dabei drei Gruppen von Carbamoyltransferasen (Reissmann *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2002). Zur bekanntesten Gruppe gehören die *N*-Carbamoyltransferasen des primären Stoffwechsels mit den Hauptvertretern Aspartat-Transcarbamoylase und Ornithin-Transcarbamoylase, welche die Carbamoylgruppe von Carbamoylphosphat auf ein Stickstoff (N)-Atom eines Akzeptors übertragen. Dem gegenüber gibt es die *O*-Carbamoyltransferasen, wie zum Beispiel das Enzym TobZ, die die Carbamoylgruppe auf ein Sauerstoff (O)-Atom eines Akzeptors transferieren. Als dritte bekannte Gruppe zählen die *S*-Carbamoyltransferasen, welche die Carbamoylgruppe auf ein Schwefel (S)-Atom, genauer auf die Aminosäure Cystein, übertragen (Abbildung 1, S. 1).

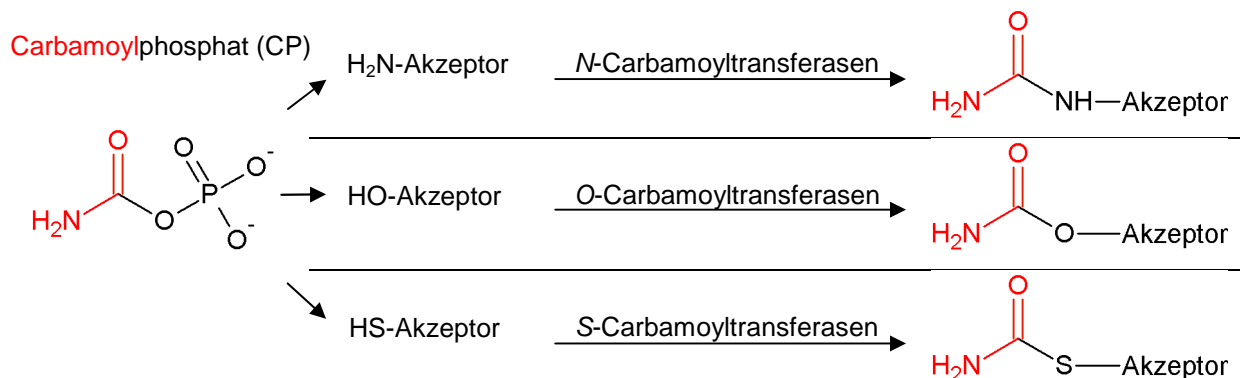


Abbildung 1: Übersicht über die verschiedenen Klassen der Carbamoyltransferasen

Carbamoylphosphat (CP) ist eine reaktive Verbindung, wodurch die Übertragung der Carbamoylgruppe auf den Akzeptor im Prinzip keine zusätzliche Energiequelle benötigt. CP selbst ist eine instabile Verbindung, wobei das Molekül in Cyanat- und Phosphationen zerfällt. Die Hydrolyse im wässrigen Milieu zu Carbamat und Phosphat spielt eine eher untergeordnete Rolle. Der Zerfall ist dabei pH-Wert- und temperaturabhängig. Zwischen pH 2 und pH 9 ist die Verbindung relativ stabil, wobei Zerfallsraten von  $k_{obs} \approx 160 \text{ min}^{-1}$  bei 37 °C ermittelt wurden (Allen, Jr. und Jones, 1964).

Carbamoylphosphat zeigt aber einen starken temperaturabhängigen Zerfall. Bis ca. 20 °C zeigt die Verbindung nach 5 Minuten kaum Zerfallsprodukte, jedoch bewirkt eine weitere Erhöhung der Temperatur eine starke Zunahme des Zerfalls. Bei 60 °C verbleiben nach 5 Minuten nur noch ca. 20 % des Carbamoylphosphates (Wang *et al.*, 2008).

Carbamoylphosphat wird zellulär durch die Carbamoylphosphat-Synthetase hergestellt, indem das Enzym Glutamin als Ammoniak-Donor, CO<sub>2</sub> als Kohlenstoff-Donor und ATP als Phosphat-Donor nutzt (Thoden *et al.*, 1998).

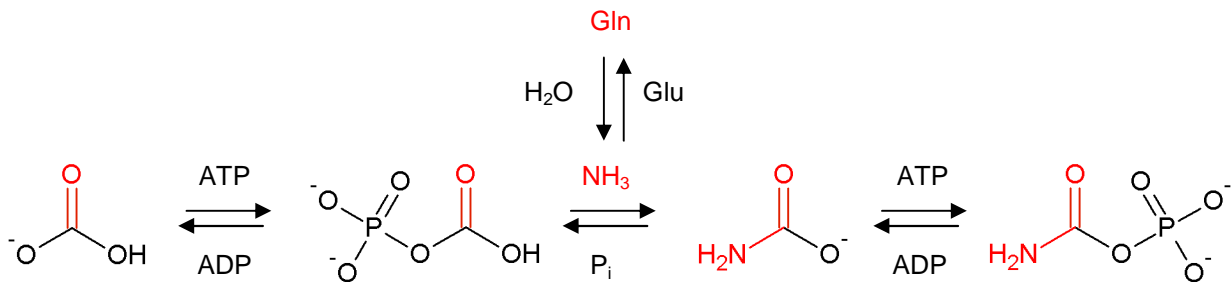


Abbildung 2: Schematische Übersicht über die katalysierten Reaktionen der Carbamoylphosphat-Synthetase

Abbildung modifiziert nach (Thoden *et al.*, 1999)

Die Synthese beginnt mit der Aktivierung von Bicarbonat (CO<sub>2</sub>) mit Hilfe von ATP zum ersten Zwischenprodukt Carboxyphosphat (Abbildung 2, S. 2). Das reaktive Zwischenprodukt wird dann im Enzym mit molekularem Ammoniak zur Reaktion gebracht und Carbamat wird gebildet. Der Ammoniak entsteht aus der Hydrolyse von Glutamin. Unter Nutzung eines zweiten ATP Moleküls wird das Carbamat zu Carbamoylphosphat phosphoryliert. Demnach werden für die Synthese von Carbamoylphosphat zwei Moleküle ATP benötigt. Aufgrund der Instabilität der Zwischenprodukte werden die Intermediate nicht in das Medium entlassen, sondern zwischen den reaktiven Zentren der Carbamoylphosphat-Synthetase transportiert.

## 1.1.1 N-Carbamoyltransferasen

Zu der Klasse der N-Carbamoyltransferasen (N-CTasen) zählen eine Reihe von Carbamoyltransferasen, die neben den bekannten Substraten Aspartat (Schachman, 1987) und Ornithin (Allewell *et al.*, 1999) zum Beispiel auch Oxamat (Bojanowski *et al.*, 1964), Putrescin (Wargnies *et al.*, 1979), Canalin (Lee und Kwon, 2000) oder vermeintlich Lysin (Hommes *et al.*, 1983) carbamoylieren können. Gemein ist allen N-CTasen die strukturelle Ähnlichkeit der Substrate sowie der katalysierenden Enzyme (Wild und Wales, 1990). Diese Enzyme besitzen eine hoch konservierte N-terminale Domäne, die das Substrat CP bindet und eine C-terminale Domäne zur Bindung des Akzeptors. Trotz wesentlicher Unterschiede in der Primärsequenz, zeigen diese C-terminalen Domänen ähnliche Sekundär- und Tertiärstrukturen (Houghton *et al.*, 1984).

Am besten untersucht sind die Ornithin-Transcarbamoylase (OTC), die eine entscheidende Rolle im Harnstoffzyklus spielt und die Aspartat-Transcarbamoylase (ATC), die eine stark-regulierte Reaktion in der Pyrimidin-Biosynthese katalysiert. Die Ornithin-Transcarbamoylase katalysiert die Bildung von Citrullin aus Ornithin und Carbamoylphosphat. Das Enzym selbst ist ein *homotrimer*, wobei jede Untereinheit aus einer N-terminalen Domäne, die Carbamoylphosphat bindet und einer C-terminalen Domäne, die L-Ornithin bindet, besteht (Abbildung 3, S. 3). Die Oligomerisierung des Enzyms wird dabei durch die N-terminale Domäne bewerkstelligt. Für eine detaillierte Beschreibung des Katalysemechanismus siehe (Shi *et al.*, 1998).

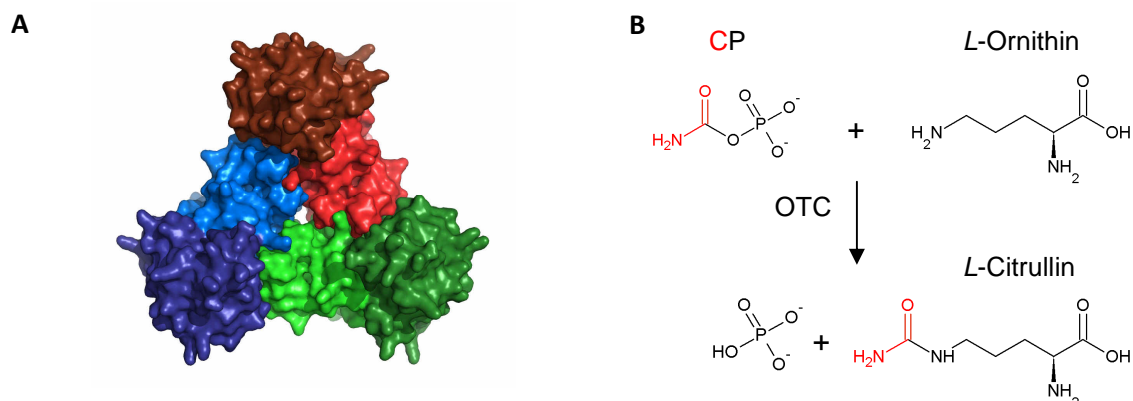


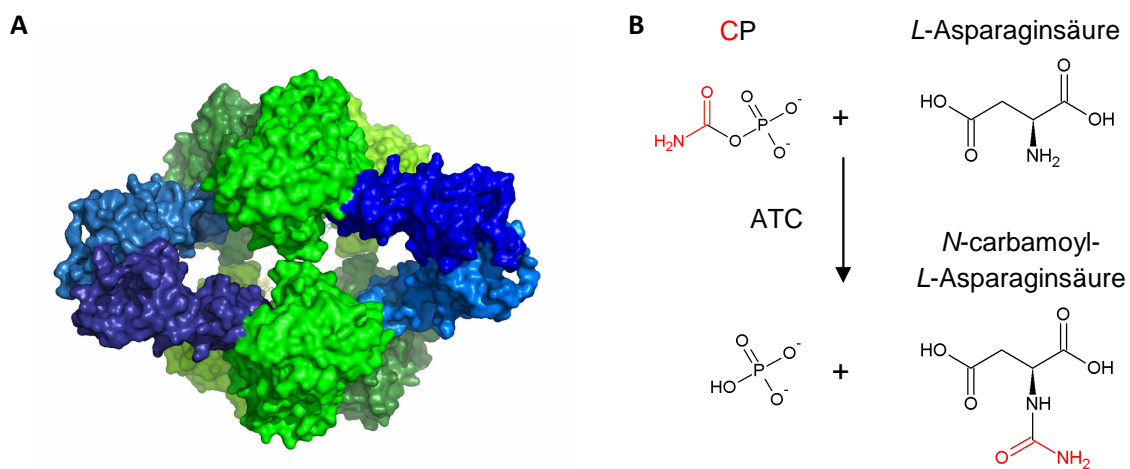
Abbildung 3: Quartärstruktur der humanen OTC und die schematische Übersicht der katalysierten Reaktion

A) Die einzelnen Polypeptidketten sind rot, grün und blau gezeigt sowie als Oberflächen dargestellt. Dabei sind die N-terminalen Domänen in entsprechend helleren und die C-terminalen Domänen in dunkleren Farbtönen dargestellt. B) Schematische Übersicht der katalysierten Reaktion der Ornithin-Transcarbamoylase. Humane OTC PDB: 1OTH (Shi *et al.*, 1998)

Wie bereits erwähnt, katalysiert die Aspartat-Transcarbamoylase den initialen Schritt der Pyrimidin-Biosynthese, in dem Carbamoylphosphat und Asparaginsäure zu N-Carbamoyl-Aspartat reagieren. Das Endprodukt der Biosynthese stellen die Basen Cytosin, Thymin und Uracil dar. Der initiale Schritt ist in allen Lebewesen hochreguliert, da die Pyrimidin-



Biosynthese den Gegenspieler zur Purin-Biosynthese darstellt. Die ATC besteht aus 6 katalytischen und 6 regulatorischen Zentren (Abbildung 4 A, S. 4) (Ke *et al.*, 1984). Die Endprodukte der Pyrimidin-Biosynthese CTP und dCTP inhibieren das Enzym aus *E. coli* über die regulatorischen Zentren bis zu 88 %, währenddessen die Produkte der Purin-Biosynthese ATP und dATP das Enzym bis zu 180 % stimulieren (Gehart und Pardee, 1962). Dadurch wird gewährleistet, dass das Verhältnis zwischen den Pyrimidin- und Purinbasen in der Zelle annähernd konstant bleibt. Wie für die OTC ist der Katalysemechanismus der ATC bereits detailliert beschrieben (Krause *et al.*, 1985). Für die Aspartat-Transcarbamoylase konnte gezeigt werden, dass ATP und dATP die Reaktion stimulieren, jedoch ist diese auch in Abwesenheit von ATP möglich.

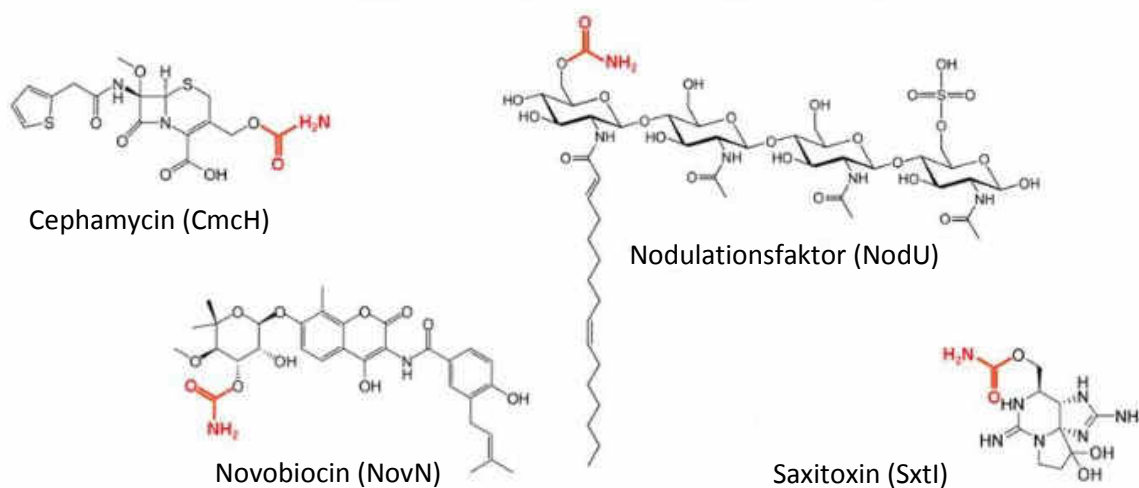


**Abbildung 4: Quartärstruktur der *E. coli* ATC und die schematische Übersicht der katalysierten Reaktion**

A) Die einzelnen Polypeptidketten sind unterschiedlich gefärbt und als Oberflächen dargestellt. Die katalytischen Zentren sind grün, während die regulatorischen Zentren blau eingefärbt sind. Zwei der 6 regulatorischen Zentren sind aufgrund der Ansicht verdeckt.  
 B) Schematische Übersicht der katalysierten Reaktion der Aspartat-Transcarbamoylase. *E. coli* ATC PDB: 1F1B (Jin *et al.*, 2000)

## 1.1.2 O-Carbamoyltransferasen

Während die essentiellen *N*-Carbamoyltransferasen im primären Stoffwechsel zentrale Reaktionen katalysieren, spielen die O-Carbamoyltransferasen wichtige Rollen im Sekundärmetabolismus. Dabei werden Antibiotika, wie zum Beispiel Cephalomycin, Novobiocin und Nebramycin modifiziert (Brewer *et al.*, 1980; Freel Meyers *et al.*, 2004; Kharel *et al.*, 2004). Zusätzlich werden Nodulationsfaktoren verändert, die eine wichtige Funktion bei der Symbiose von Knöllchenbakterien und Pflanzen darstellen (Jabbouri *et al.*, 1995). Des Weiteren wird das Gift Saxitoxin im letzten Schritt der Biosynthese carbamoyliert (Abbildung 5, S. 5) (Kellmann *et al.*, 2008).



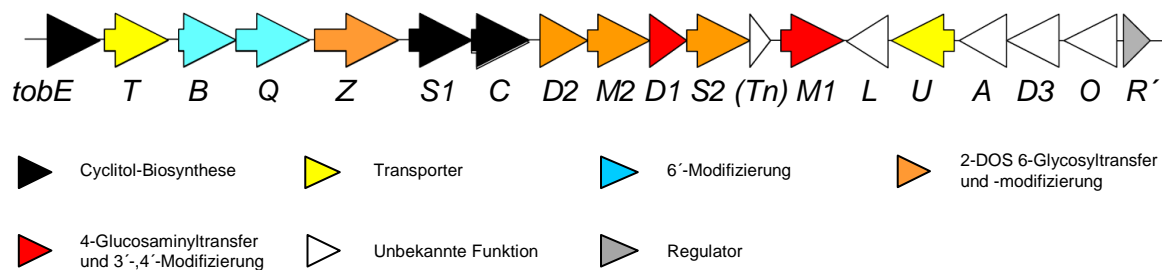
**Abbildung 5: Chemische Strukturen der Produkte verschiedener O-Carbamoyltransferase Reaktionen**

Dargestellt sind verschiedene Endprodukte des O-Carbamoyltransfers. Die Enzyme sowie die entsprechenden Produkte sind unter den chemischen Strukturen aufgelistet. Die Carbamoylgruppe ist rot eingefärbt. Abbildung übernommen aus (Parthier *et al.*, 2012)

Die Strukturen der Akzeptormoleküle sind im Vergleich zu den *N*-CTasen weitaus komplexer. Im Unterschied zu den *N*-Carbamoyltransferasen, welche lediglich Carbamoylphosphat und den Akzeptor benötigen um die entsprechende Reaktion zu katalysieren, benötigen O-Carbamoyltransferasen vermutlich ATP als zusätzliche Energiequelle. Erstmals wurde eine ATP-Abhängigkeit der Carbamoylierungsreaktion für das Enzym CmCH aus *Streptomyces clavuligerus* vermutet (Brewer *et al.*, 1980). Für das Enzym NodU wurde ebenfalls eine O-Carbamoyltransferase-Aktivität beobachtet, jedoch die mögliche ATP-Abhängigkeit der Reaktion nicht untersucht (Jabbouri *et al.*, 1995). Das Enzym NovN, welches an der Biosynthese des Antibiotikums Novobiocin beteiligt ist, weist eine essentielle Anwesenheit von ATP für die Aktivität des Enzyms auf, wobei nicht genau festgestellt werden konnte, ob ATP ebenfalls ein Substrat ist oder regulatorisch wirkt (Freel Meyers *et al.*, 2004). Aus historischer Sicht wurden aufgrund der gefunden Sequenzähnlichkeit der bis dahin verfügbaren Gensequenzen die O-Carbamoyltransferasen in die CmCH/NodU Proteinfamilie zusammengefasst (Coque *et al.*, 1995).

1.1.2.1 TobZ aus *Streptoalloteichus tenebrarius*

Die O-Carbamoyltransferase TobZ aus dem Wirtsorganismus *Streptoalloteichus tenebrarius* ist ein Enzym, welches eine Carbamoylgruppe ausgehend von Carbamoylphosphat auf das Aminoglykosid-Antibiotikum (AGA) Tobramycin überträgt (AGA werden in Abschnitt 1.2, S. 12 näher erläutert) (Kharel *et al.*, 2004; Tamura *et al.*, 2008). Das Gen befindet sich zentral im Biosynthese-*cluster* des Tobramycins (Abbildung 6, S. 6). Tobramycin gehört zu den Breitband-Antibiotika, da es sowohl auf grampositive als auch gramnegative Bakterien wirkt (Brogden *et al.*, 1976). Das Antibiotikum wird hauptsächlich gegen *Pseudomonas aeruginosa* Infektionen bei Menschen mit Mukoviszidose eingesetzt (Lam *et al.*, 2013). Weiterhin findet es Anwendung als Augentropfen gegen bakterielle Infektionen.



**Abbildung 6: Gen-cluster der Tobramycin Biosynthese aus *Streptoalloteichus tenebrarius***

Dargestellt ist eine Übersicht über die an der Tobramycin-Biosynthese beteiligten Gene aus *S. tenebrarius*. EMBL-Datenbank Accession-Nr: AJ810851, Abbildung modifiziert nach (Clausnitzer, 2010; Piepersberg *et al.*, 2007).

Das Enzym TobZ gehört zur Cmch/NodU-Proteinfamilie und besteht aus 570 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 62,5 kDa. Es katalysiert die 6''-O-Carbamoylierung der Aminoglykosid-Antibiotika Tobramycin bzw. Kanamycin B zu den Produkten Nebramycin 5' bzw. Nebramycin 4, welche zur Gruppe der 4,6-disubstituierten AGA gehören (Abbildung 7, S. 7, näher erläutert in Abschnitt 1.2.1, S. 13) (Koch *et al.*, 1973). Obwohl das Enzym zentral im Gen-*cluster* der Biosynthese des Tobramycins vorliegt, katalysiert TobZ entsprechend der Bezeichnung "Z" den letzten Schritt der Synthese (Abbildung 6, S. 6).

Die Kristallstruktur von TobZ wurde zu Beginn dieser Arbeit gelöst (Parthier *et al.*, 2012). TobZ besteht aus zwei Domänen; einer N-terminalen Kae1-ähnlichen Domäne und einer C-terminalen YrdC-ähnlichen Domäne. Die größere N-terminale Domäne umfasst die Aminosäuren Met<sup>1</sup> bis Ala<sup>354</sup> und gehört zur ASKHA-Superfamilie ("acetate and sugar kinases, Hsc70, actin") (Hecker *et al.*, 2007; Hurley, 1996; Mao *et al.*, 2008). Diese lässt sich weiter in zwei  $\alpha/\beta$ -Unterdomänen untergliedern, wobei auffälliger Weise ein sogenannter  $\beta$ -finger, der durch Glu<sup>251</sup> bis Arg<sup>269</sup> geformt wird, ein zweisträngiges  $\beta$ -Faltblatt bildet (Abbildung 8 A, S. 7). Das zur Strukturlösung verwendete zentrale Eisenatom wird von zwei

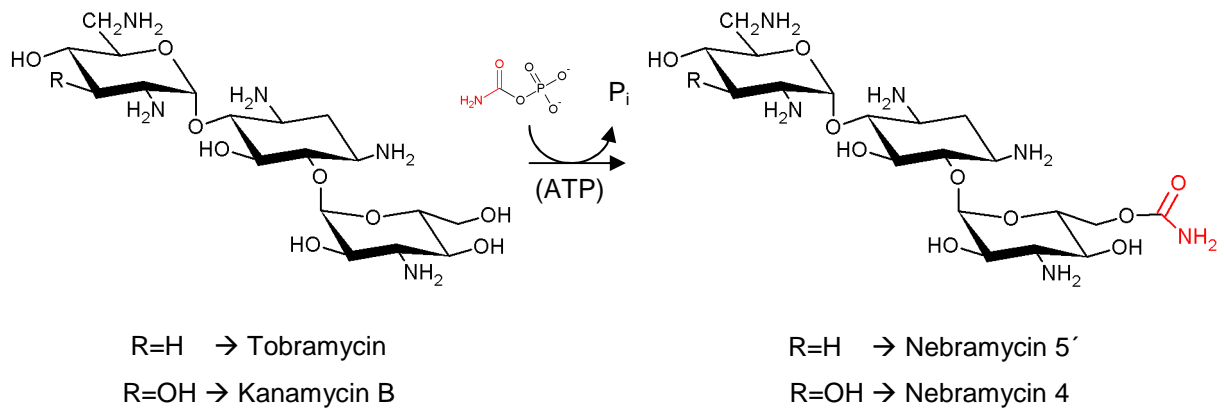


Abbildung 7: Vermutete Reaktion katalysiert von TobZ zu Beginn dieser Arbeit

Histidinen (H<sup>114</sup> und H<sup>118</sup>) und zwei Asparaginsäureresten (D<sup>137</sup> und D<sup>338</sup>) koordiniert. Mit Ausnahme von D<sup>137</sup> sind die Reste auch in den anderen CmcH/NodU-O-Carbamoyltransferasen konserviert (Anhang 1, S. 160). Der kleinere C-terminale Teil des Enzyms wird als YrdC-ähnliche Domäne bezeichnet und besteht aus Asp<sup>367</sup> bis His<sup>570</sup>. Dabei faltet sich die Domäne zu einem stark gewunden, offenen  $\alpha/\beta$ -Faltblatt und weist

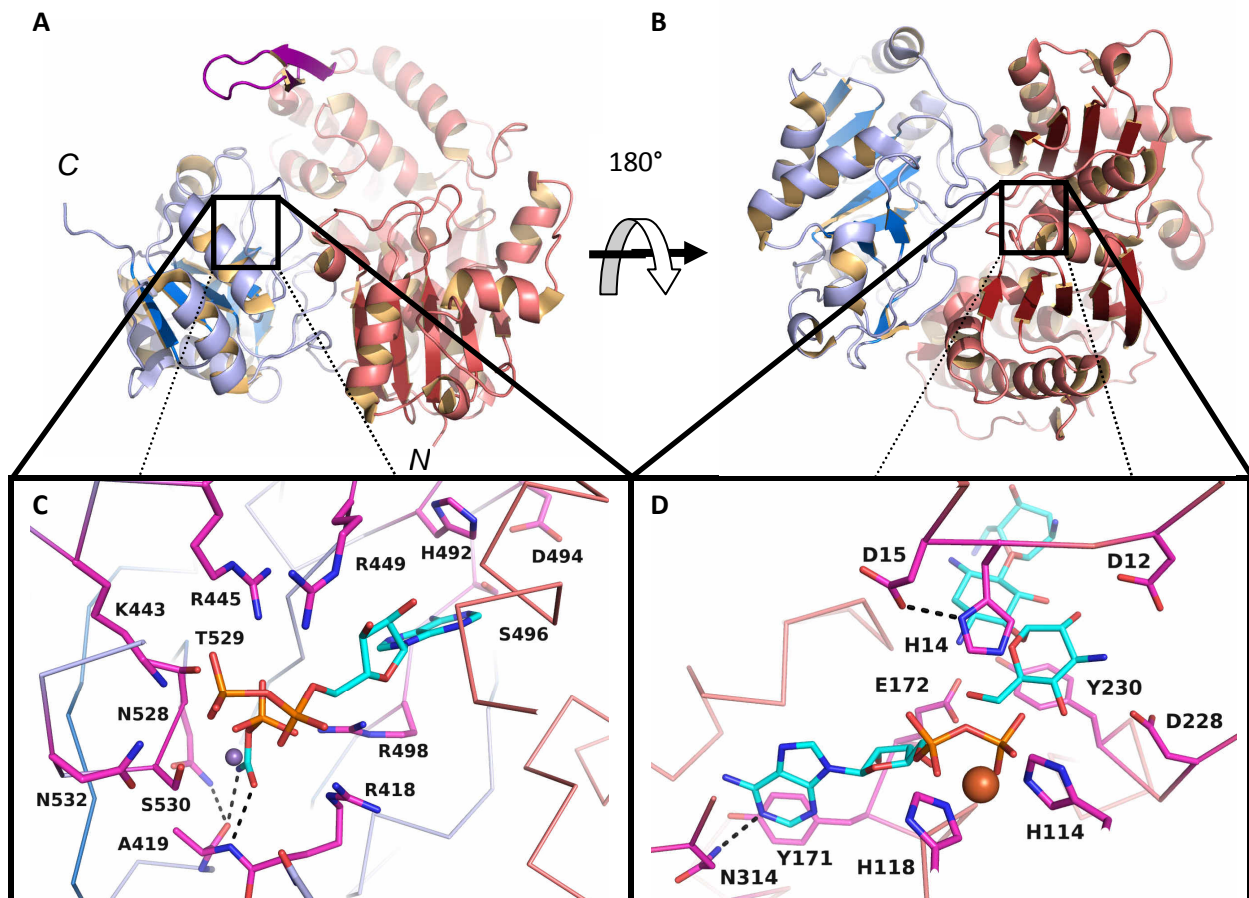


Abbildung 8: Struktur von TobZ aus zwei verschiedenen Blickwinkeln und Detaildarstellung der aktiven Zentren

Gezeigt ist eine Cartoondarstellung des Enzyms TobZ (A) und durch Drehung um 180° (B). Die C-terminale YrdC-ähnliche Domäne ist in blau und die N-terminale Kae1-ähnliche Domäne ist in rot dargestellt. Der sogenannte  $\beta$ -finger ist in violett eingefärbt. Der N- und C-Terminus sind im Bild A markiert. Zoom in die YrdC-ähnliche Domäne (C) und Kae1-ähnliche Domäne (D) von TobZ. Die abgebildeten Reste sind in stick-Darstellung gezeigt. Nicht-C-Atome sind mit den üblichen Farben versehen, wobei die C-Atome von CP, ADP und Tobramycin türkis und die C-Atome der Aminosäuren violett eingefärbt sind. Das Manganion ist als lila Kugel und das Eisenatom ist als braune Kugel eingezeichnet. PDB: 3VET (Parthier *et al.*, 2012)

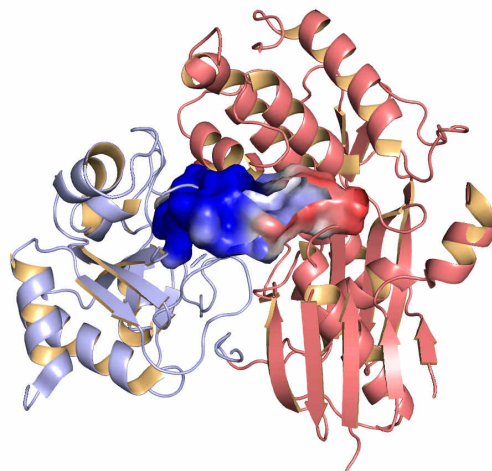
damit, entsprechend der Namensgebung, eine strukturelle Homologie zu den Mitgliedern der universell konservierten Proteinfamilie Sua5/YrdC ("*suppressor of upstream ATG*") auf (Teplova *et al.*, 2000; Agari *et al.*, 2008).

Die Bindung der Substrate im Enzym konnte durch *soaking*-Experimente mit den Liganden CP, ADP und Tobramycin sowie einem notwendigen divalenten Metallion in Form von  $Mn^{2+}$  aufgeklärt werden. Dabei bindet das Substrat CP in einer kleinen Höhle in der YrdC-ähnlichen Domäne (Abbildung 8 C, S. 7). Die Carboxamidgruppe interagiert dabei über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Amid-Stickstoff und dem Carbonyl-Sauerstoff des A<sup>419</sup>. Zusätzlich bestehen Wechselwirkungen mit dem Hauptketten-Carbonyl-Sauerstoff des N<sup>528</sup> sowie der Guanidiniumgruppe des R<sup>418</sup>. Der Phosphatteil wird durch Interaktionen mit den Seitenketten von R<sup>498</sup>, T<sup>529</sup> und S<sup>530</sup>. Die an der Bindung involvierten Reste sind hoch konserviert über die CmcH-NodU-O-CTasen (Vergleich Anhang I, S. 160). Gleichzeitig konnte die Bindung des ADP an das Enzym in der YrdC-ähnlichen Domäne aufgeklärt werden (Abbildung 8 C, S. 7). Die Adeninbase bindet in einer Tasche, welche durch eine konservierte "Schleusenschleife" (*gating-loop*), gebildet von V<sup>491</sup> bis R<sup>498</sup>, geschlossen wird. Die Seitenkette von S<sup>496</sup> bildet dabei eine Wasserstoffbrücke zur Aminogruppe der Adeninbase aus. Die gleichzeitige Wechselwirkung mit der Seitenkette von D<sup>492</sup> trägt möglicherweise zum Verschluss des *gating-loop* bei. Die Seitenketten von P<sup>450</sup>, H<sup>492</sup> und R<sup>498</sup> interagieren zusätzlich über hydrophobe Wechselwirkungen mit der Adeninbase. Die 3'-Hydroxygruppe der Ribose bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu der Seitenkette von R<sup>449</sup> aus, während der Ringsauerstoff mit der Seitenkette von R<sup>496</sup> in Interaktion tritt. Das  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphat interagieren über ionische Wechselwirkungen mit den Arginin-Seitenketten von R<sup>418</sup>, R<sup>445</sup>, R<sup>449</sup> und R<sup>534</sup> sowie der  $\epsilon$ -Aminogruppe von K<sup>443</sup> und der Seitenkette von N<sup>532</sup>. Zusätzlich besteht eine Wechselwirkung über ein gebundenes Manganion, welches durch den Phosphatteil des CP, dem  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphat des ADP sowie der Seitenkette von S<sup>530</sup> und zwei beteiligten Wassermolekülen 6-fach koordiniert wird (nicht gezeigt).

In der Kae1-ähnlichen Domäne von TobZ finden sich ebenfalls zwei gebundene Liganden, die als ADP und Tobramycin definiert werden konnten (Abbildung 8 D, S. 7). Das N<sup>1</sup> der Adeninbase ist dabei in ein Wasserstoffbrückennetzwerk involviert, bestehend aus der Seitenkette von N<sup>314</sup>, die über die Seitenkette von Q<sup>282</sup> mit der Hydroxygruppe von Y<sup>171</sup> wechselwirkt (nicht gezeigt). Letztere bildet zusätzlich Stapelinteraktionen mit der Adeninbase aus. Dieses Netzwerk ist höchstwahrscheinlich für die Adenspezifität der Kae1-ähnlichen Domäne verantwortlich. Die 3'-Hydroxygruppe der Ribose bildet Wechselwirkungen mit dem Protein in Form einer Wasserstoffbrückenbindung mit der Seitenkette von E<sup>172</sup> aus, während die 2'-OH-Gruppe mit dem Carbonyl-Sauerstoff von G<sup>168</sup>

wechselwirkt (nicht gezeigt). Das  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphat interagiert über ionische Wechselwirkungen mit dem bereits angesprochenen zentralen Eisenion. Interessanterweise verschieben sich die Seitenketten von H<sup>14</sup> und D<sup>15</sup> in Bezug auf die ligandenfreie Struktur und bilden möglicherweise eine katalytische Diade. Der 4,6-substituierte terminale Akzeptor Tobramycin bindet in einer Tasche nahe den Phosphatresten des ADP (Abbildung 8 D, S. 7). Der 6-substituierte Zuckerring ist am nächsten zu den Phosphaten und zu H<sup>14</sup> gebunden und enthält höchstwahrscheinlich die zu carbamoylierende 6''-OH-Gruppe. Das Antibiotikum interagiert mit Hilfe des zentralen Desoxystreptamin-Rings mit E<sup>172</sup> und ist über die Seitenkette von Y<sup>230</sup> aufgeschichtet, welche ebenfalls mit E<sup>172</sup> wechselwirkt. Der 4-substituierte Zuckerring zeigt kaum Interaktionen mit dem Enzym.

Auffälligerweise bindet das Substrat CP mit der zu übertragenden Carbamoylgruppe ca. 20 Å entfernt von der möglichen zu modifizierenden 6''-OH-Gruppe des Tobramycins. Daher muss ein Transport der Carbamoylgruppe zwischen den beiden Domänen stattfinden, um eine Reaktion zum Endprodukt Nebramycin 5' zu ermöglichen. Bei näherer Betrachtung der inneren Oberfläche wird durch die Faltung ein Hohlraum innerhalb sowie zwischen den Domänen gebildet, welcher durch eine Konformationsänderung des  $\beta$ -finger geschlossen werden könnte. Eine Analyse der elektrostatischen Oberfläche zeigt eine positiv-geladene innere Oberfläche der YrdC-ähnlichen Domäne, während die Oberfläche der Kae1-ähnlichen Domäne vorwiegend sauer ist, was zu einem Gefälle im elektrostatischen Potential führt (Abbildung 9, S. 9).



**Abbildung 9: Ladungsverteilung auf der inneren Oberfläche**

Gezeigt ist eine Cartoondarstellung des Enzyms TobZ mit der elektrostatischen Ladungsverteilung (berechnet mit dem Programm PyMOL ([www.pymol.org](http://www.pymol.org))) auf der inneren Oberfläche. Die C-terminale YrdC-ähnliche Domäne ist in blau und die N-terminale Kae1-ähnliche Domäne ist in rot dargestellt. Die Ladungen sind mit den üblichen Farben abgebildet. PDB: 3VEN (Parthier *et al.*, 2012)

## 1.1.3 S-Carbamoyltransferasen

Die S-Carbamoyltransferasen spielen eine zentrale Rolle für einige anaerob-lebende Pro- und Eukaryonten, indem sie eine wichtige Reaktion während der [NiFe]-Hydrogenase Reifung katalysieren. Die [NiFe]-Hydrogenase ist verantwortlich für die reversible Oxidation von molekularem Wasserstoff ( $H_2$ ) aus  $2H^+ + 2e^-$ , wobei die Produkte eine Proton- und Elektronenquelle als Reduzierungsmittel darstellen (Fontecilla-Camps *et al.*, 2007). Andererseits kann durch die Rückreaktion eine Beseitigung von überschüssigen Reduktionsmitteln ( $e^-$ ) erreicht werden. Um die Reaktion katalysieren zu können, benötigen die [NiFe]-Hydrogenasen neben den Nickel- und Eisenionen weitere Co-Faktoren, u.a. Cyanationen ( $CN^-$ ). Diese werden durch die beiden Enzyme HypF und HypE generiert (Paschos *et al.*, 2001). HypF zeigt eine Verwandtschaft zu den O-Carbamoyltransferasen und benötigt für die Carbamoylierungsreaktion neben dem Carbamoylgruppensubstrat CP auch ATP (Mao *et al.*, 1999; Paschos *et al.*, 2002). Das Enzym nutzt das Substrat CP und überträgt die Carbamoylgruppe auf den C-terminalen Cysteinrest des Enzyms HypE (Abbildung 10, S. 10) (Reissmann *et al.*, 2003). Daher kann die HypF-Proteinfamilie in die Klasse der S-Carbamoyltransferasen eingeteilt werden. Der zugrunde liegende Mechanismus für die Reaktion von CP und ATP konnte nicht detailliert geklärt werden, jedoch deuten Experimente mit verschiedenen nicht-hydrolysierbaren ATP-Analoga sowie Pyrophosphat-Austausch-Reaktionen auf ein Carbamoyl-AMP Intermediat hin (Reissmann *et al.*, 2003).

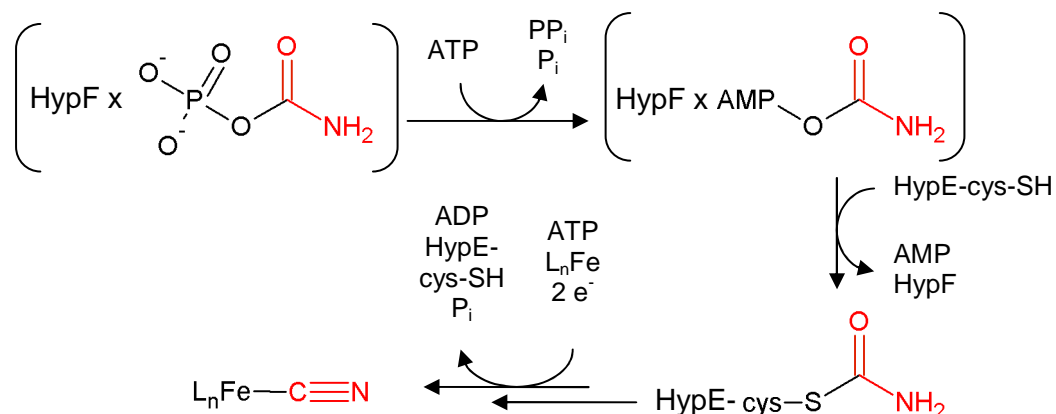
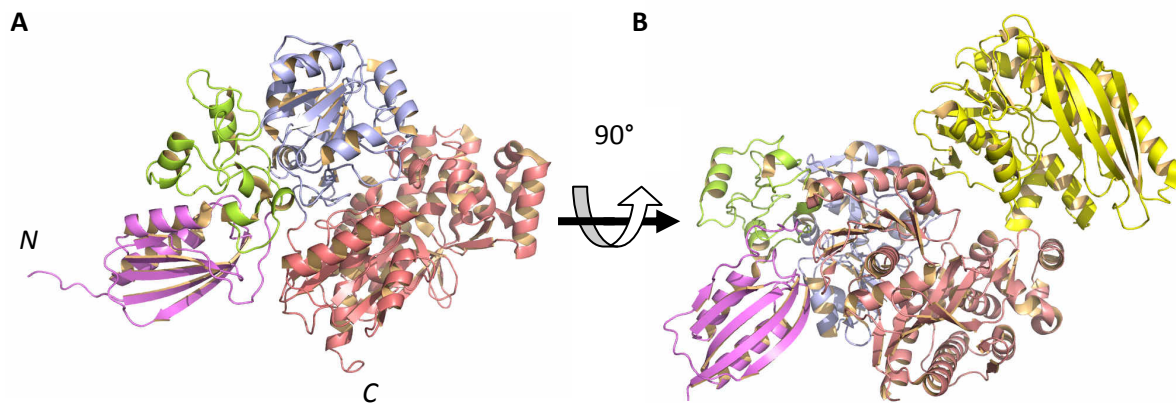


Abbildung 10: Reaktionsfolge zur Synthese des Cyanid-Co-Faktors unter Beteiligung von HypF

Dargestellt ist die Biosynthese des Cyanid-Co-Faktors unter Beteiligung der Enzyme HypF und HypE. Abbildung modifiziert nach (Reissmann *et al.*, 2003).

Zeitgleich zur Strukturaufklärung von TobZ wurden die Strukturen von HypF aus *E. coli* und aus *Caldanaerobacter subterraneus* gelöst (Petkun *et al.*, 2011; Shomura und Higuchi, 2012). HypF besteht dabei aus 751 Aminosäuren und umfasst vier Domänen: einer Acyl-Phosphatase-Domäne (ACP, V<sup>2</sup>-S<sup>108</sup>), einer Zink-finger-ähnlichen Domäne (P<sup>109</sup>-P<sup>191</sup>), einer

YrdC-ähnlichen Domäne (S<sup>192</sup>-A<sup>388</sup>) und einer Kae1-ähnlichen Domäne (P<sup>398</sup>-G<sup>751</sup>) (Abbildung 11, S. 11) (Shomura und Higuchi, 2012). In HypF finden sich auch die YrdC- und die Kae1-ähnliche Domäne wieder, die auch für TobZ beschrieben wurden (Vgl. Abschnitt 1.1.2.1, S. 6), wobei die Anordnung in der Primärsequenz umgekehrt ist. Im Unterschied zu TobZ erfolgt die Bindung des Substrates Carbamoylphosphat (CP) nicht in der YrdC-ähnlichen Domäne, sondern wird für die ACP-Domäne vorhergesagt. Wie auch in TobZ weist HypF ebenfalls ein gebundenes Eisenion in der Kae1-ähnlichen Domäne auf. Weiterhin konnte die Kristallstruktur von HypF im Komplex mit dem terminalen Akzeptor HypE aufgeklärt werden (Abbildung 11, S. 11) (Shomura und Higuchi, 2012). Das HypE-Protein bindet über hydrophobe und hydrophile Interaktionen nahe der Kae1-ähnlichen Domäne. In der gelösten Struktur ist für letzten 9 Reste, die auch das C-terminale Cystein des HypE enthalten, keine Elektronendichte vorhanden, wodurch keine Aussage über die Bindung des Akzeptor-Cysteinrestes in der Kae1-ähnlichen Domäne getroffen werden kann.



**Abbildung 11: Struktur von HypF und im Komplex mit HypE**

Gezeigt ist eine Cartoondarstellung des Enzyms HypF (A) und der Komplex aus HypF und HypE (B). Die ACP-Domäne ist violett und die Zink-finger-Domäne ist grün dargestellt. Die YrdC- und die Kae1-ähnliche Domäne sind blau bzw. hellrot eingefärbt. Die Farben von HypF für den Komplex wurden beibehalten, HypE ist gelb dargestellt. (HypF PDB: 3VTH, HypF-HypE PDB: 3VTI (Shomura und Higuchi, 2012))



## 1.2 Aminoglykosid-Antibiotika (AGA)

Wie bereits in Abschnitt 1.1.2 erwähnt wurde, spielt die O-Carbamoylierung eine wichtige Rolle bei der Modifizierung von einigen Antibiotika, unter anderem die Aminoglykosid-Antibiotika, dessen bekanntester Vertreter das Streptomycin ist. Dieses wurde 1944 von Albert Schatz entdeckt und aufgrund der ähnlichen Wirkung zu dem damals bereits bekannten Antibiotikum Streptothricin Streptomycin genannt (Schatz *et al.*, 2005; Waksman und Schatz, 1943). Die Aminoglykosid-Antibiotika (AGA) werden hauptsächlich von Bakterien der Gattung *Streptomyces* und *Micromonospora* produziert, wobei die Endung -mycin der Antibiotika auf Produzenten der Gattung *Streptomyces* verweist, die Endung -micin auf *Micromonospora* als Produzenten hindeutet (Dewick, 2009). Vorteil der AGA ist die Wirkung sowohl auf gramnegative Bakterien wie *E. coli*, *Enterobacter spp.* als auch gegen grampositive Bakterien, wie z.B. *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und der Tuberkulose Erreger *Mycobacterium tuberculosis* (Redmond, 1955; Schatz *et al.*, 2005). In den folgenden Jahren wurden weitere AGA entdeckt, die weniger Nebenwirkungen und eine besserer Wirksamkeit zeigten (Vakulenko und Mobashery, 2003). Dazu zählen das Neomycin (Waksman *et al.*, 1949), Kanamycin B (Umezawa *et al.*, 1957), Gentamicin (Black *et al.*, 1963), Tobramycin (Higgins und Kastner, 1967) und das Ribostamycin (Akita *et al.*, 1970). Aufgrund der intensiven medizinischen Anwendung der AGA führte dies zu einer zunehmenden Resistenzentwicklung vorher sensitiver Stämme (Sharp *et al.*, 1974; Umezawa, 1974). Daher wurde mit der Entwicklung halbsynthetischer AGA begonnen, wie z.B. dem Dibekacin (Miyake *et al.*, 1976), dem Dibekacin-Derivat Arbekacin und dem Kanamycin A-Derivat Amikacin (Bodey und Stewart, 1973; Kondo *et al.*, 1973a) sowie dem Gentamicin-Derivat Isepamicin (Neu und Fu, 1978). Vorteil der halbsynthetischen AGA ist die höhere Wirksamkeit bei geringerer Dosis des Antibiotikums (Matsumoto, 2014).

## 1.2.1 AGA-Klassifizierung und Aufbau

Aminoglykosid-Antibiotika (AGA) bestehen aus einem charakteristischen Cyclitol (Aglycon) sowie aus einem oder mehreren Zuckeranteilen (Glycon). Zur Unterteilung der verschiedenen AGA in verschiedene Klassen dient das Aglycon (Piepersberg *et al.*, 2007). Die meisten AGA können in die 1) Streptamin enthaltenden oder 2) 2-Desoxystreptamin enthaltenden AGA eingeteilt werden (Abbildung 12, S. 13). Zur ersten Klasse gehört z.B. das Streptomycin, da das Aglycon Streptamin vollsubstituiert ist, d.h. dass jeder Kohlenstoff des zentralen Streptamins mit einer Hydroxy- bzw. Aminogruppe substituiert ist. Weiterhin zählen zu dieser Gruppe allgemein die Streptomycine (STRs), die Spectinomycine (SPCs) und die Kasugamycine (KASs) (Beekman, 1965; Umezawa *et al.*, 1965).

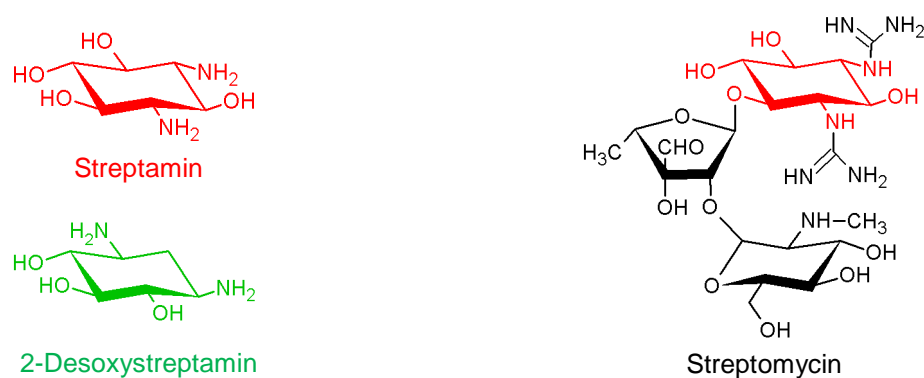


Abbildung 12: Chemische Strukturen des Streptamin, des 2-Desoxystreptamin (2-DOS) und dem Streptomycin

Zur zweiten Gruppe gehören die Paromamin-ähnlichen AGA, die als Aglycon ein 2-Desoxystreptamin (2-DOS) enthalten. Das Paromamin ist ein Pseudosaccharid, welches auch als Zwischenstufe während der Synthese der AGA gebildet wird. Zur Bildung der AGA wird das zentrale 2-DOS weiter glykosyliert, wobei 4,5-disubstituierte AGA zur Neomycin-Familie zählen, wie z.B. das Neomycin selbst, das Paromomycin und das Ribostamycin. Weiterhin werden auch 4,6-disubstituierte AGA gebildet, welche in die Kanamycin- und Gentamicin-Familie eingeteilt werden können (Abbildung 13, S 13).

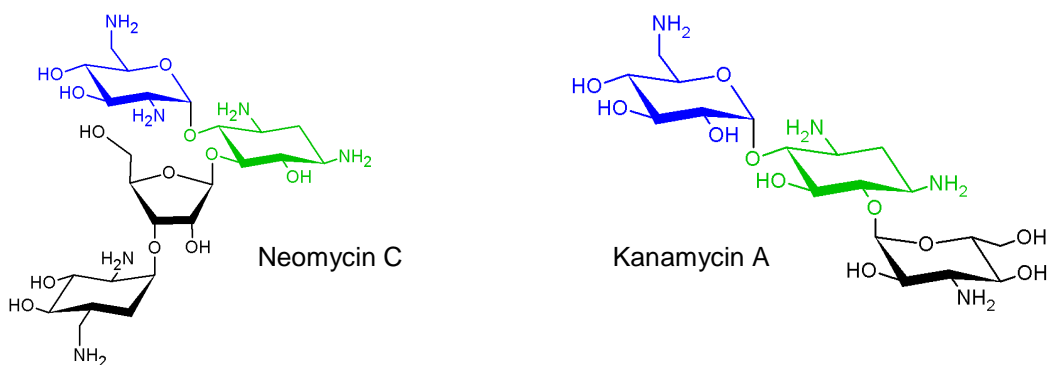


Abbildung 13: Chemische Strukturen des 4,5-disubstituierten AGA Neomycin C und des 4,6-disubstituierten AGA Kanamycin A

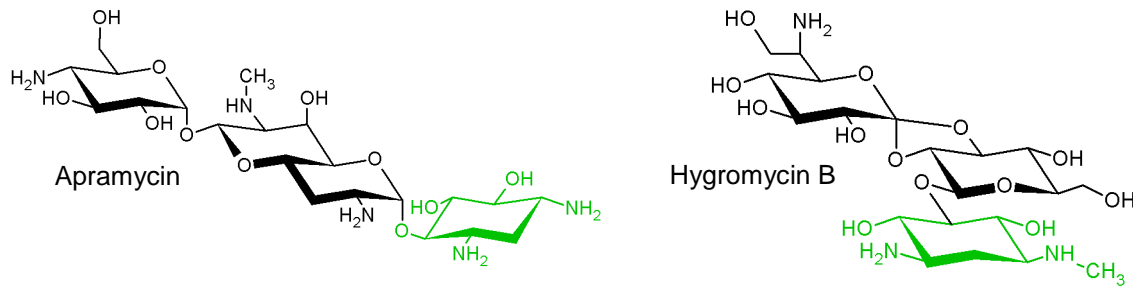


Abbildung 14: Chemische Strukturen der monosubstituierten AGA Apramycin und Hygromycin B

In der Natur findet man weniger häufig auch monosubstituierte AGA, wie zum Beispiel das Apramycin, bei dem das zentrale 2-DOS nur an Position 4 modifiziert ist (Thompson und Presti, 1967). Im Hygromycin B, welches häufig zur Plasmidselektion bei der Transformation von *Schneider 2* Zellen genutzt wird, erfolgt eine Substituierung an der Position 5 (Abbildung 14, S. 14) (Gritz und Davies, 1983; Pittenger *et al.*, 1953). Weiterhin wurden Fortamin und 2-Desoxyfortamin enthaltende AGA, wie zum Beispiel das Fortimicin A und das Istamycin A, nachgewiesen und beschrieben (Nara *et al.*, 1977; Okami *et al.*, 1979).

Die Biosynthese der verschiedenen AGA wird durch bakterielle Enzyme bewerkstelligt, wobei die Gene in *cluster* organisiert sind (Piepersberg *et al.*, 2007). Der initiale Schritt der Synthese umfasst eine Zyklisierungsreaktion des Zuckers Glucose-6-Phosphat zum ersten Produkt 2-Desoxy-*scyllo*-inosose (Abbildung 15, S. 15). In den weiteren Schritten erfolgt in PLP- bzw. NAD<sup>+</sup>-abhängigen Reaktionen die Transaminierung und Oxidation zum ersten Intermediat der AGA-Synthese, dem zentralen Aglycon 2-DOS. Nachfolgend wird durch eine Glykosylierung an Position 4 und folgender Deacetylierung das erste AGA Paromamin gebildet. Zur Bildung von AGA, die zur Kanamycin-Familie zählen, wird die Position 6 des Aglycon glykosyliert und durch nachfolgende Oxidations- und Transaminierungsreaktionen wird über Kanamycin C das AGA Kanamycin B gebildet. Dieses kann weiter durch eine 3'-Dehydroxylierung zum Tobramycin umgewandelt werden. Alternativ kann eine 2'-Desaminierung erfolgen, wodurch Kanamycin A gebildet wird (Abbildung 15, S. 15). Der an Position 4 substituierte Zucker wird dabei als Ring I, das zentrale 2-DOS als Ring II und der an Position 6 substituierte Zucker als Ring III bezeichnet (Abbildung 15, S. 15) (Flatt und Mahmud, 2007; Piepersberg *et al.*, 2007).

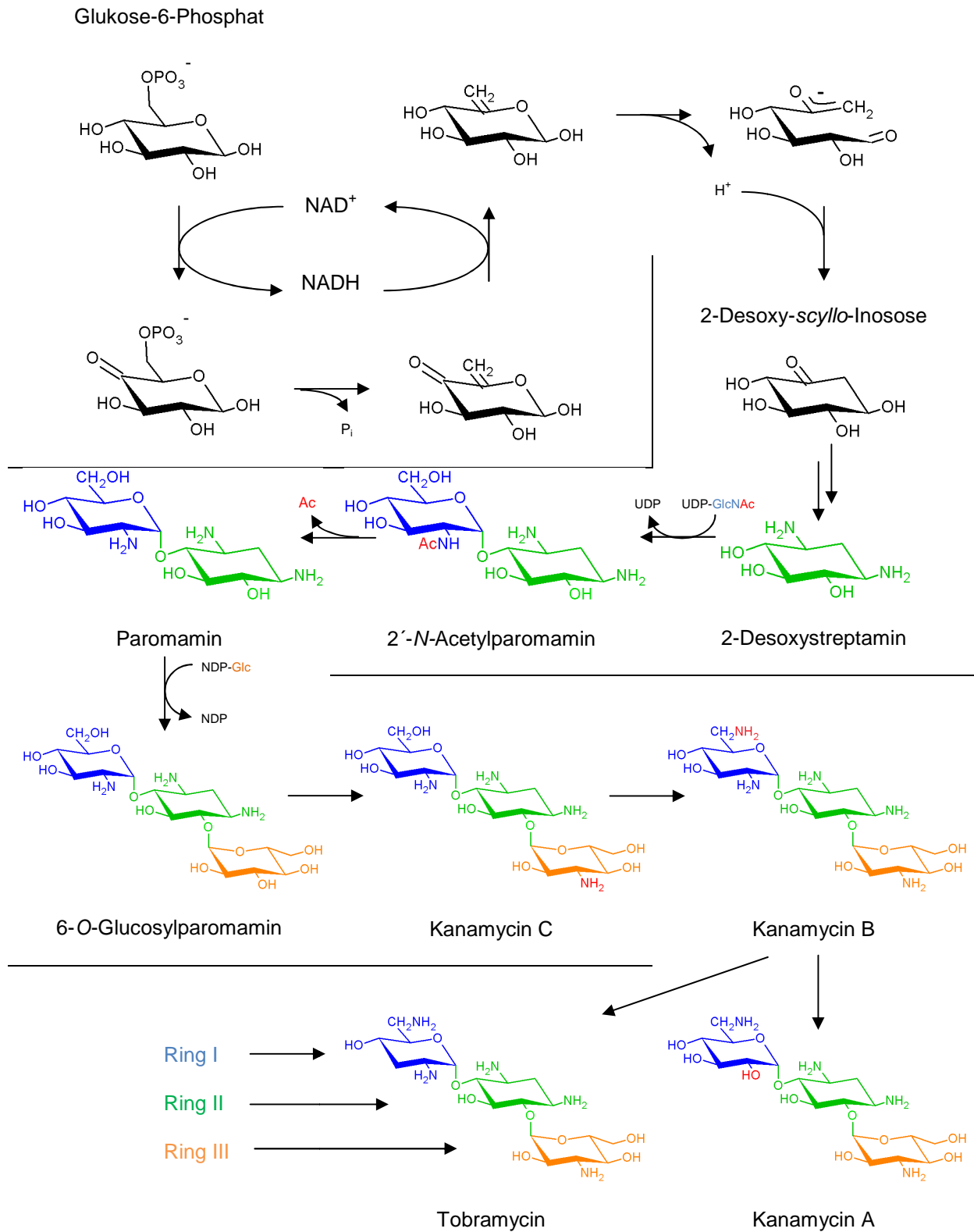


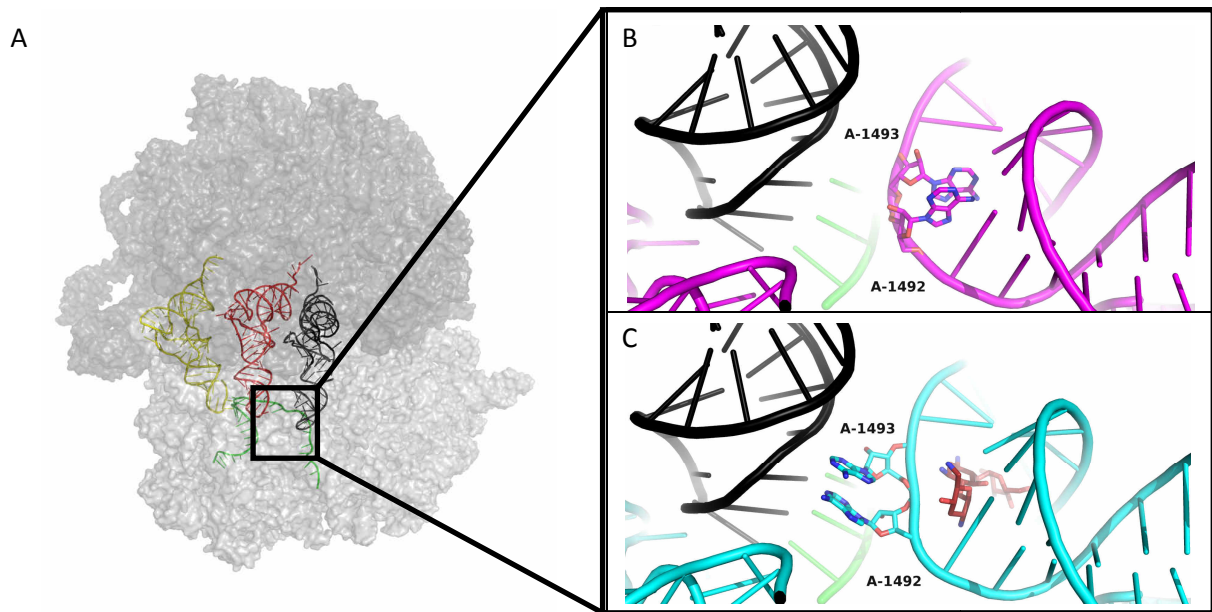
Abbildung 15: Biosyntheseweg von Aminoglykosid-Antibiotika am Beispiel von Tobramycin bzw. Kanamycin A

Das zentrale 2-Desoxystreptamin ist in grün, der an Position 4 substituierte Zucker ist blau und der an Position 6 substituierte Zucker ist orange dargestellt. Die Nummerierung der Ringe ist anhand der chemischen Struktur von Tobramycin gezeigt. Abbildung modifiziert nach (Piepersberg *et al.*, 2007).

### 1.2.2 Wirkmechanismus der AGA

AGA, die das Aglycon 2-DOS als zentralen Baustein besitzen, wirken sowohl gegen grampositive als auch gramnegative Organismen bakterizid und werden daher als Breitbandantibiotika bezeichnet (Thompson und Presti, 1967). Um ihre Wirkung entfalten zu können, müssen die AGA die bakterielle Zellmembran durchdringen. Dieser Vorgang ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch wird nach dem aktuellen Model davon ausgegangen, dass die positiv geladenen AGA mit den negativ geladenen Lipopolysacchariden (LPS) der Membran interagieren. Anschließend erfolgt die Aufnahme über zwei energieabhängige Prozesse, die als EDPI und EDPII (*energy-dependent phase*) bezeichnet werden (Bryan und Van Den Elzen, 1977) (zusammengefasst in (Taber *et al.*, 1987)). Da diese Prozesse ein Membranpotential erfordern, wirken AGA nur auf *aerobe* Bakterien während *anaerobe* unempfindlich gegenüber diesen sind (Bryan und Kwan, 1981).

Nach dem Transport durch die bakterielle Zellmembran können die AGA ihre antibiotische Wirkung entfalten. Grundlage dessen ist die Bindung an die 30S Untereinheit des bakteriellen 70S Ribosoms (Moazed und Noller, 1987). Die Untereinheit besteht aus 21 Proteinen und der 16S rRNA. Letztere stellt die Bindestelle der AGA dar, in dem die Antibiotika im physiologischen Milieu unter anderem mit den positiv geladenen Aminogruppen mit dem negativen Phosphat-Rückgrat der RNA interagieren. Die 16S rRNA spielt eine wichtige Rolle in der Aminoacyl-(A)-Bindestelle des Ribosoms, wo das Codon der mRNA mit der komplementären Aminoacyl-tRNA interagiert (Pape *et al.*, 1999). Für die Wechselwirkung der AGA mit der 16S rRNA sind die Aminogruppen des zentralen 2-DOS essentiell (Davies *et al.*, 1966; Fourmy *et al.*, 1996). Unter anderem konnte für das Antibiotikum Tobramycin die Bindung an die 30S Untereinheit des bakteriellen Ribosoms aus *Thermus thermophilus* röntgenkristallographisch gezeigt werden (Abbildung 16, S. 17). Dabei bindet Tobramycin an die 16S rRNA im Decodierungszentrum, wobei Ring I über hydrophobe Interaktionen mit dem Rest G1491 wechselwirkt. Die freien Aminogruppen des zentralen 2-DOS-Ring (Ring II) interagieren mit der Base und dem Phosphatrückgrat von U1495. Ring III bildet zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen zu G1405, C1407 und dem Phosphatrückgrat der 16S rRNA aus (Vicens und Westhof, 2002). Durch die Bindung des Antibiotikums erfolgt eine Konformationsänderung zweier konservierter Nukleotide der 16S rRNA (A1492 und A1493), in Folge dessen die komplementäre Bindung der Aminoacyl-tRNA zum entsprechenden Codon gestört wird (Abbildung 16, S. 17) (Pape *et al.*, 2000). Die resultierende verringerte Decodierungsfunktion führt zu einer Erhöhung der Fehlerrate, wobei durch fehlgefaltete Proteine weitere Membrankanäle entstehen, welche die



**Abbildung 16: 70S Ribosom aus *Thermus Thermophilus* und Bindung von Tobramycin**

A) Dargestellt ist die Oberfläche des 70S Ribosoms aus *Thermus Thermophilus* mit der 50S Untereinheit in dunkelgrau und der 30S Untereinheit in hellgrau. Zur Orientierung sind die tRNAs und die mRNA in den entsprechenden Stellen des Ribosoms gezeigt. Die tRNA in der A-site ist in schwarz; in der P-site in rot und in der E-site in gelb gezeigt. Die mRNA ist in grün markiert.

B,C) Zoom in das Decodierungszentrum der 30S Untereinheit mit Blick auf die 16S rRNA und auf die Reste A1492 und A1493 in der ligandenfreien Struktur (violett) und in der Tobramycin-gebundenen Struktur (türkis). Zur Orientierung ist die tRNA (schwarz) aus A) und die mRNA in grün abgebildet. Nicht-C-Atome sind entsprechend der gängigen Färbung dargestellt. Die C-Atome des Tobramycins sind dunkelrot eingefärbt. Die Abbildungen wurden aus der Überlagerung verschiedener Strukturen generiert.

PDB 70S Ribosom: 4V63; PDB tRNAs und mRNA: 4V6F; PDB freies 30S Ribosom: 1J5E; PDB Tobramycin-gebundenes 30S Ribosom: 4LFC (Wimberly *et al.*, 2000; Laurberg *et al.*, 2008; Jenner *et al.*, 2010)

AGA-Aufnahme verstärken (Davis *et al.*, 1986). Zusätzlich kann die Bindung der AGA die Affinität der Aminoacyl-tRNA zur A-site des Ribosoms erhöhen, was im Zusammenspiel mit der erhöhten Fehlerrate die Präzision der Translation verringert. Dadurch werden fehlgefaltete und damit nicht-funktionelle Proteine hergestellt, die schlussendlich den Zelltod zur Folge haben.

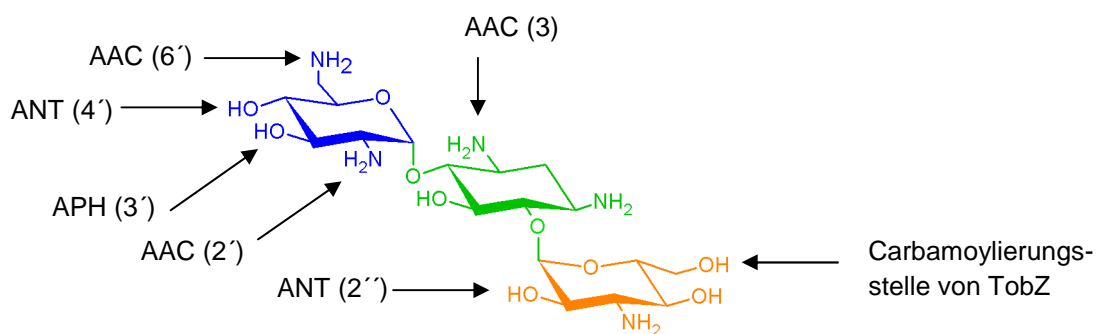
### 1.2.3 Resistenzentwicklung gegen AGA

Aufgrund der antibiotischen Wirkung auf grampositive und -negative Bakterien fand eine intensive medizinische Verwendung der AGA statt, was bei vielen Bakterienstämmen zu Resistenzentwicklungen geführt hat. Aktuell werden vier Strategien zur Resistenzvermittlung gegen AGA unterschieden (Becker und Cooper, 2013; Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999).

## 1.2.3.1 Expression AGA-modifizierender Enzyme

Der bekannteste und häufigste Resistenzmechanismus ist die enzymatische Modifikation der freien Hydroxy- und Aminogruppen der AGA, die, wie bereits für die Bindung von Tobramycin an die 16S rRNA beschrieben, essentiell für die Wechselwirkung mit der RNA sind. Die Gene viele dieser Enzyme befinden sich auf Plasmiden, Transposons und Integrons, wodurch die Ausbreitung von Resistenzen begünstigt wird. Sie werden in drei verschiedene Klassen unterteilt, wobei fortführend die Enzyme nach der Zielposition der Modifikation unterschieden werden (Abbildung 17, S. 18) (Shaw *et al.*, 1993):

- Die Acetyltransferasen, welche Acetyl-CoA als Acetyl-Gruppendonator nutzen, können AGA an verschiedenen Positionen der Ringe modifizieren. Die Acetylierung der Aminogruppen reduziert die positive Ladung der AGA, wodurch die Bindung an die RNA geschwächt wird (Vong *et al.*, 2012).
- Die Phosphotransferasen katalysieren eine ATP-abhängige Phosphorylierung der Hydroxygruppen der AGA. Dadurch werden negative Ladungen in die hauptsächlich positiven AGA eingeführt, wodurch die elektrostatische Interaktion mit der negativ geladenen RNA gestört wird.
- Die Nukleotidyltransferasen, die ebenfalls ATP-abhängig sind, übertragen den AMP-Teil auf eine Hydroxygruppe. Durch die Übertragung des gesamten Adenosylrestes wird die Bindung der AGA zu der RNA gehindert.



**Abbildung 17: AGA-modifizierende Enzyme als Resistenzvermittlung am Beispiel von Kanamycin B**

Die unterschiedlichen Enzyme sind entsprechend ihrer Substratspezifität bezeichnet. Zusätzlich ist die Stelle der Carbamoylierung durch TobZ gezeigt. AAC: Acetyltransferasen; APH: Phosphotransferasen; ANT: Nukleotidyltransferasen; Abbildung modifiziert nach (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999)

### 1.2.3.2 Modifizierung der 30S Untereinheit

Die Veränderung der 16S rRNA kann zum einem durch Mutation und zum anderem durch enzymatische Modifikationen erfolgen, jedoch sind Mutationen in der hoch konservierten Region um die Basen A1492 und A1493 häufig letal. Dagegen führt die Mutation der Base G1491 zu G1491U oder G1491C zu einer Insensitivität gegenüber AGA verschiedener Klassen (De Stasio *et al.*, 1989). Nicht nur die RNA, sondern auch die Proteine der 30S Untereinheit können Mutationen unterliegen. Zum Beispiel konnte durch verschiedene Mutationen im S4 Protein eine Resistenz von *Salmonella typhimurium* gegenüber Streptomycin beobachtet werden (Bjorkman *et al.*, 1999).

Eine weitere Möglichkeit der Modifizierung stellt die Expression von Methyltransferasen dar, welche zwei bestimmte Nukleotide (G1405 und A1408) in die 7-Methyl-Derivate überführen (Moric *et al.*, 2010). Diese Art der Resistenzvermittlung spielt eine zentrale Rolle für die natürlichen AGA-Produzenten, um sich selbst vor den hergestellten AGA zu schützen. Im Jahr 1996 wurde erstmalig festgestellt, dass die Gene für diese Enzymklasse bereits auf pathogene Mikroben übergegangen sind, wodurch ein neues Ziel zur Verhinderung der AGA-Resistenz entstanden ist (Wachino und Arakawa, 2012; Yokoyama *et al.*, 2003).

### 1.2.3.3 Veränderung der Aufnahme und Ausschleuße-Mechanismen

Eine Veränderung der Lipopolysaccharide (LPS) auf der bakteriellen Zellmembran kann die Regulierung der Aufnahme bzw. das Ausschleußen von Antibiotika verändern. Durch die Anwesenheit von Polyaminen wird die elektrostatische Interaktion der AGA mit der Membran gestört, wodurch die Aufnahme gehindert wird (Kwon und Lu, 2006). Da der Transport der AGA durch die Zellmembran einen Protonengradient erfordert, können zudem Mutationen, die einen Defekt in der Elektronentransportkette verursachen, die Aufnahme der Antibiotika stören. Neben der verringerten Aufnahme kann auch das Ausschleußen der AGA erhöht werden, wodurch die intrazelluläre Konzentration sinkt und somit die Bindung der AGA an die 16S rRNA geschwächt wird. Dieser Prozess wird durch Proteine der sogenannten RND-Familie (*resistance nodulation division*) bewerkstelligt, die nicht nur Antibiotika ausschleußen können, sondern auch für den Export verschiedener niedermolekularer Verbindungen verantwortlich sind (Poole, 2001).



#### 1.2.3.4 Membranproteasen

Wie bereits erwähnt, können durch fehlgefaltete Proteine Membrankanäle entstehen, welche die Aufnahme der Antibiotika begünstigen (Davis *et al.*, 1986). Diese Proteine werden normalerweise durch die Qualitätskontrolle im periplasmatischen Raum erkannt und abgebaut (Duguay und Silhavy, 2004). Eine dieser Membranproteasen ist die FtsH-Protease, deren Expressionslevel aufgrund einer stressinduzierten Antwort erhöht wird. Dadurch wird eine verringerte Sensitivität gegenüber Antibiotika und anderen Stressfaktoren erreicht. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Deletion FtsH-regulierender Proteine eine erhöhte Sensitivität gegenüber der AGA nach sich zieht (Fischer *et al.*, 2002; Kohanski *et al.*, 2008).

#### 1.2.4 Entwicklung neuer Antibiotika

Um der zunehmenden Resistenzentwicklung vieler Bakterien entgegenzuwirken, können Strategien unterschieden werden. Zum einen können Inhibitoren gegen die Vielzahl an modifizierenden Enzymen entwickelt werden, wie es z. B. für die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika erfolgreich umgesetzt werden konnte (Leigh *et al.*, 1981). Trotz einiger Versuche Inhibitoren zu entwickeln, ist die Fülle an modifizierenden Enzymen zu groß, sowie das Verständnis deren Mechanismen noch unvollständig, um klinisch relevante Inhibitoren zu generieren (Azucena und Mobashery, 2001; Fong und Berghuis, 2002; Stogios *et al.*, 2013). Aufgrund dieser Gegebenheit wurde damit begonnen, die bestehenden AGA weiterzuentwickeln und zu modifizieren. Dazu zählt die Einführung einer Nitrogruppe anstelle einer Aminogruppe, woraufhin die Modifizierung durch APHs autokatalytisch elimiert wird. Anschließend dient das veränderte Antibiotikum als Selbstmordsubstrat für das Enzym, wodurch eine irreversible Inaktivierung des Enzym erreicht wird (Roestamadjji und Mobashery, 1998; Vakulenko und Mobashery, 2003). Des Weiteren wurden Ketone in die AGA eingeführt, die entgegen der Erlenmeyer-Regel hydratisiert vorliegen. Diese dienen ebenfalls als Substrate für die APHs, wobei auch eine anschließende autokatalytische Eliminierung der Modifikation vorliegt. Im Gegensatz zu den  $\text{NO}_2$ -modifizierten AGA liegen die Keton-modifizierten nach der Reaktion unverändert vor, wodurch diese weiterhin antibiotisch aktiv sind (Haddad *et al.*, 2002; Vakulenko und Mobashery, 2003). Neben diesen Ansätzen wurde versucht, die funktionellen Gruppen der AGA zu reduzieren, um eine entsprechende Inaktivierung zu vermeiden. Dies gelang am Beispiel von Dibekacin, bei dem im Vergleich zum Kanamycin B zwei Hydroxygruppen fehlen (Miyake *et al.*, 1976). Jedoch kann auf diese Gruppen nicht

vollständig verzichtet werden, da sie wichtig für die Bindung an die 16S rRNA sind (Vgl. Abschnitt 1.2.2, S. 16). Ein anderer Ansatz verfolgt die Erweiterung der AGA mit Seitenketten. Dies konnte erfolgreich am Beispiel des Kanamycin B Derivates Amikacin gezeigt werden, das durch seine 3'-Hydroxygruppe ein Substrat für APH(3')-Enzyme darstellt, jedoch trotzdem antibiotisch aktiv ist (Kondo *et al.*, 1973b). Vermutlich ist die Bindung des Antibiotikums im aktiven Zentrum der APH(3') durch die Seitenkette gestört, dennoch ist die Bindung an die 16S rRNA weiterhin möglich und wird zudem noch verstärkt (Kondo und Hotta, 1999; Kondo *et al.*, 2006).

### 1.3 Ausgangspunkt der Arbeit und Zielstellung

Die Basis der Arbeit stellte die bereits etablierte Expression und die gelöste Kristallstruktur von TobZ dar. Die Expression wurde bereits erfolgreich in *Streptomyces lividans* TK24 Zellen durchgeführt, wobei lösliches TobZ erhalten werden konnte. Eine Expression in *E. coli* wurde in der Gruppe von Udo Wehmeier (Universität Wuppertal) durchgeführt, führte jedoch stets zu unlöslichem Protein. Erste Aktivitätsuntersuchungen des Proteins führten zu einem Nachweis der Carbamoylphosphat (CP)-abhängigen Tobramycin-Carbamoylierung nach dem Zellaufschluss, die jedoch nach dem ersten Reinigungsschritt mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) nicht mehr nachzuweisen war. Andererseits wurde die Reinigung in der Arbeitsgruppe Stubbs ebenfalls mittels IMAC durchgeführt, wobei eine anschließende Kristallisation zu streuenden Proteinkristallen führte, die für die Strukturlösung geeignet waren.

Auf der Grundlage der bereits etablierten Expression und der gelösten Struktur von TobZ stand die detaillierte Aufklärung des Mechanismus der Carbamoylierung im Vordergrund. Diese sollten aufbauend auf der biochemischen Untersuchung der Aktivität und der biophysikalischen Analyse der Bindung der Substrate zum Enzym erfolgen. Zur Aufklärung eignen sich radioaktiv-markierte Nukleotide um den Reaktionsverlauf näher zu untersuchen. Weiterhin sollten durch die Einführung von Punktmutationen in beiden Domänen des Enzyms mögliche Reaktionsschritte blockiert werden, wodurch die Charakterisierung von Intermediaten ermöglicht wird. Durch *soaking*-Experimente und anschließende röntgenkristallographische Untersuchungen der bereits vorhandenen Kristalle können molekulare Details zum Reaktionsmechanismus aufgeklärt werden.

Neben der Aufklärung des Reaktionsmechanismus war die Untersuchung der Substratspezifität von TobZ ein zentraler Punkt dieser Arbeit. Dazu sollten verschiedene kommerziell verfügbare AGA eingesetzt und biochemisch charakterisiert, sowie wenn möglich im Komplex mit TobZ kristallisiert werden. Weiterhin sollte die antibiotische Wirkung der Carbamoylierung der AGA nachgewiesen und der Einfluss auf die Modifizierungsreaktion einer Phosphotransferase (APH(3')) untersucht werden.

Als zweiten Vertreter der O-Carbamoyltransferasen sollte das Enzym Mj1051 aus *Methanocaldococcus jannaschii* biochemisch, enzymkinetisch und strukturell charakterisiert werden. Dabei stand die Aufklärung der Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse im Vordergrund. Die Durchführung von *soaking*-Experimenten dient der Aufklärung der Bindungseigenschaften des Enzyms gegenüber niedermolekularen Substraten, wodurch ein struktureller Vergleich zwischen Mj1051 und TobZ möglich ist.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Zentrifugen: Tischzentrifuge 1-14 (Sartorius), Biofuge pico (Heraeus), Kühlzentrifuge Universal 32 R (Hettich), Zentrifuge Avanti J-20, J-25 und J-30 (Beckman)

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

Spektrometer: UV/Vis V-630 (Jasco)

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

Chromatographische Geräte: ÄKTA FPLC (Pharmacia) mit Fraktionskollektor Frac-950 (Pharmacia), Pumpe P-1 (Pharmacia)

Chromatographiesäulen: Superdex200 HiLoad *prep grade* 16/60 (Amersham Biosciences, GE), Superdex200 HiLoad *prep grade* 26/60 (Amersham Biosciences, GE), HisTrap™ HP Säule 5 ml (Amersham Biosciences, GE), Hitrap™ Desalting 5ml

Proteinkristallisation: JBScreen Classic Kits 1-10, JBScreen JSCG++ Kits 1-4 (Jena Bioscience), Crystal Screen 1-2 (Hampton Research), Crystallization Basic Kit, - Extension Kit, - Cryo Kit, - Low Ionic Kit (Sigma-Aldrich), Morpheus (Molecular Dimension): 96 *well* CrystalQuick Platte (Greiner Bio-One), Pipettierroboter Cartesian Honeybee X8 + Cartesian Software (Zinsser Analytic), NeXtal 24 *well* Kristallisationsplatte (Qiagen)

Geräte zur Strukturaufklärung: Röntgendrehanodengenerator Rigaku Micromax 007 (Rigaku) mit konfokaler Optik Varimax VHF und Varimax HR, Detektor Saturn 944+ CCD (Rigaku) oder Rigaku R-axis IV++ (Rigaku), Imagesystem Desktop Minstrel UV (Rigaku), Mikroskop MSV266 (Leica), Cryo-System XSTREAN 2000 (Rigaku)

Sonstige Geräte: Gaulin-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 (APV), Autoklav Varioklav (H und P Labortechnik), Laminarflowbox HERA safe (Heraeus Instruments), pH Meter pH 526 (WTW), Membranpumpe ME2 (Vacuubrand), Ultraschallprozessor UP 200 S (Hielscher Ultrasonics), Analytical plus Feinwaage (OHAUS), BP 4100 S (Sartorius), Rührer CB161 und CB162 (BIBBY, Barloworld scientific), Pipetten Eppendorf Research (0,1-2,5, 0,5-10, 2-20, 2-200, 100-1000, 500-5000 µl) (Eppendorf), Rotilabo® -Spritzenfilter 0,22 µm und 0,45 µm (Roth), PCR-Cycler (Eppendorf), Zentrifugen Filtereinheiten Amicon

Ultra-4 und -15 (60 MWCO) (Millipore), DC-Kieselgelplatten 60 10x20cm ohne Farbstoff F<sub>254</sub> (Merck Millipore), DC PEI-Cellulose F<sub>254</sub>-Platten 20x20cm (Merck Millipore), Linearkammer (DESAGA), Simultan Trennkammer 200x200mm (Fischer scientific), Storage Phosphor Screen BAS-IP 20x25cm (GE Healthcare), Storm 860 Phosphorimager (GE Healthcare), 810 UNV Phosphor Image Eraser Light box (Molecular Dynamics), VP-ITC Mikrokalorimeter (Microcal LLC)

### 2.1.2 Chemikalien

Produkt	Bezugsquelle
β-Mercapoethanol	Merck
1-Butanol	Chemikalienausgabe
1-Propanol	Chemikalienausgabe
<sup>18</sup> O-Wasser (H <sub>2</sub> <sup>18</sup> O)	Sigma
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Sigma
Aceton	Roth
Adenosinmonophosphat (AMP)	Sigma
Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma
Adenosin-5'-(-thio)-triphosphat (ATPαS)	Jena Bioscience
Agar-Agar	Roth
Agarose	Roth
Aktivkohle	Roth
Ameisensäure	Sigma
Ammoniak (25%)	Chemikalienausgabe
Ammoniumperoxosulfat (APS)	Roth
Ammoniumchlorid	Roth
Ammoniumheptamolybdat	Sigma
Ammoniumsulfat	Roth
Ascorbinsäure	Roth
Bradford Reagenz	BioRad
Bromphenolblau	Roth
Borsäure	Sigma
Calciumchlorid	Merck
CASO Boullion	Roth
Carbamoylphosphat	Sigma
Cobaltchlorid	Roth
Coomassie Brilliantblau G250	Merck
D-Glukose	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka
Eisensulfat	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol	Chemikalienausgabe
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma

Formaldehyd	Roth
Glycerin	Chemikalienausgabe
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Roth
Imidazol	Merck
Isopropanol	Sigma
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kaliumisocyanat	Sigma
Kaliumsulfat	Roth
Kupfersulfat	Roth
Lithiumchlorid	Roth
<i>L</i> -Isoleucin	Roth
<i>L</i> -Leucin	Roth
<i>L</i> -Lysin	Roth
<i>L</i> -Phenylalanin	Roth
<i>L</i> -Threonin	Roth
<i>L</i> -Valin	Roth
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Roth
Maleinsäure	Roth
Manganchlorid	Roth
Methanol	Chemikalienausgabe
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth
<i>N</i> -[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethansulfonsäure (TES)	Roth
<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydroxid	Chemikalienausgabe
Nickel(II)sulfat	Roth
Phosphorpentachlorid	Sigma
Piperanzin- <i>N,N</i> -bis(2-ethansulfonsäure) (PIPES)	Roth
Polyethylenglycol (PEG)	Merck
Rotiphorese (30 % Acrylamid / 0.8 % <i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid)	Roth
Saccharose	Roth
Salzsäure (HCl)	Chemikalienausgabe
Seleno- <i>L</i> -Methionin	Sigma
Tetrabutylammoniumbromid (TBAB)	Sigma
Tetranatriumpyrophosphat	Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminoethan (TRIS)	Roth

Tyrpton	Roth
Zinksulfat	Roth

Sämtliche Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich, Merck oder Appllichem im Reinheitsgrad p.a. bezogen. Alle angegebenen wässrigen Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt.

Antibiotika:

Produkt	Hersteller
Ampicillin	Roth
Chloramphenicol	Roth
Thiostrepton	Merck
Kanamycin A	Sigma Aldrich
Kanamycin B	Sigma Aldrich
Tobramycin	Sigma Aldrich
Dibekacin	Sigma Aldrich
Geneticin (G418)	Sigma Aldrich

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

Für die Selektion der *S. lividans* TK 24 Zellen auf der SPMR-Agarplatte wurde das Antibiotikum Thiostrepton 1:100 eingesetzt (Abschnitt 2.2.10.2, S. 38)

Radioaktive Phosphatspezies:

Produkt	Spezifische Aktivität	Hersteller
$\alpha^{32}P$ -ATP	370 000 Bq/ $\mu$ L (250 $\mu$ Ci)	Perkin-Elmar
$\gamma^{32}P$ -ATP	370 000 Bq/ $\mu$ L (250 $\mu$ Ci)	Perkin-Elmar
$^{32}P$ -Dinatriumhydrogenphosphat	74 000 Bq/ $\mu$ L (2000 $\mu$ Ci)	Perkin-Elmar
$^{32}P$ -Tetranatriumpyrophosphat	370 000 Bq/ $\mu$ L (250 $\mu$ Ci)	Perkin-Elmar



## 2.1.3 Medien und Lösungen

Medien:

LB-Medium	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) NaCl
SOC-Medium	2 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM MgSO <sub>4</sub> ; 20 mM <i>D</i> -Glukose
LB-Agar	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl; 1% (w/v) Agar-Agar
TSB-Medium	3 % (w/v) CASO Bouillion
SPMR -Agar	300 mM Saccharose; 25 mM <i>D</i> -Glukose; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 50 mM MgCl <sub>2</sub> ; 20 mM TES pH 7,6 (mit NaOH eingestellt); 2 % (w/v) Agar-Agar Nach dem Autoklavieren zusätzlich: 0,2 % (v/v) Spurenelemente-Lsg; 10 mM CaCl <sub>2</sub>
M9-Minimalmedium (Sambrook und Russell, 2001)	6 g/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 3 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 1 g/L NH <sub>4</sub> Cl; 0,5 g/L NaCl; pH-Wert auf 7,4 einstellen; Nach dem Autoklavieren zusätzlich steril zugeben: 10 mL/L <i>D</i> -Glukose (40%); 1 mM MgSO <sub>4</sub> ; 1 mg/mL Thiamin; 0,1 mM CaCl <sub>2</sub> ; 3 nM (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O; 400 nM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 30 nM CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O; 10 nM CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O; 80 nM MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O; 10 nM ZnSO <sub>4</sub> ; 1 µM FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O

Für die Protoplastenherstellung aus einer Sporenkultur:

TSB/PEG8000-Medium:	3 % (w/v) CASO Bouillion; 5 % (w/v) PEG 8000 Nach dem Autoklavieren zusätzlich: 66,5 mM Glycin; 5 mM MgCl <sub>2</sub>
---------------------	--

Alle Medien wurden bei 121°C dampfsterilisiert

Stammlösungen:

IPTG:	1 M in sterilem ddH <sub>2</sub> O
Ethidiumbromid:	vorgefertigt (0,025 % (w/v))
Ampicilin:	100 mg/ml in 50 % (w/v) EtOH
Chloramphenicol:	50 mg/ml in 50 % (w/v) EtOH
Thiostrepton:	25 mg/ml in DMSO
Kanamycin A:	50 mg/ml in 50 % (w/v) EtOH

## 2.1.4 Puffer

Für die SDS-PAGE:

Es wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese nach (Laemmli, 1970) angewendet. Das Färben der Gele beruht auf der Methode nach (Fairbanks *et al.*, 1971).

2x Sammelgelpuffer:	0,88 mL 30 % Acrylamid/Bisacrylamid; 0,8 mL 0,5 M Tris pH 6,8; 2,4 mL H <sub>2</sub> O; 50 µL 10 % (w/v) SDS; 50 µL 10 % (w/v) APS; 3 µL TEMED
2x Trenngelpuffer:	4 mL 30 % Acrylamid/Bisacrylamid; 2 mL 1,5 M Tris pH 8,8; 2 mL H <sub>2</sub> O; 60 µL 10 % (w/v) SDS; 60 µL 10 % (w/v) APS; 4 µL TEMED
3x Probenpuffer:	1,2 mL 0,5 M Tris pH 6,8; 1 mL Glycerin; 2 mL 10 % (w/v) SDS; 0,5 mL (0,1 % (w/v)) Bromphenolblau, 4,8 mL ddH <sub>2</sub> O Vor der Nutzung werden 475 µL 3x Probenpuffer mit 25 µL β-Mercaptoethanol gemischt
10x Laemmli-Laufpuffer:	250 mM Tris pH 8,9; 1,9 M Glycin; 1 % (w/v) SDS
Fairbanks A:	10 % (v/v) Essigsäure; 25 % (v/v) Isopropanol; 0,05 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blau R-250
Fairbanks D:	10 % (v/v) Essigsäure

Für die Agarosegelelektrophorese:

50x TAE-Puffer:	2 M Tris pH 8,3; 1 M Essigsäure; 100 mM EDTA
5x Agarose-Probenpuffer:	50 % (v/v) Glycerin; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau (gelöst in 1x TAE)
10x MOPS-Puffer:	0,4 M MOPS (pH 7.0); 0,1 M Natriumacetat; 10 mM EDTA

Für die Protoplastentransformation:

Alle Puffer und Lösungen sollten steril filtriert werden.

Spurenelemente-Lösung:	0,1 % (w/v) ZnSO <sub>4</sub> ; 0,1 % (w/v) FeSO <sub>4</sub> ; 0,1 % (w/v) MnCl <sub>2</sub> ; 0,1 % (w/v) CaCl <sub>2</sub>
------------------------	--

Puffer P:	300 mM Saccharose; 1,45 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; Nach dem Autoklavieren zusätzlich: 0,2 % (v/v) Spurenelemente-Lsg; 0,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 250 mM CaCl <sub>2</sub> ; 25 mM TES pH 7,2 (mit NaOH eingestellt)
Puffer TM:	1 M Tris pH 8 (mit Maleinsäure eingestellt)
Puffer T:	75 mM Saccharose; 1,45 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; Nach dem Autoklavieren zusätzlich 0,2 % (v/v) Spurenelemente-Lsg.; 100 mM CaCl <sub>2</sub> ; 5 % (v/v) Puffer TM
Puffer T/PEG 1000	1 g PEG 1000 mit 1 mL Puffer T mischen

### 2.1.5 Kits

Zur Plasmidpreparation wurde der *GeneJET™ Plasmid MiniPrep Kit* von *Fermentas* verwendet. Die PCR-Produkte wurden zum einen direkt nach der PCR mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* von *Qiagen* oder nach Agarose-Gelelektrophorese mittels *Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit* von *Zymo Research* gereinigt.

Die Durchführung entsprach ohne Abweichung den entsprechenden Vorgaben der Hersteller.

### 2.1.6 Bakterienstämme und Plasmide

#### Zelllinien:

Stamm	Genotyp	Bezugquelle/Referenz
<i>E. coli XL1 blue</i>	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI ΔM15 Tn10 (tetr)]</i>	Stratagene
<i>E. coli Rosetta (DE3)</i>	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> gal λ (DE3) pRARE (Cam<sup>R</sup>)</sub>	Novagen (Studier und Moffatt, 1986)
<i>E. coli ET12567</i>	F <sup>-</sup> dam <sup>-</sup> 13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR zjj202::Tn10 recF143 galK2 galT22 ara-14 lacY1 xyl-5 leuB6 thi-1 tonA31 rpsL136 hisG4 tsx-78 mtl-1 glnV44	Novagen (MacNeil <i>et al.</i> , 1992) (Oh und Chater, 1997)
<i>Streptomyces lividans 66 TK 24</i>	<i>SLP2<sup>-</sup> SLP3<sup>-</sup></i>	(Hopwood, 1985)

Genomische DNA:

Organismus	Beschreibung	Referenz
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	DSM 2661, komplettes Genom (L77117)	Leibniz-Institut DSMZ (Jones <i>et al.</i> , 1983)

Plasmid:

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pET15bTEV	N-terminal 6x <i>His-tag</i> , TEV Schnittstelle zwischen Histag und MCS	(Ducka <i>et al.</i> , 2009)
pUWL201PW	C-terminal 6x <i>His-tag</i> , Bla <i>tsr</i> P <sub>ermE</sub> ColE1- <i>ori</i> pIJ101- <i>ori</i>	(Doumith <i>et al.</i> , 2000)

## 2.1.7 Oligonukleotide

Primer	5' → 3'
T <sup>529</sup> A_for	CCG TCT GCC TCA AC <b>G CAT</b> CGT TCA ACG ACA GG
T <sup>529</sup> A_rev	TGT CGT TGA ACG AT <b>G CGT</b> TGA GGC AGA CGG GG
R <sup>445</sup> K_for	GGG TCA AGG ACA <b>AGG</b> AGT GGT GGC GCC CG
R <sup>445</sup> K_rev	GGC GCC ACC ACT <b>CCT TGT</b> CCT TGA CCC GCA G
K <sup>443</sup> A_for	CAT CAA CCT GCG GGT <b>CGC GGA</b> CAG GGA GTG G
K <sup>443</sup> A_rev	CCA CTC CCT GTC <b>CGC</b> GAC CCG CAG GTT GAT G
N <sup>439</sup> S_for	GCG ACC ACA TC <b>T CCC</b> TGC GGG TCA AGG ACA G
N <sup>439</sup> S_rev	TTG ACC CGC AG <b>G GAG</b> ATG TGG TCG CGC ATG
N <sup>528</sup> A_for	CCC CGT CTG CCT <b>CGC AAC</b> CTC GTT CAA CGA CAG
N <sup>528</sup> A_rev	GTC GTT GAA CGA GGT <b>TGC</b> GAG GCA GAC GGG GTC
H <sup>14</sup> N_for	<b>CCC GTG</b> ACT TCA <b>ACG</b> ACG CGT CGG CGG
H <sup>14</sup> N_rev	GAC GCG TC <b>G TTG</b> AAG TCA <b>CGG</b> GGC CAG CC
Mj1051_for	CGG GGT ACC ATG ATT <b>CTC</b> GGA ATT TGT GAT GGG C
Mj1051_rev	CCG CTC GAG TTA <b>CTT CAC</b> TTT AGA AAT TAA ATA ATT CCC
pUWL201PW_for	GAT GCT GTT GTG GGC
pUWL201PW_rev	GAT TCA TTA ATG CAG AGC
Mj1051_for	CGG GGT ACC ATG ATT <b>CTC</b> GGA ATT TGT GAT GGG C
Mj1051_rev	CCG CTC GAG TTA <b>CTT CAC</b> TTT AGA AAT TAA ATA ATT CCC
T7_for	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
T7_rev	CTA GTT ATT GCT CAG CGG

Die Primer wurden mit dem Programm Generunner (<http://generunner.net>) erstellt. Die unterstrichenen und fett-markierten Nukleotide enthalten die Mutationsstellen. Die unterstrichenen und kursiven-markierten Nukleotide in H<sup>14</sup>N\_for/rev und Mj1051\_for/rev stellen stille Mutationen dar, um Sekundärstrukturen in den entsprechenden Primern zu vermeiden.

### 2.1.8 Enzyme und Standards

Enzym	Verwendung	Bezugsquelle
<i>Phusion</i> <sup>®</sup> <i>High-Fidelity</i> DNA Polymerase	Vervielfältigung von DNA	New England Biolabs
DpnI	Verdau methylierter DNA	New England Biolabs
KpnI	Verdau PCR-Produkt und pET15bTEV Vektor	New England Biolabs
XhoI	Verdau PCR-Produkt und pET15bTEV Vektor	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	Ligation von DNA-Fragmenten	New England Biolabs
Lysozym	Verdau des Murein-Sacculus der <i>Streptomyces</i> -Zellen	Sigma-Aldrich
Pyrophosphatase, Hefe (M2403S)	Spaltung von Pyrophosphat	New England Biolabs
Pyrophosphatase, thermostabil (M0296S)	Spaltung von Pyrophosphat	New England Biolabs
DNase I	Spaltung von DNA	New England Biolabs
RNase A	Spaltung von RNA	Thermo scientific

Standard	Bezugsquelle
SDS-PAGE Standard, <i>broad range</i>	Biorad
100 bp DNA <i>ladder</i>	New England Biolabs
1 kbp DNA <i>ladder</i>	New England Biolabs

## 2.2 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Plasmidpräparation und Sequenzierung

Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde zunächst eine 4 mL Übernachtskultur (37 °C) herangezogen und die Zellen durch Zentrifugation für 2 min bei 5000 g sedimentiert. Das Zellpellet wurde entsprechend der Anleitung des *GeneJET™ Plasmid MiniPrep Kit* behandelt. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µL sterilem ddH<sub>2</sub>O eluiert und die Konzentration sowie Reinheit spektroskopisch überprüft. Die isolierte DNA wurde wenn nötig durch die Firma GATC (Konstanz) sequenziert, um die Korrektheit der Sequenz und die erfolgreiche Einführung der entsprechenden Mutation zu überprüfen.

### 2.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Es wurde ein Spektrum von 240 - 340 nm gegen ddH<sub>2</sub>O mittels UV-VIS-Spektrometer aufgenommen. Aus dem Absorptionswert bei 260 nm lässt sich die Konzentration der DNA nach folgender Formel berechnen:

$$c [\text{ng}/\mu\text{l}] = A_{260} \cdot V \cdot F \quad \text{Gl.: 2-1}$$

$V$  = Verdünnungsfaktor

$F$  = Multiplikationsfaktor (dsDNA = 50 µg/mL)

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

### 2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

#### Standard-Agarose-Gelelektrophorese:

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse und Reinigung von DNA-Fragmenten verwendet. Für ein 1 %-iges Agarosegel wurden 0,5 g Agarose in 50 mL 1x TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst. In die Gelkammer wurden 2 Tropfen der Ethidiumbromidstammlösung vorgelegt und anschließend die heiße Agarose-Lösung zur Polymerisation hinzugegeben. Die Proben wurden mit 5x Agarose-Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einer Horizontal-Elektrophoresekammer bei 90 V, 500 mA, 90 W über ca. 60 min. Ethidiumbromid ist eine

aromatische Verbindung, welche zwischen die Basen der DNA interkaliert und nach Anregung bei 254 nm fluoresziert.

#### Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese:

Die denaturierende Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Trennung von RNA-beihaltenden Proben verwendet. Für ein 1 %-iges Agarosegel wurden 0,5 g Agarose in 36 mL ddH<sub>2</sub>O durch Erhitzen gelöst und anschließend mit 5 mL 10x MOPS-Puffer versetzt. Unter dem Abzug wurden zur gelösten Agarose 9 mL frisches Formaldehyd gegeben und sofort in die Gelkammer gegossen. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einer Horizontal-Elektrophoresekammer bei 90 V, 500 mA, 90 W über ca. 45 min. Im Anschluss wurde das Gel in ein Ethidiumbromidbad gelegt und für ca. 10 min inkubiert.

### 2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten und zur Einführung von Restriktionsschnittstellen für Endonukleasen eignet sich die Methode der PCR (Mullis, 1990). Als DNA-Polymerase wurde die Phusion-Polymerase eingesetzt und entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die optimale Temperatur für die Anlagerung der entsprechenden Primer wurde durch eine PCR mit Temperaturgradienten ermittelt. Die nachfolgenden Tabellen beschreiben die Bedingungen der PCR.

Ansatz:	4 µL	1x HF Polymerasepuffer	5x HF Polymerasepuffer
	0,2 µL Mj1051_for	1 µM Mj1051_for	100 µM Mj1051_for
	0,2 µL Mj1051_rev	1 µM Mj1051_rev	100 µM Mj1051_rev
	0,2 µL genomische DNA M. jannaschii		1:10 Verdünnung genomische DNA M. jannaschii DSM 2661
	0,5 µL dNTP	250 µM dNTP	10 mM dNTP
	0,2 µL Phusion Polymerase	0,4 U Phusion Polymerase	2 U/µL Phusion Polymerase
	20 µL Gesamtansatz		

Zyklus-Schritt	3-Schritt Protokoll		Zyklen
	Temperatur	Zeit	
initiale Denaturierung	98 °C	2 min	1
Denaturierung	98 °C	10 sek	41
Anlagerung	45°C-55 °C	20 sek	
Verlängerung	72 °C	1 min	
finale Verlängerung	72 °C	5 min	1

### 2.2.5 Ortsgerichtete Mutagenese der TobZ-Varianten

Die Einführung von Mutationen zur Generierung von TobZ-Varianten wurde mit Hilfe des *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* in das TobZ-Gen unter Verwendung der in Abschnitt 2.1.6 (S. 30) aufgelisteten Primern eingeführt. Die optimale Temperatur für die Anlagerung der entsprechenden Primer wurde durch eine PCR mit Temperaturgradienten ermittelt. Die nachfolgenden Tabellen beschreiben die Bedingungen der PCR.

Ansatz:	4 µL	1x GC Polymerasepuffer	5x GC Polymerasepuffer
	0,1 µL Forward_primer	0,5 µM Forward_Primer	100 µM Forward_Primer
	0,1 µL Reverse_Primer	0,5 µM Reverse_Primer	100 µM Reverse_Primer
	0,5 µL Vektor	50 ng Vektor	100 ng/µL Vektor
	0,5 µL dNTP	250 µM dNTP	10 mM dNTP
	0,2 µL Phusion Polymerase	0,4 U Phusion Polymerase	2 U/µL Phusion Polymerase
	0,25 µL – 1 µL DMSO	1,25 % - 5 % DMSO	100 % DMSO
	20 µL Gesamtansatz		

Zyklus-Schritt	3-Schritt Protokoll		Zyklen
	Temperatur	Zeit	
initiale Denaturierung	98°C	2 min	1
Denaturierung	98°C	15 sek	30
Anlagerung	60°C-80°C	30 sek	
Verlängerung	72°C	4,5 min	
finale Verlängerung	72°C	10 min	1

Nach erfolgter PCR wurden die Proben mit 0,5 µL DpnI versetzt und für mind. 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Überprüfung mittels Agarose-Gelelektrophorese.

### 2.2.6 Restriktionsverdau

Die Methode des Restriktionsverdau wurde präparativ zum Verdau von Plasmiden und PCR-Fragmenten für Ligationsreaktionen verwendet. Dazu wurde der Verdau im 50 µL Maßstab angesetzt, wobei 1 µL NdeI und 0,5 µL XhoI sowie 1x BSA zum Ansatz zugegeben und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. Anschließend erfolgte die Trennung der DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese.



## 2.2.7 Ligation von DNA Fragmenten

Für den Ligationsansatz (15  $\mu\text{L}$ ) wurden der Vektor und das Insert im Verhältnis 1:3 gemischt und entsprechend den Herstellerangaben Ligase Puffer und T4-DNA-Ligase dazugegeben. Der gesamte Ansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert und anschließend der komplette Ansatz für die Transformation in *E. coli XL1 blue* Zellen eingesetzt.

## 2.2.8 Kolonie-PCR zum Nachweis der erfolgreichen Ligation

Zum Nachweis einer erfolgreichen Ligation eignet sich die Methode der Kolonie-PCR. Als DNA-Polymerase wurde die Phusion-Polymerase eingesetzt und entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die optimale Temperatur für die Anlagerung der entsprechenden Primer beträgt 55 °C. Die nachfolgenden Tabellen beschreiben die Bedingung der PCR.

Ansatz:	4 $\mu\text{L}$	1x HF Polymerasepuffer	5x HF Polymerasepuffer
	0,2 $\mu\text{L}$ T7_for	1 $\mu\text{M}$ T7_for	100 $\mu\text{M}$ T7_for
	0,2 $\mu\text{L}$ T7_rev	1 $\mu\text{M}$ T7_rev	100 $\mu\text{M}$ T7_rev
	1 Klon von der LB-Agar-Platte		
	0,5 $\mu\text{L}$ dNTP	250 $\mu\text{M}$ dNTP	10 mM dNTP
	0,2 $\mu\text{L}$ Phusion Polymerase	0,4 U Phusion Polymerase	2 U/ $\mu\text{L}$ Phusion Polymerase
	20 $\mu\text{L}$ Gesamtansatz		

Zyklus-Schritt	3-Schritt Protokoll		Zyklen
	Temperatur	Zeit	
initiale Denaturierung	98°C	2 min	1
Denaturierung	98°C	10 sek	41
Anlagerung	55°C	20 sek	
Verlängerung	72°C	1 min	
finale Verlängerung	72°C	5 min	1

## 2.2.9 Herstellung chemokompetenter Zellen

### 2.2.9.1 Herstellung chemokompetenter *E. coli* Zellen

Aus einer Einzelkolonie wurde über Nacht bei 37 °C eine 4 mL Vorkultur (mit den entsprechenden Antibiotika versetzt) herangezogen. Eine 50 mL Hauptkultur wurde mit der Übernachtskultur angeimpft (1:100). Die Kultur wurde schüttelnd bei 37 °C inkubiert bis eine optische Dichte  $OD_{600}$  von 0,4 - 0,6 erreicht wurde. Nach einer 10-minütigen Inkubationsphase auf Eis wurden die Zellen anschließend durch Zentrifugation (15 min, 5000 g, 4 °C) geerntet, in 40 mL 0,1 M  $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und für 5 min auf Eis gelagert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 min, 5000 g, 4 °C) wurde das Zellpellet in 2 mL 0,1 M  $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und für 2 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 2 mL 50 % Glycerin gemischt, zu 200  $\mu$ L aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

### 2.2.9.2 Herstellung chemokompetenter *S. lividans* TK 24 Zellen

Die Herstellung von Protoplasten von *Streptomyces lividans* TK 24 für die Transformation erfolgte nach der Methode von (Babcock und Kendrick, 1988). Mit 5  $\mu$ L einer Sporenkultur von *S. lividans* TK 24 wurden zweimal je 20 mL TSB/PEG8000 Medium in Reagenzgläser angeimpft. Den Röhren wurde eine Metallspirale beigefügt, um die Entstehung großer Zellhaufen zu verhindern. Die *Streptomyces*-Kultur wurde für 36 - 48 h unter Schütteln bei 30 °C inkubiert und anschließend unter dem Mikroskop auf Reinheit geprüft. Es wurden 40 mL der Kultur durch Zentrifugation (15 min, 4 °C, 3000 g) geerntet und zweimal mit je 30 mL einer 10,3 %-igen Saccharoselösung gewaschen. Das Pellet wurde in 8 mL Puffer P mit 1 mg/mL Lysozym resuspendiert und bei 37 °C unter leichtem Schwenken (ca. 5 - 6 Stunden) inkubiert bis die Protoplastierung unter dem Mikroskop sichtbar war. Es wurden weitere 8 mL Puffer P (ohne Lysozym) zugegeben und die Protoplastensuspension durch eine sterile, mit Watte gefüllte Spritze filtriert, um Myzelrückstände und kleinere Zellhaufen zu entfernen. Das Filtrat wurde für 20 min bei 4 °C und 3000 g zentrifugiert und das Pellet in 1 mL Puffer P resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 mL 50 % Glycerin versetzt und die Protoplasten zu 100  $\mu$ L aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

## 2.2.10 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

### 2.2.10.1 Transformation von *E. coli* Zellen

Die kompetenten Zellen des entsprechenden *E. coli*-Stammes wurden mit 0,5 µL DNA (ca. 100 ng/µL) bzw. des kompletten Ligations- oder Mutageneseansatzes versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 90 Sekunden auf 42 °C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden mit 800 µL SOC Medium versetzt und für 45 min unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden mit 40 µL eine 4 mL Vorkultur angeimpft oder der komplette Ansatz für 2 min (3000 g, RT) pelletiert. Anschließend wurden ca. 600 µL Überstand verworfen und das Pellet in dem verbleibenden Medium resuspendiert. Zum Schluss erfolgte das Ausplattieren der Zellsuspension auf eine LB-Agarplatte mit den entsprechenden Antibiotika, die über Nacht bei 37°C inkubiert wurde.

### 2.2.10.2 Transformation von *S. lividans* TK 24 Zellen

Ein Aliquot Protoplasten wurde aufgetaut, anschließend ca. 5 µL DNA hinzugegeben (mind. 3 µg, max. 100 µg) und schnell mit 200 µL T/PEG1000-Puffer gemischt. Nach Zugabe von 1 mL Puffer P wurde die Suspension auf einer SPMR-Agarplatte ausplattiert und bei 30 °C inkubiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Agarplatte nicht vollständig abgedichtet ist, um eine Eintrocknung der Suspension zu erreichen. Nach 16 - 24 h wurde die Agarplatte mit 2 mL einer Thiostreptonlösung (250 µg/mL) überschichtet und für weitere 2 - 3 Tage bei 30 °C bebrütet.

## 2.3 Proteinchemische Methoden

### 2.3.1 Expression von Mj1051 in *E. coli* Rosetta (DE3) Zellen

Für Testexpressionen von Mj1051 wurden 40 µL der transformierten *E. coli* Zellen in eine 4 mL Vorkultur überführt und mit den entsprechenden Antibiotika versetzt. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und 150 rpm wurde eine 50 mL Hauptkultur 1:100 angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C und unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Die Induktion erfolgte bei einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von ca. 0,7 durch Zugabe von 0,5 mM IPTG. Anschließend wurden die Kulturen für weitere 6 Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert und daraufhin geerntet.

Die Großexpression von Mj1051 erfolgte in 4x 5 L Kolben im 1,5 L Maßstab. 500 µL transformierten *E. coli* Zellen wurden in eine 50 mL Vorkultur überimpft und mit den entsprechenden Antibiotika versetzt. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und 200 rpm wurde die Hauptkultur (1,5 L) 1:100 angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C und unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Die Induktion erfolgte bei einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von ca. 0,7 durch Zugabe von 0,5 mM IPTG. Anschließend wurden die Kulturen für weitere 4 Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert und daraufhin geerntet.

### 2.3.2 Expression von SeMj1051 in *E. coli* Rosetta (DE3) Zellen

Die Expression von SeMj1051 basiert auf einem bereits publizierten Protokoll, jedoch entsprechen die Bedingungen den in Abschnitt 2.3.1 (S. 38) (Van Duyne *et al.*, 1993). Das M9-Minimalmedium wird erst für die Großexpression im 1x 1 L Maßstab verwendet und 1 : 500 angeimpft. Circa eine halbe Stunde bevor die optische Dichte den Wert von 0,7 erreicht, werden jeweils 0,1 g *L*-Lysin, *L*-Threonin, *L*-Phenylalanin, sowie 0,05 g *L*-Leucin, *L*-Isoleucin, *L*-Valin und Seleno-*L*-Methionin zugegeben, um die *feedback*-Inhibition der Methioninbiosynthese zu starten.

### 2.3.3 Expression von TobZ in *S. lividans* TK 24 Zellen

Für Testexpressionen von TobZ wurden die transformierten *Streptomyces*-Zellen von einer SPMR-Agar-Platte in Reagenzgläsern mit ~20 mL TSB-Medium und Thiostrepton (25 µg/mL), das sowohl als Antibiotika und auch als Induktionsmittel dient, überimpft. Die Kultur wurde bei 30 °C und unter Schütteln (200 rpm) für max. 72 h inkubiert und daraufhin geerntet. Den Röhren wurde eine Metallspirale beigefügt, um die Entstehung größerer Zellhaufen zu verhindern.

Für eine Expression im größeren Maßstab wurden 4 Vorkulturen à 20 mL für 72 h angezogen und anschließend in 4x 5 L Erlenmeyerkolben mit Schikane, in denen max. 1 L TSB-Medium vorgelegt wurde, überführt. Anschließend wurde wieder Thiostrepton (25 µg/mL) als Selektions- und Induktionsmittel zugegeben. Die Hauptkultur wurde bei 30 °C und mind. 110 rpm für bis zu 72 h inkubiert und daraufhin geerntet. Der Einsatz von Erlenmeyerkolben mit Schikane erwies sich als unabdingbar um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten und die Bildung größerer Zellhaufen zu verhindern.

### 2.3.4 Zellernte und Aufschluss

Die Kulturen der Testexpressionen wurden in 50 mL Aliquots bei 8500 g und 4 °C für 15 min in sterilen Falcons zentrifugiert und das Pellet anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die *E. coli*-Kulturen im 1,5 L Maßstab wurden in 1 L Zentrifugenbecher aufgeteilt und bei 4000 g und 4 °C für 30 min abzentrifugiert. Die *Streptomyces*-Kulturen im 1 L Maßstab wurden in 500 mL Zentrifugenbecher aufgeteilt und bei 11000 g und 4 °C für 30 min abzentrifugiert. Die pelletierten *Streptomyces*-Zellen neigen dazu, sich unmittelbar nach Abschluss des Zentrifugationsvorgangs vom Boden zu lösen. Allgemein wurde das Zellpellet in 10 - 15 g Feuchtmasse pro 50 mL Falcon aufgeteilt und ebenfalls bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Testexpressionsproben wurden mit Hilfe von Ultraschall aufgeschlossen. Das Zellpellet wurde in 200 µL Resuspensionspuffer (T/M)A aufgenommen und anschließend mit 4 Passagen á 10 Impulse (60% Amplitude, 0,5 Sekunden Interwall) aufgeschlossen.

Für den Zellaufschluss der Großexpression wurde das Zellpellet (ca. 10 g – 15 g Feuchtmasse) in 35 mL des IMAC-Puffers (T/M)A aufgenommen und ca. 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,5 µl Benzonase zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mittels Hochdruckdispersion im semikontinuierlichen Betrieb bei 3 - 4 Durchläufen aufgeschlossen. Der lösliche Überstand wurde durch Zentrifugation bei 75000 g und 4 °C für 45 min von den unlöslichen Zellbestandteilen abgetrennt.

#### Resuspensionspuffer für TobZ:

Puffer TA: 20 mM Tris pH 7,6 (25°C), 300 mM NaCl, 12,3 % (w/v) Glycerin

#### Resuspensionspuffer für Mj1051:

Puffer MA: 20 mM Tris pH 7,6 (25°C), 300 mM NaCl

### 2.3.5 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie

Zur Reinigung wurde eine 5 mL HisTrap™ HP Säule verwendet. Das Säulenmaterial wurde zunächst mit 3 Säulenvolumen Puffer (T/M)A mit 4 % Puffer (T/M)B äquilibriert. Zu der Probe wurden 20 mM Imidazol hinzugefügt um eine unspezifische Bindung von Wirtsproteinen und die dadurch entstehende mögliche Blockierung der Bindestellen der *HisTrap*-Säule zu vermeiden. Anschließend erfolgte das Auftragen auf die Säule bei einer Flußgeschwindigkeit von max. 2,5 mL/min. Es wurde mit Puffer (T/M)A mit 4 % Puffer (T/M)B gewaschen bis die Absorption A<sub>280</sub> ca. 500 mAU (Schichtdicke der Messzelle: 1 cm) erreicht war. Für die Reinigung wurde ein Stufengradient genutzt, bei dem die Konzentration von Puffer (T/M)B auf 8 % bzw. 15 % erhöht wurde bis A<sub>280</sub> ca. 150 mAU (Schichtdicke der Messzelle: 1 cm) erreicht hatte. Die Elution des Proteins erfolgte mit einer Konzentration von 40 % Puffer (T/M)B (200 mM Imidazol) über 2 - 3 Säulenvolumen.

Für den zweiten Reinigungslauf von Mj1051 wurde die Säule mit Puffer MA äquilibriert. Nach dem Probenauftrag wurde mit Puffer MA gewaschen, bis  $A_{280}$  ca. 150 mAU (Schichtdicke der Messzelle: 1 cm) erreicht hatte. Anschließend wurde die Säule mit Puffer MD gewaschen bis die Absorption wiederum 150 mAU erreichte. Anschließend erfolgte die Elution des Proteins mit einer Konzentration von 40 % Puffer MB (200 mM Imidazol) über 2 - 3 Säulenvolumen

#### IMAC-Puffer TobZ:

Puffer TA: 20 mM Tris pH 7,6 (25°C), 300 mM NaCl, 12,3 % (w/v) Glycerin

Puffer TB: 20 mM Tris pH 7,6 (25°C), 300 mM NaCl, 12,3 % (w/v) Glycerin, 500 mM Imidazol

#### IMAC-Puffer Mj1051:

Puffer MA: 20 mM Tris pH 7,6 (25°C), 300 mM NaCl

Puffer MB: 20 mM Tris pH 7,6 (25°C), 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol

Puffer MD: 20 mM Tris pH 7,6 (25°C), 1 M NaCl

### 2.3.6 Größenausschlusschromatographie

Die Methode der Größenausschlusschromatographie (SEC) oder Gelfiltration besteht in der Auftrennung der Proteine anhand ihres hydrodynamischen Radius oder „Stokesradius“. Je nach Ausbeute der immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie wurden die Säulen Superdex 200 HiLoad *prep grade* 26/60 sowie Superdex 200 HiLoad *prep grade* 16/60 für die Größenausschlusschromatographie genutzt. Die Säule wurde zunächst mit mindestens 1,2 Säulenvolumen des Puffers (T/M)C äquilibriert und anschließend die Proteinprobe mit einem max. Volumen von 3 % des Säulenvolumens aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte mit einer Flußgeschwindigkeit von 1 - 1,5 mL/min (je nach Säule) über 1,2 Säulenvolumen.

#### SEC-Puffer TobZ:

Puffer TC: 20 mM Tris pH 7,6 (25°C), 150 mM NaCl, 12,3 % (w/v) Glycerin

#### SEC-Puffer Mj1051:

Puffer MC: 20 mM Tris pH 7,6 (25°C), 300 mM NaCl

### 2.3.7 Entsalzungschromatographie

Einige Mutanten von TobZ (Anhang 2, S. 162) neigten nach der Reinigung mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie zur Aggregation. Daher wurden die Proben mittels 5 hintereinander geschalteten 5 mL *Desalting*-Säulen äquilibriert mit Puffer TC (20 mM Tris pH 7,6 (25°C), 150 mM NaCl, 12,3 % (w/v) Glycerin) von überschüssigem NaCl und Imidazol getrennt. Dabei wurden max. 6 mL mit einer Flussgeschwindigkeit von 2,5 – 3 mL/min auf die Säule aufgetragen. Da die Entsalzungschromatographie nur für Mutanten von TobZ eingesetzt wurde, die zur Aggregation neigten, erfolgte für diese Varianten im Anschluss keine Größenausschlusschromatographie.

Für Mj1051 wurde nach der zweiten IMAC ebenfalls eine Entsalzungschromatographie durchgeführt. Die Durchführung entsprach dabei der für TobZ, wobei Puffer MC (20 mM Tris pH 7,6 (25°C), 300 mM NaCl) verwendet wurde.

### 2.3.8 Proteinkonzentrierung

Für die Konzentrierung von Proteinlösungen wurden Zentrifugen Filtereinheiten Amicon Ultra-4 bzw. -15 mit einem Ausschlussvolumen von 60 MWCO verwendet und bei 4900 g und 4 °C aufkonzentriert. Dabei wurde eine Proteinkonzentration von 15 mg/mL nicht überschritten.

## 2.4 Biophysikalische Charakterisierung

### 2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

#### 2.4.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay

Der Bradford-Assay eignet sich zur Konzentrationsbestimmung von Proteingemischen (Bradford, 1976). Das Absorptionsmaximum des in dieser Lösung vorhandenen Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau wird in Anwesenheit von Proteinen von 465 nm nach 595 nm verschoben. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird 560 µL H<sub>2</sub>O und 140 µL Bradford-Reagenz mit der Menge an Protein gemischt, die bei A<sub>595</sub> eine Extinktion von 0,3 - 0,6 bewirkt. Die Proteinkonzentration wird über die folgende Formel berechnet.

$$c \text{ [mg/mL]} = A_{595} \cdot 11,66 / V_{\text{probe}}$$

Gl.: 2-2

## 2.4.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels UV/Vis-Spektroskopie

Der molare Absorptionskoeffizient  $\epsilon$  bei 280 nm lässt sich über die Aminosäuresequenz berechnen und ist für jedes Protein spezifisch (Edelhoch, 1967; Gill und von Hippel, 1989). In dieser Arbeit wurden die Absorptionskoeffizienten mit Hilfe des Programmes Protparam des *ExPASy Proteomics Servers* berechnet (Gasteiger *et al.*, 2005). Anhand des Lambert-Beerschen Gesetzes (Gl. 2-3) ließ sich aus der ermittelten Absorption die Konzentration der Proteinprobe errechnen (Pace *et al.*, 1995).

$$A = \epsilon * c * d \quad \text{Gl.: 2-3}$$

$A$  = gemessene Absorption

$\epsilon$  = molarer Absorptionskoeffizient ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) bzw.

spezifischer Absorptionskoeffizient ( $mL \cdot mg^{-1} \cdot cm^{-1}$ )

$$\epsilon_{Tobz\ WT} = 85955 \text{ (} M^{-1} \cdot cm^{-1} \text{) bzw. } 1,36 \text{ (} mL \cdot mg^{-1} \cdot cm^{-1} \text{)}$$

$$\epsilon_{Mj1051} = 40020 \text{ (} M^{-1} \cdot cm^{-1} \text{) bzw. } 0,66 \text{ (} mL \cdot mg^{-1} \cdot cm^{-1} \text{)}$$

$c$  = molare Konzentration der Probe (M) bzw. Massenkonzentration (mg/mL)

$d$  = Küvettenschichtdicke (cm)

## 2.4.2 SDS-PAGE

Es wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-PAGE angewendet (Laemmli, 1970). Die Gele bestanden aus einem Sammelgel mit einer Acrylamidkonzentration von 5 % und einem Trenngel, welches eine Acrylamidkonzentration von 15 % hatte. Zur Analyse der Expression wurde die optische Dichte  $OD_{600}$  gemessen und 1 mL Medium zentrifugiert. Um vergleichbare Bandenintensitäten auf dem SDS-Gel zwischen den verschiedenen Proben zu erhalten, wurde das Pellet mit einer der optischen Dichte entsprechenden Menge an reduzierenden Ladepuffer resuspendiert. Die erforderliche Menge wurde nach folgender Formel berechnet.

$$OD_{600} * 50 \mu L = \text{Menge an reduzierenden Ladepuffer} \quad \text{Gl.: 2-4}$$

Anschließend wurde die Probe bei 95 °C für 5 min inkubiert und 15  $\mu$ L auf ein SDS-Gel geladen. Für Zellysat und Durchflussproben von Metallchelate-Affinitätsreinigungen wurden 30  $\mu$ g auf das Gel aufgetragen. Zur Analyse von Proteinproben wurden 6 - 10  $\mu$ g aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel. Anschließend erfolgte die Detektion der Proteinbanden mittels Coomassiefärbung (Wong *et al.*, 2000).



## 2.5 Aktivitätsnachweis

## 2.5.1 Aktivitätsnachweis mittels Dünnschichtchromatographie

Kieselgel-Dünnschichtchromatographie:

Der Nachweis der Aktivität von TobZ, aufgrund der Carbamoylierung von Aminoglykosid-Antibiotika, basierte auf einem bereits etablierten Protokoll (Clausnitzer, 2010). Der Puffer TC (20 mM Tris pH 7,6 (25 °C), 150 mM NaCl, 12,3 % (w/v) Glycerin) diente dabei als Reaktionspuffer. Der Standard-Reaktionsansatz wurde wie folgt erstellt:

- 5 mM Aminoglykosid-Antibiotika
- 5 mM ATP
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- 10 mM Carbamoylphosphat
- 20 µM TobZ

Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 30 µL und wurde bei 30 °C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 4x 0,5 µL manuell leicht versetzt pipettiert, wobei als stationäre Phase eine Kieselgel 60 Glasplatte ohne Fluoreszenz-Farbstoff genutzt wurde. Dabei wurden die Spots ca. 0,5 cm voneinander und 3 cm vom Rand der Platte aufgetragen. Frühestens 30 Minuten nach dem Auftragen der letzten Probe erfolgte die Trennung über ein Gemisch aus 1-Propanol: Methanol: (Ammoniak (25 %)) (25:23:20) als mobile Phase (Yu *et al.*, 2008). Die Laufstrecke betrug ca. 4,5 cm. Als Laufkammer wurde eine Linearkammer zur horizontalen Entwicklung genutzt. Aufgrund der leicht flüchtigen Lösungsmittel und des geringen Volumens der Laufkammer war die Dampfphase zügig gesättigt, wodurch keine vorherige Inkubation nötig war. Nach der Entwicklung erfolgte die Trocknung bei ca. 140 °C für ca. 10 Minuten. Die DC-Platten wurden bei RT abgekühlt und anschließend zur Detektion der Aminoglykosid-Antibiotika in eine Lösung von 0,3 % (w/v) Ninhydrin, gelöst in 1-Butanol und versetzt mit 3,15 % (w/v) Eisessig, getaucht. Zur Farbentwicklung wurde die Platte anschließend wieder auf 140 °C erhitzt. Die densitometrische Auswertung der Chromatogramme wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm durchgeführt.

Je nach experimentellem Ansatz wurden folgende Komponenten verändert. Dazu zählen:

- |   |   |
|---|---|
| 5 mM ATP $\alpha$ S anstatt 5 mM ATP              | (Abbildung 34, S. 72)   |
| 2,5 mM ADP zum Ansatz                             | (Abbildung 22, S. 58)   |
| 0,05 U PP <sub>i</sub> -ase (aus Hefe) zum Ansatz | (Abbildung 34, S. 72; Abbildung 51, S. 87; Abbildung 54, S. 90) |
| 5 mM dATP anstatt 5 mM ATP                        | (Abbildung 34, S. 72)   |
| 2,5 mM PP <sub>i</sub> zum Ansatz                 | (Abbildung 54, S. 90)   |

Ionenaustausch-Dünnschichtchromatographie:

Der Nachweis der Aktivität von TobZ aufgrund des Umsatzes von radioaktiv-markierten Nukleotiden ( $\alpha^{32}P$ -ATP und  $\gamma^{32}P$ -ATP) sowie Phosphatspezies ( $^{32}P$ -PP<sub>i</sub> und  $^{32}P$ -CP) erfolgte mittels Ionenaustausch-Dünnschichtchromatographie. Der Puffer TC (20 mM Tris pH 7,6 (25 °C), 150 mM NaCl, 12,3 % (w/v) Glycerin) diente dabei als Reaktionspuffer. Der Standard-Reaktionsansatz wurde wie folgt erstellt:

5 mM Tobramycin  
 5 mM ATP  
 10 mM MgCl<sub>2</sub>  
 10 mM Carbamoylphosphat  
 20 µM TobZ

Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 25 µL und wurde bei 30 °C inkubiert. Für die Reaktion mit  $^{32}P$ -CP wurden ca. 1,7 µL des Syntheseansatzes aus Abschnitt 2.9 (S. 49) anstatt des kommerziellen CP verwendet. Die radioaktiv-markierten Nukleotide wurden 1:10 verdünnt und anschließend 1 µL zur Reaktion gegeben. Zum Ansatz mit  $\gamma^{32}P$ -ATP wurde nach 1 Stunde 0,005 U PP<sub>i</sub>-ase (aus Hefe) hinzugefügt. Als Nukleotid-Referenz wurde 1 µL  $\alpha^{32}P$ -ATP mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> in ca. 20 µL Ansatz versetzt und 50 min bei 95 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 20 µM TobZ hinzugefügt und anschließend 2x 0,5 µL auf die Platte aufgetragen. Als Phosphat-Referenz wurden 1 µL Na<sub>2</sub>H<sup>32</sup>PO<sub>4</sub> und 20 µM TobZ in ca. 20 µL Ansatz gemischt und anschließend ebenfalls 2x 0,5 µL auf die Platte aufgetragen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 2x 0,5 µL manuell leicht versetzt pipettiert, wobei als stationäre Phase eine PEI-Cellulose F<sub>254</sub> Platte auf Plastikfolie genutzt wurde. Dabei wurden die Spots ca. 0,5 cm voneinander und 3 cm vom Rand der Platte aufgetragen. Frühestens 30 Minuten nach dem Auftragen der letzten Probe erfolgte die Trennung über ein Gemisch aus 0,5 M LiCl und 1 M Ameisensäure. Die Laufstrecke betrug ca. 18,5 cm.

Für die PP<sub>i</sub>-Austauschreaktion wurde folgender Ansatz erstellt:

0 mM Tobramycin  
 1 mM ATP  
 1 mM PP<sub>i</sub>  
 10 mM MgCl<sub>2</sub>  
 10 mM Carbamoylphosphat  
 20 µM TobZ

Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 25 µL und wurde bei 30 °C inkubiert. Das radioaktiv-markierte  $^{32}P$ -PP<sub>i</sub> wurde 1:10 verdünnt und anschließend 1 µL zur Reaktion gegeben. Als Pyrophosphat-Referenz wurde 1 µL der 1:10 Verdünnung von  $^{32}P$ -PP<sub>i</sub> und 20 µM TobZ in ca. 20 µL Ansatz gemischt und anschließend ebenfalls 2x 0,5 µL auf die Platte aufgetragen.

2.5.2 Aktivitätsnachweis mittels *rp*-HPLC

Die Adenosinnukleotide lassen sich über ein Anionenaustausch-*rp*-HPLC-Verfahren trennen und mittels UV-Absorption des Purinringsystems detektieren. Als Grundlage für die Anwendung wurde ein bereits bestehendes Protokoll zur Trennung von Nukleotiden der Firma Sigma Aldrich verwendet, welches die Trennung aller üblichen Mono-, Di- und Triphosphat-Nukleotide erlaubt (<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Bulletin/4541.pdf>; Figure F). Puffer HA: 30 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,5, 10 mM TBAB; Puffer HB: Methanol. Nachfolgend ist ein Chromatogramm gezeigt, welches die zu erwartenden Adenosin-Spezies zeigt.

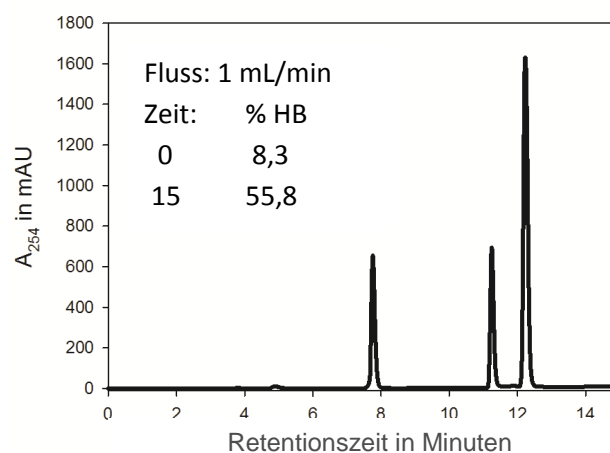


Abbildung 18: *rp*-HPLC-Analyse der Trennung von AMP, ADP und ATP

Dargestellt ist ein Chromatogramm der Trennung der Adenosinnukleotide AMP, ADP und ATP über eine Supelcosil LC18-T-Säule unter Nutzung eines Anionenaustausch-Laufmittels. Der angewendete Gradient ist in der Abbildung vermerkt. 10 µL mit 1 mM AMP, 1 mM ADP, 3 mM ATP.

Es ergibt sich eine Retentionszeit für AMP bei ca. 8 min, für ADP bei ca. 11,5 min und für ATP bei ca. 12,3 min. Zusätzlich wurden Läufe mit nur einer Adenosin-Spezies durchgeführt, die ebenfalls die Nukleotid-Identität bestätigten (nicht gezeigt). Zur Auswertung der Chromatogramme werden die Flächen der Peaks bestimmt und das Verhältnis zwischen den Spezies berechnet.

Der Puffer (T/M)C diente dabei als Reaktionspuffer. Der Standard-Reaktionsansatz wurde wie folgt erstellt:

**Ansatz für TobZ bei 30 °C**  
 5 mM Aminoglykosid-Antibiotika  
 5 mM ATP  
 10 mM MgCl<sub>2</sub>  
 10 mM Carbamoylphosphat  
 20 µM TobZ

**Ansatz für Mj1051 bei 60 °C**  
 0,05 U PP<sub>i</sub>-ase (thermophil)  
 5 mM ATP  
 10 mM MgCl<sub>2</sub>  
 30 mM Carbamoylphosphat  
 50 µM Mj1051

Die Zugabe von PP<sub>i</sub> bzw. einer PP<sub>i</sub>-ase zu den TobZ-beinhaltenden Reaktionsansätzen erfolgte entsprechend 2.5.1 (S. 44).

Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 3  $\mu\text{L}$  Probe 1:10 mit 3 mM EDTA-Lsg. verdünnt und für 3 Minuten bei 80 °C erhitzt. Nach erfolgter Zentrifugation (16000 g, RT, 5 min) wurden 10  $\mu\text{L}$  des Überstandes auf die *rp*-HPLC-Säule geladen.

## 2.6 Massenspektrometrische Analyse der Substanzen

Die massenspektrometrische Analyse von Nebramycin 5' sowie der  $^{18}\text{O}$ -markierten Substanzen  $^{18}\text{O}$ -CP,  $^{18}\text{O}$ -AMP und  $^{18}\text{O}$ -Nebramycin 5' wurde freundlicher Weise von Dr. Christoph Böttcher übernommen. Zur Vorgehensweise, siehe (Parthier *et al.*, 2012).

## 2.7 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Da die Bindungsvorgänge von Liganden an Proteine mit einer Änderung der Wärme in Form von exothermischen bzw. endothermischen Prozessen einhergehen, stellt die Isothermale Titrationskalorimetrie eine universelle Methode zur thermodynamischen Charakterisierung dar. Aufbau und die Wirkungsweise eines Kalorimeters kann den folgenden Publikationen entnommen werden (Cooper, 1999; Freyer und Lewis, 2008; Wiseman *et al.*, 1989). Dabei können aus einem Bindungsexperiment die Bindungsenthalpie  $\Delta_{\text{B}}H$ , die Assoziationskonstante  $K_{\text{A}}$ , daraus resultierend über die Van-'t-Hoff-Gleichung die freie Bindungsenthalpie  $\Delta_{\text{B}}G$ , über die Gibbs-Helmholtz-Gleichung die Bindungsentropie  $\Delta_{\text{B}}S$  sowie die Stöchiometrie  $n$  bestimmt werden.

Die Bindungsstudien wurden an einem VP-ITC Mikrokalorimeter durchgeführt. In Vorbereitung wurde das Enzym TobZ zweimal bei 4 °C gegen den Puffer TD (20 mM Tris pH 7,6 (25°C), 150 mM NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 12,3 % (w/v) Glycerin) in einem Verhältnis von 1:100 dialysiert.

Die Bindungsexperimente wurden bei 20 °C und einer Rührgeschwindigkeit von 220 U/min durchgeführt. Dabei wurden folgende Konzentration in der Spritze und Zelle verwendet:

Bindungsexperiment	Titrant (Spritze)	Analyt (Zelle)
CP an TobZ <i>wt</i>	3 mM CP	174 $\mu\text{M}$ TobZ <i>wt</i>
ATP an TobZ T <sup>529</sup> A	2 mM ATP	88 $\mu\text{M}$ TobZ T <sup>529</sup> A 0,5 mM CP
Tobramycin an TobZ <i>wt</i>	2 mM Tobramycin	140 $\mu\text{M}$ TobZ <i>wt</i> 1 mM AMP
Dibekacin an TobZ <i>wt</i>	2 mM Dibekacin	111 $\mu\text{M}$ TobZ <i>wt</i> 1 mM AMP
G418 an TobZ <i>wt</i>	2 mM G418	130 $\mu\text{M}$ TobZ <i>wt</i> 1 mM AMP

In den Experimenten (außer CP an TobZ *wt*) wurden in 300 bzw. 500 Sekunden-Intervallen in den ersten 9 Injektionen 8  $\mu\text{L}$  und in den 20 weiteren 11  $\mu\text{L}$  Titrant zu der Analytlösung zugegeben. Im verbleibenden Experiment wurden in 300 Sekunden-Intervallen  $29 \times 10 \mu\text{L}$  Titrant zur Analytlösung titriert. Die Datenauswertung erfolgte mit dem bereitgestellten Software-Paket (Indyk und Fisher, 1998).

## 2.8 Analytische Ultrazentrifugation

Die Methode der analytischen Ultrazentrifugation (aUZ) eignet sich um die molare Masse von Proteinen in Lösung zu bestimmen, woraus Rückschlüsse auf den Oligomerisierungszustand des Proteins unter den verwendeten Bedingungen gezogen werden können. Unter Nutzung der aUZ können zwei Experimente durchgeführt werden; zum einen kann die Sedimentationsgeschwindigkeit (durch eine hohe Zentrifugalkraft des Rotors) bestimmt werden kann, woraus sich der Sedimentationskoeffizient ermitteln lässt. Zum anderen können Sedimentationsgleichgewichtsläufe durchgeführt werden, bei der die Probe zuvor durch eine hohe Zentrifugalkraft zum Boden des Gefäßes gebracht wird, woraufhin unter niedrigeren Geschwindigkeiten des Rotors eine exponentielle Verteilung des Proteins in der Messzelle erreicht werden kann. Die Verteilung ist abhängig von der molaren Masse des Proteins, aber unabhängig von der äußeren Form.

Der Zusammenhang und die Berechnung der entsprechenden Parameter aus den analytischen Ultrazentrifugationsläufen geht auf die Theorie von Theodor Svedberg zurück (Svedberg, 1934)

Folgende Proben wurden für TobZ unter Nutzung des Puffers TD (20 mM Tris pH 7,6 (25 °C), 150 mM NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 12,3 % (w/v) Glycerin) erstellt:

1. 5  $\mu\text{M}$  TobZ *wt*
2. 5  $\mu\text{M}$  TobZ *wt* + 500  $\mu\text{M}$  von jeweils CP + ADP + Tobramycin
3. 5  $\mu\text{M}$  TobZ *wt* + 500  $\mu\text{M}$  CP
4. 5  $\mu\text{M}$  TobZ *wt* + 500  $\mu\text{M}$  ADP
5. 5  $\mu\text{M}$  TobZ *wt* + 500  $\mu\text{M}$  von jeweils ADP + Tobramycin
6. 5  $\mu\text{M}$  TobZ *wt* + 500  $\mu\text{M}$  CP + ADP

Folgende Probe wurde für Mj1051 unter Nutzung des Puffer MC (20 mM Tris pH 7,6 (25 °C), 300 mM NaCl) erstellt:

7,5  $\mu\text{M}$  Mj1051

Unabhängig vom eingesetzten Protein wurde eine Rotorgeschwindigkeit für die Sedimentationsgleichgewichtsläufe von 10000 rpm gewählt. Die Läufe wurden bei 20 °C durchgeführt.

Die Zentrifugationsläufe sowie die Auswertung zur Bestimmung der molaren Massen wurden freundlicherweise von PD Dr. Hauke Lilie an einer analytischen Ultrazentrifuge (Optima XL-A, Beckman Coulter GmbH) durchgeführt.

## 2.9 Synthese von markiertem CP

### Synthese von $^{32}\text{P}$ -CP:

Da  $^{32}\text{P}$ -CP kommerziell nicht verfügbar war, wurde die Synthese selbstständig durchgeführt. Dazu wurden 27  $\mu\text{L}$  0,5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 4,5 mit 1  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$  und 11,3  $\mu\text{L}$  2 M Kaliumisocyanat und 5,8  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O gemischt und für 30 min bei 30 °C inkubiert (Spector *et al.*, 1957; Mokrasch *et al.*, 1960).

### Synthese von teilweise markiertem $^{18}\text{O}$ -CP:

Zur Synthese von teilweise markiertem  $^{18}\text{O}$ -CP wurden 225  $\mu\text{L}$   $^{18}\text{O}$ -markiertes Wasser ( $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ) und 520 mg festes Phosphorpentachlorid ( $\text{PCl}_5$ ) im Eisbad vermischt. Die Reaktion verläuft stark exotherm zur Produktbildung von  $^{18}\text{O}$ -markierter Phosphorsäure ( $\text{H}_3\text{P}^{18}\text{O}_4$ ) und Salzsäure. Der Ansatz wurde für 20 min stehen gelassen und anschließend auf ca. 70 °C für eine Stunde erhitzt. Das Volumen der Probe wurde mittels Pipette gemessen und anschließend auf ca. 0,5 M  $\text{H}_3\text{P}^{18}\text{O}_4$  (ca. 5 mL) verdünnt, währenddessen der pH-Wert auf ca. 4,5 mittels 0,5 M NaOH-Lösung (ca. 0,5 mL) eingestellt wird. Im Anschluss erfolgte die Synthese analog zur  $^{32}\text{P}$ -CP-Synthese unter Einsatz von Kaliumisocyanat bei 30 °C für 30 min.

Die Überprüfung der Synthese wurde anhand eines selbsterstellten Nachweises durchgeführt (Abbildung 31, S. 70). In der Literatur wurde ein mögliches Trennverfahren beschrieben, jedoch erschien die Trennung von ionischen Verbindungen mittels Papierchromatographie als eher ungeeignet (Wood, 1961). Daher wurde auf die bereits genutzte Ionenaustausch-Dünnschichtchromatographie zurückgegriffen, die eine großzügige Trennung der Nukleotide, sowie der Phosphat-Spezies ermöglichte. Als stationäre Phase diente eine PEI-Cellulose  $\text{F}_{254}$  Platte auf Plastikfolie. Die Probe wurde 1:50 verdünnt und anschließend 2x 0,5  $\mu\text{L}$  ca. 0,5 cm voneinander und 3 cm vom Rand der Platte aufgetragen. Frühestens 30 Minuten nach dem Auftragen der letzten Probe erfolgte die Trennung über ein Gemisch aus 0,5 M LiCl und 1 M Ameisensäure. Die Laufstrecke betrug ca. 18,5 cm.

Der Nachweis von CP und Phosphat gelang anhand des etablierten Phosphatnachweises (Lowry and Lopez, 1946). Dazu wurden 10 mM Ammoniummolybdat in 1 M Essigsäure pH 3 gelöst und anschließend die DC-Platte vollständig eingetaucht. Nach der Trocknung bei 60 °C im Trockenschrank wurde nach Abkühlen die Platte in eine 100 mM Ascorbinsäure-Lsg. getaucht. Die Farbentwicklung erfolgte während der Trocknung bei RT. Die densitometrische Bestimmung der Bandenintensität erfolgte bei 600 nm.

Der Einsatz von  $^{18}\text{O}$ -CP zur Carbamoylierungsreaktion ist in Anhang 5, S. 166 dargestellt. Aufgrund des 50 %-igen Umsatzes zu  $^{18}\text{O}$ -CP wurden 20 mM  $^{18}\text{O}$ -CP anstatt 10 mM CP eingesetzt.

## 2.10 Bioautographie

Zur Identifizierung antibiotisch aktiver Substanzen eignet sich die Bioautographie. Dazu wurde eine Kieselgel 60 Platte auf Plastikfolie genutzt. Nach erfolgter Dünnschichtchromatographie wurde die Platte ungefärbt in eine Petrischale gelegt. Anschließend wurden 10 mL LB-Agar in der Mikrowelle erhitzt und nach kurzem Abkühlen mit 2 mL einer *E. coli* Übernachtskultur gemischt und sofort über die Platte gegossen. Nach ca. 4 Stunden bei 37 °C waren Hemmspots ersichtlich. Zur besseren Darstellung diente die Detektion der intrinsischen Fluoreszenz der *E. coli*-Zellen bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm und einer Emissionswellenlänge von 509 nm (Renggli *et al.*, 2013).

## 2.11 Kristallisation und Röntgenkristallstrukturanalyse

### 2.11.1 Kristallisation von Proteinen

Um die dreidimensionale Struktur von Proteinen im Bereich der atomaren Auflösung zu erhalten, eignet sich unter anderem die Methode der Röntgenkristallographie, bei der streuende Proteinkristalle Voraussetzung sind. Damit Proteinmoleküle in den kristallinen Zustand übergehen, muss die Löslichkeit herabgesetzt werden, was durch den Einsatz von Fällungsmittel (Präzipitantien) erreicht werden kann. Dazu zählen unter anderem Salze und wasserentziehende Substanzen, wie z.B. Polyethylenglycol (McPherson, Jr., 1976; McPherson, 2001). Eine Methode zur Erzeugung von Proteinkristallen stellt die Dampfdiffusionsmethode dar, in dem die Proteinprobe mit einem Präzipitant-enthaltenden Kristallisationspuffer vermischt und in ein geschlossenes System, in dem sich der gleiche Kristallisationspuffer in einem separaten Reservoir befindet, gegeben wird. Über die Gasphase diffundiert Wasserdampf aus der verdünnten Proteinprobe in die Reservoir-Lsg. wodurch die Protein-Konzentration in der Proteinprobe steigt. Zudem steigt auch die Präzipitant-Konzentration in der Proteinprobe, wodurch ein Absinken der Löslichkeit des Proteins erreicht wird. Ist die Löslichkeitsgrenze überschritten, kann Kristallwachstum erfolgen (metastabile Phase), jedoch muss zur Bildung von Kristallisationskeimen (Nukleation) die Löslichkeit weiter verringert werden (labile Phase). In Letzterer können geeignete Präzipitantien die Nukleation begünstigen woraufhin Proteinkristalle entstehen können. In den meisten Fällen kommt es jedoch zum Präzipitieren des Proteins, weshalb

eine große Anzahl an Präzipitanzen nach dem *try and error* Verfahren getestet werden müssen.

Zu Beginn dieser Arbeit standen für TobZ bereits zwei Kristallisationsbedingungen zur Verfügung: (Parthier *et al.*, 2012)

1. 0,1 M MES pH 6,5, 1.6 M Na-K-Tartrat
2. 0,1 M HEPES pH 7, 2 % (v/v) PEG 400, 2 M Ammoniumsulfat

Für Mj1051 wurde im *96-well* Format nach geeigneten Kristallisationsbedingungen gesucht.

#### 96-well Feinscreening

1. Probe: 8,7 mg/mL Mj1051
2. Probe: 8,0 mg/mL Mj1051 versetzt mit 2,5 mM CP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ADP

Um größere Aggregate abzutrennen wurden die Proben bei 16000 g für 10 min bei RT zentrifugiert. Die *sitting-drop* Kristallisationsexperimente wurden in *96-well* Platten (CrystalQuick™, Standard Profile, Flat Bottom, Greiner) bei 14 °C mit Hilfe des Pipettierroboters *Microsys SQ* (Cartesian) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Platten wurden automatisch mit einem Bildverarbeitungssystem (*Desktop Minstrel UV* (Rigaku)) untersucht; die Überprüfung auf vorhandene Kristalle erfolgte manuell. Auf eine Referenzprobe ohne Protein wurde verzichtet, da das *Imaging*-System eine UV-Detektion erlaubt, wodurch eine Unterscheidung von Protein- und Salzkristallen möglich ist.

#### 24-well Feinscreening

Das *screening* nach Kristallen mit verbesserten Streueigenschaften erfolgte im *24 well* Maßstab mit der *hanging-drop* Methode. Dazu wurden die gefundenen Kristallisationsbedingungen leicht verändert, wobei entweder der pH-Wert, die Präzipitanz- oder Proteinkonzentration variiert wurden. Für jede Pufferbedingung wurden 500 µL Reservoir und 3 µL Tropfen (1,5 µL Protein + 1,5 µL Puffer) angesetzt.

### 2.11.2 Soaking-Experimente

*Soaking*-Experimente eignen sich, um niedermolekulare Liganden nachträglich in die Proteinkristalle einzubringen. Die Zugabe von Liganden vor der Kristallisation des Proteins kann die Kristallbildung bzw. -packung stören, was die Streueigenschaften negativ beeinflussen kann. Aufgrund dessen werden die Liganden häufig nachträglich eingebracht, da die eingesetzten Konzentration der Liganden und die Dauer des *soaking*-Experimentes variiert werden können, um die Streueigenschaften der Kristalle nur minimal zu beeinflussen.



Für TobZ:

*Soaking*-Experimente konnten nur im Tartrat-haltigem Puffer erfolgreich durchgeführt werden, da im Sulfat-haltigem Puffer die CP- und die Tobramycin-Bindung durch die Sulfationen blockiert wurden. Jedoch konnte ATP in hoher Konzentration nicht im Tartrat-haltigem Puffer gelöst werden.

CP, MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> und Tobramycin wurden jeweils in 200 mM Konzentration im Tartrat-haltigem Puffer gelöst. ATP wurde in 200 mM Konzentration in Wasser gelöst. ATPαS lag bereits in Wasser gelöst als 100 mM Lsg. vor.

Beispielhaft ist das *soaking*-Experiment für die Bildung des Carbamoyl-AMPS sowie die Tobramycin-Bindung mit TobZ H<sup>14</sup>N Kristallen dargestellt:

Die TobZ-Kristalle wurde in einen 1 µL Tropfen des Kristallisationspuffers überführt und mit jeweils 0,25 µL CP und MgCl<sub>2</sub> versetzt. Anschließend wurden 3x ≤0,1 µL ATPαS hinzugefügt. Die sukzessive Zugabe von geringen Mengen an ATP(αS) war nötig, um ein Brechen der Kristalle und damit den Verlust der Streueigenschaften zu vermeiden. Die Kristalle wurden für ca. 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 0,25 µL Tobramycin zugegeben und der Ansatz für weitere 90 Minuten stehen gelassen. Währenddessen wurde ein Tropfen zur *cryoprotection* vorbereitet. Dazu wurde der gleiche Ansatz entsprechend dem *soaking* pipettiert und zusätzlich 0,5 µL Ethylenglycol zugegeben. Die Kristalle wurden dann für ca. 2 Sekunden in die Lösung eingetaucht und sofort im Stickstoffstrom schockgefroren.

Für die Variante TobZ K<sup>443</sup>A wurde das *soaking* über Nacht durchgeführt.

Für Mj1051:

Die Substrate wurden im jeweiligen Puffer in 200 mM Konzentration gelöst. Das *soaking*-Experiment wurde entsprechend für TobZ durchgeführt. In beiden gefundenen Pufferbedingungen war keine *cryoprotection* nötig.

## 2.11.3 Datensammlung und –prozessierung

Geeignete Proteinkristalle wurden direkt *in house* unter Nutzung des vorhandenen Röntgenerators (MicroMAX 007 (Rigaku),  $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) auf ihre Streueigenschaften getestet. Die Reflexe wurden mittels eines *CCD-Detektors* (Saturn 944+) registriert. Die Berechnung der Strategie zur Datenaufnahme erfolgte mit dem Programmen D\*Trek bzw. MOSFLM (Battye *et al.*, 2011; Pflugrath, 1999). Um die Qualität der resultieren Datensätze zu verbessern, wurden Ozillationsschritte von 0,25° gewählt. Durch die Vermessung geeignete Kristalle am Synchrotron (BESSY II, Berlin) konnte die Datenqualität gesteigert werden. Zusätzlich konnte durch die Modulation der Wellenlänge der Röntgenstrahlen anomale Beugungsdaten detektiert werden, welche essentiell zur Phasenermittlung sind. Die

erhaltenen Datensätze wurden mittels XDS ausgewertet (Kabsch, 2010). Zur Berechnung der Position der Selenatome wurde die SHELXC/D/E-*suite* verwendet (Sheldrick, 2010).

#### 2.11.4 Lösung des Phasenproblems und Strukturlösung

Die Entdeckung von Friedrich, Knipping und von Laue im Jahr 1912, dass Röntgenstrahlen an Kristallen gestreut werden und ein charakteristisches Streubild auf einem Detektor hinterlassen, stellte ein Wendepunkt in der modernen Wissenschaft dar. Der theoretische Hintergrund konnte unter anderem mit Hilfe der Bragg-Gleichung sowie der Pattersonfunktion beschrieben werden. Zur Berechnung der Elektronendichte werden neben den Amplituden auch die Phasen der sogenannten Strukturformfaktoren benötigt. Die Amplitude ergibt sich aus den gemessenen Intensitäten des Streubildes, jedoch gehen die Phasen während des Beugungsexperimentes verloren. Diese Tatsache wird als das Phasenproblem bezeichnet.

Im Laufe des letzten Jahrhunderts wurden einige Methoden zur Lösung des Phasenproblems beschrieben. Falls eine ähnliche Struktur bekannt ist, kann das Phasenproblem über das sogenannte *molecular replacement* (molekularer Ersatz) gelöst werden. Jedoch muss diese Methode nicht zwangsläufig zum Erfolg führen, da sich auch bei strukturell ähnlichen Proteinen die zugrunde liegenden Phasen deutlich unterscheiden können, weshalb keine korrekte Lösung gefunden werden kann.

Eine andere Methode stellt die *multiple-wavelength anomalous dispersion* (MAD) dar. Mit dieser Methode können die Phasen (direkt) aus dem Beugungsexperiment berechnet werden. Wie der Name impliziert sind dafür Beugungsexperimente mit verschiedenen Wellenlängen nötig. Grundlage dieser Methode ist die Eigenschaft schwerer Atome (hohe Ordnungszahl), Röntgenstrahlen einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und mit einer charakteristischen Phasenverschiebung zu emittieren. Diese Phasenverschiebung spiegelt sich in den gemessenen Intensitäten des Beugungsexperimentes wider. Durch die Kombination mehrerer Datensätze bei unterschiedlicher Wellenlänge kann schlussendlich die Position der Schweratome im Kristallgitter berechnet werden. Daraus lassen sich wiederum die Phasen für die übrigen (leichteren) Atome ermitteln. Da nicht alle Proteine schwere Atome in ihrer Struktur aufweisen (z.B. Lysozym) wurden Methoden entwickelt, um diese einzubringen. Neben dem *soaking* von Schwermetallen in vorhandene Kristalle eignet sich die heterologe Proteinexpression in Gegenwart von Selenomethionin, um das natürliche Methionin durch die modifizierte Aminosäure zu ersetzen (Van Duyne *et al.*, 1993). Die Theorie des MAD geht auf (Hendrickson *et al.*, 1985) zurück.

Das Phasenproblem der TobZ-Datensätze erfolgte mit Hilfe der TobZ-apo Struktur (PDB: 3VEN (Parthier *et al.*, 2012)).

Das Phasenproblem des initialen SeMj1051-Datensatzes wurde mittels MAD gelöst (Hendrickson *et al.*, 1985). Für die weiteren Datensätze wurde das Phasenproblem mit Hilfe der initialen Struktur von SeMj1051 gelöst.

### 2.11.5 Strukturanpassung und -verfeinerung

Die manuelle Anpassung des Modells an die vorhandene Elektronendichtekarte erfolgte mittels des Programms Coot (Emsley *et al.*, 2010). Das Verfeinern der Struktur wurde mit Hilfe von Refmac5 (Murshudov *et al.*, 1997) aus CCP4 (The CCP4 Suite, 1994) durchgeführt.

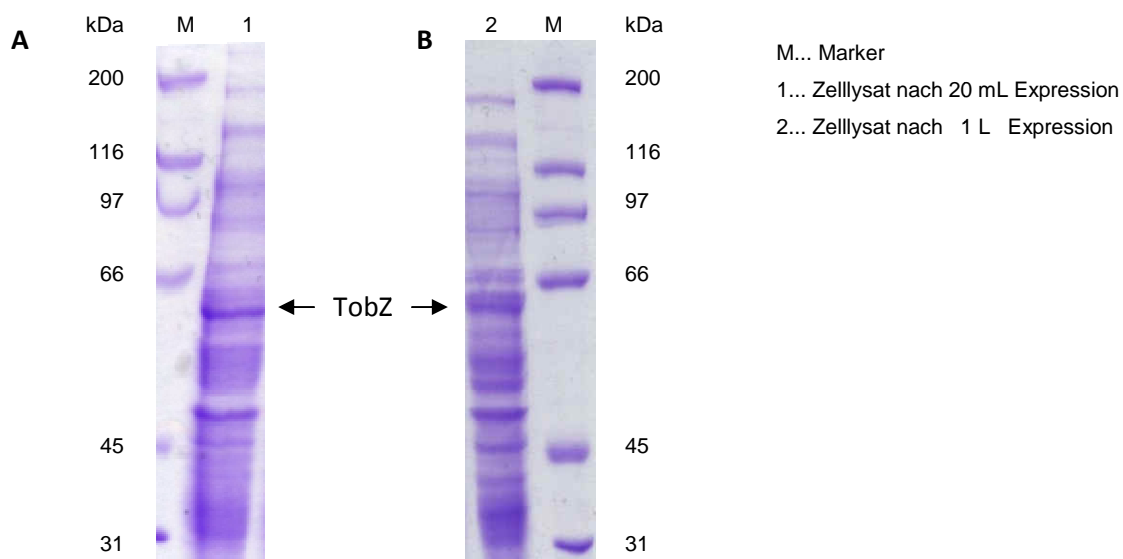
### 3 Ergebnisse der Charakterisierung von TobZ

#### 3.1 Herstellung von TobZ

##### 3.1.1 Expression von TobZ in *Streptomyces lividans* TK 24 Zellen

Aufbauend auf den Vorversuchen zur Expression von TobZ wurden die transformierten *Streptomyces lividans* TK 24 Zellen in 20 mL TSB-Medium, versetzt mit Thiostrepton als Antibiotikum und Selektionsmittel zugleich, angezogen. Um ausreichend Protein für die nachfolgenden biochemischen Untersuchungen und Kristallisation zu erhalten, wurde der Maßstab auf 4x 1 Liter erhöht. Die Übertragung der Expression von 20 mL auf 1 L Maßstab konnte durch den Einsatz von 5 L Kolben mit Schikanen, die für eine verbesserte Sauerstoffversorgung der Zellen sorgten, erreicht werden. Weiterhin wurde eine Schüttlergeschwindigkeit von mindestens 110 rpm festgestellt, da andernfalls die Ausbeute an Zellmasse um mehr als 50 % verringert war.

Der Vergleich der Überexpression von TobZ in 20 mL und 1 L Maßstab nach erfolgtem Zellaufschluss zeigt eine starke Überexpressionsbande für die 20 mL Expressionsmaßstab, die sich deutlich von anderen Banden abhebt (Abbildung 19 A, S. 55). Jedoch ist auch eine vergleichsweise starke Bande bei der Expression im 1 L Maßstab bei der theoretischen Molekülmasse von TobZ von 63 kDa zu erkennen (Abbildung 19 B, S. 55).



**Abbildung 19: Expressionsvergleich von TobZ zwischen 20 mL und 1 L Expression.**

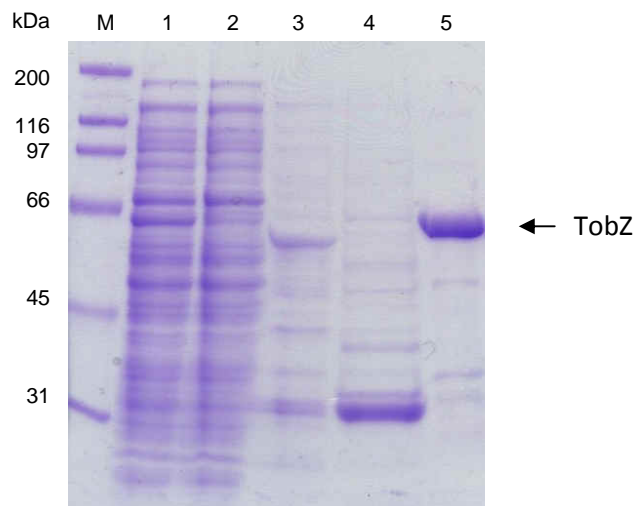
Dargestellt sind zwei 15 %-ige SDS-Gele der SDS-PAGE der Zellysatproben von einer Expression im 20 mL Maßstab (A) und im 1 L Maßstab (B). Es wurden jeweils 25 µg Probe aufgetragen. Die Beschriftung ist neben der Abbildung aufgeführt.

Aus 1 Liter TSB-Medium konnten ca. 25 - 30 g Zellen erhalten werden. Die Ausbeute blieb jedoch unter der Menge von 1 g Zellen aus dem 20 mL Maßstab, was einer Ausbeute von ca. 50 g Zellen pro Liter Expressionsmedium entspricht.

### 3.1.2 Reinigung von TobZ

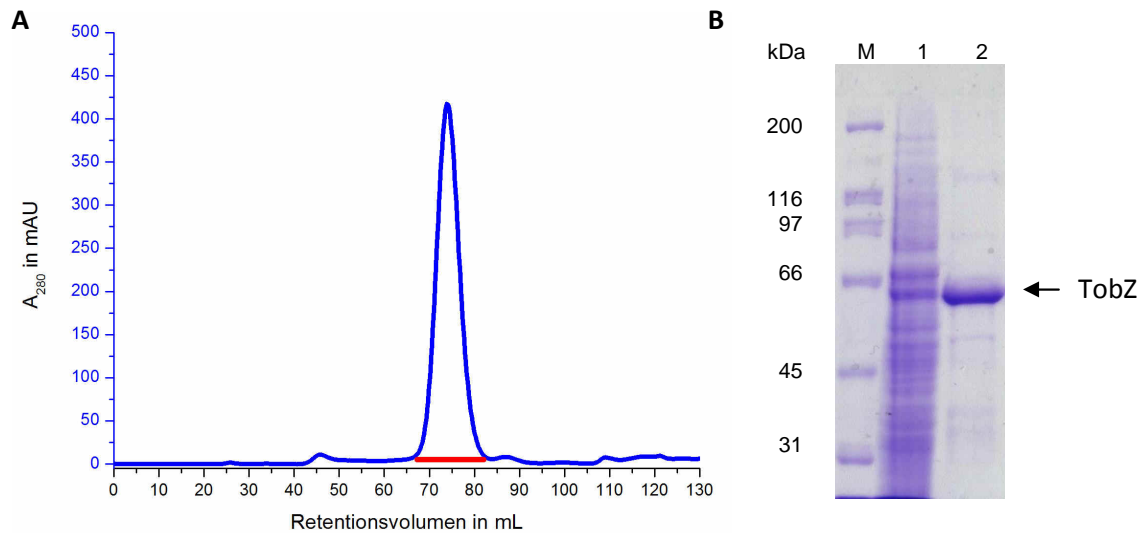
Nach dem Zellaufschluss und Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile wurde das Zelllysats mit 20 mM Imidazol versetzt und wie unter Abschnitt 2.3.5 (S. 40) beschrieben gereinigt (Abbildung 20, S. 56). Bei einer Konzentration von 40 mM und 75 mM Imidazol erfolgte zunächst die Elution weitere Wirtszellproteine. Nach Elution mit 200 mM Imidazol ist eine starke Bande bei ca. 63 kDa auf dem SDS-Gel zu sehen, die TobZ entspricht. Weiterhin sind geringfügige Verunreinigungen mit einer Molekülmasse von ca. 35 kDa und 50 kDa zu sehen.

Es konnte eine maximale Ausbeute von ca. 0,5 mg TobZ aus 1 g Zellen erzielt werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 12,5 mg - 15 mg TobZ je 1 Liter Expressionsmedium. Die Ausbeute war stark abhängig von der eingesetzten TobZ-Variante (Anhang 1, S. 162).



**Abbildung 20: Reinigung von TobZ mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie.**  
Für die Analyse der Proben mittels SDS-PAGE wurde ein 15 %-iges SDS-Gel genutzt.  
M... Marker, 1... Zelllysats, 2... Durchfluss, 3... 40 mM Imidazol, 4... 75 mM Imidazol,  
5... 200 mM Imidazol

Während der gesamten Reinigung erwies sich der Einsatz von 12,3 % (w/v) Glycerin als zwingend, da andernfalls eine starke Aggregation des Proteins zu beobachten war. Zudem ließ sich das Protein ohne Glycerin nicht aufkonzentrieren.



**Abbildung 21: Reinigung von TobZ mittels Größenausschlusschromatographie**

Dargestellt ist ein Profil der Reinigung (A) von TobZ mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) unter Nutzung einer S200 16/60 Säule. Dabei ist die Absorption bei 280 nm in blau und die gesammelte Fraktion ist als roter Balken gezeigt. Diese Fraktion wurde mittels SDS-PAGE, unter Zuhilfenahme eines 15 %-igen SDS-Gels (B), analysiert. M... Marker, 1... Zelllysat, 2... TobZ nach SEC

Zu Abtrennung von verbliebenen Verunreinigungen und Proteinaggregaten wurde im Anschluss an die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) eine Größenausschlusschromatographie (SEC) durchgeführt unter Nutzung einer Superdex S200 16/60 Säule (Abbildung 21, oben). Diese konnte jedoch nur für Varianten von TobZ eingesetzt werden, die nicht nach der IMAC zur Aggregation neigten (Anhang 1, S. 162). Bei einem Elutionsvolumen von 40 mL ist ein Peak zu sehen, der vermutlich einen geringen Anteil aggregiertes TobZ sowie Verunreinigungen hoher molekularer Masse darstellt (Abbildung 21, S. 57). Aufgrund der zu geringen Absorption der zusätzlich zum Protein Peak auftretenden Peaks wurde nur die gesammelte Fraktion einer SDS-PAGE unterzogen. Dabei zeigt sich im Vergleich zum Zelllysat, dass ein starker Reinigungseffekt durch die IMAC (Vgl. Abbildung 20, S. 56, Spur 2 und 5) erzielt wurde, der durch den Einsatz der Größenausschlusschromatographie geringfügig gesteigert werden konnte (Vgl. Abbildung 20, S. 56, Spur 5 und Abbildung 21, S. 57, Spur 2)

Einige der eingesetzten TobZ-Varianten neigten nach dem ersten Reinigungsschritt im Imidazol-haltigen Puffer zur Aggregation. Deshalb wurde anschließend eine Umsalzung mittels *Desalting*-Säulen anstatt der SEC durchgeführt, wodurch das Aggregationsverhalten verlangsamt, aber nicht verhindert werden konnte.

### 3.2 Enzymatische und biophysikalische Charakterisierung von TobZ

Im folgenden Abschnitt wird die biochemische und biophysikalische Charakterisierung von TobZ näher erläutert. Anknüpfend an frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe von Dr. U. Wehmeier erfolgte auch im Rahmen dieser Arbeit die Analyse der Enzymaktivität mittels Dünnschichtchromatographie (Clausnitzer, 2010). Zusätzlich wurden die Akzeptoren bzw. die carbamoylierten Reaktionsprodukte massenspektrometrisch untersucht. Weiterhin wurden die Affinitäten der Substrate zum Protein mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) bestimmt und eine Analyse des oligomeren Zustands durch analytische Ultrazentrifugation durchgeführt.

#### 3.2.1 Die TobZ-katalysierte Carbamoylierung von Tobramycin ist ATP-abhängig

Es war bereits bekannt, dass TobZ eine Carbamoylphosphat- (CP) und ATP-abhängige Carbamoylierung von Tobramycin und Kanamycin B durchführen kann. Diese Aktivität konnte jedoch nur nach dem Zellaufschluss, aber nicht nach erfolgreicher Reinigung nachgewiesen werden (Vgl. (Clausnitzer, 2010)). Für den Aktivitätsnachweis wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten Proben der Reaktion entnommen. Der Akzeptor und das carbamoylierte Produkt wurden durch Dünnschichtchromatographie getrennt und mittels Ninhydrinlösung angefärbt (Abbildung 22, S. 58).

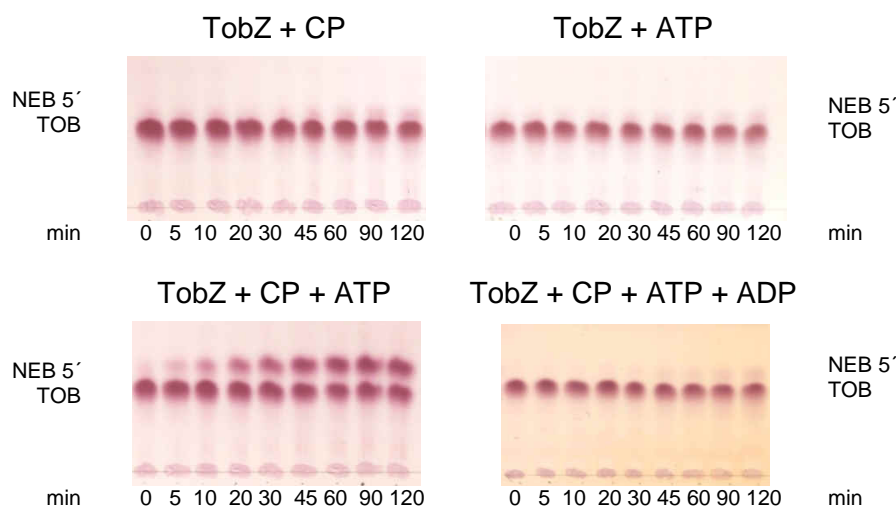


Abbildung 22: DC-Analyse der Aktivität von TobZ in Abhängigkeit von CP, ATP und ADP  
TOB: Tobramycin; NEB 5': Nebramycin 5'

Nur in Anwesenheit der beiden Substrate CP und ATP ist mit Zunahme der Reaktionszeit eine Bande oberhalb der Tobramycin-Bande zu sehen. Dies bestätigt die ATP-abhängige Carbamoylierung, welche schon für die O-Carbamoyltransferasen CmcH und NovN postuliert wurde (Brewer *et al.*, 1980; Freel Meyers *et al.*, 2004). Die Identität des Produkts 6''-O-carbamoyl-Tobramycin (Nebramycin 5') wurde mittels Massenspektrometrie nachgewiesen (Anhang 3, S. 163). Es konnte eine Carbamoylierung am Ring III (Vgl. Abschnitt 1.2.1, S. 15) des Tobramycins massenspektrometrisch festgestellt werden, jedoch konnte die genaue Position nicht bestimmt werden, da keine Massenunterschiede für die verschiedenen Positionen existieren.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie konnte nur ein ca. 50 %-iger Umsatz abgeschätzt werden, der nach ca. einer Stunde Reaktionszeit erreicht worden ist, jedoch im weiteren Verlauf der Reaktion nicht weiter anstieg. Beim zusätzlichen Einsatz von ADP kommt die Carbamoylierungsreaktion fast vollständig zum Erliegen (Abbildung 22, S. 58). Es ist somit auszuschließen, dass auch ADP als Substrat dient, wodurch das Nukleotid wahrscheinlich inhibitorisch auf die Carbamoylierungsreaktion wirkt.

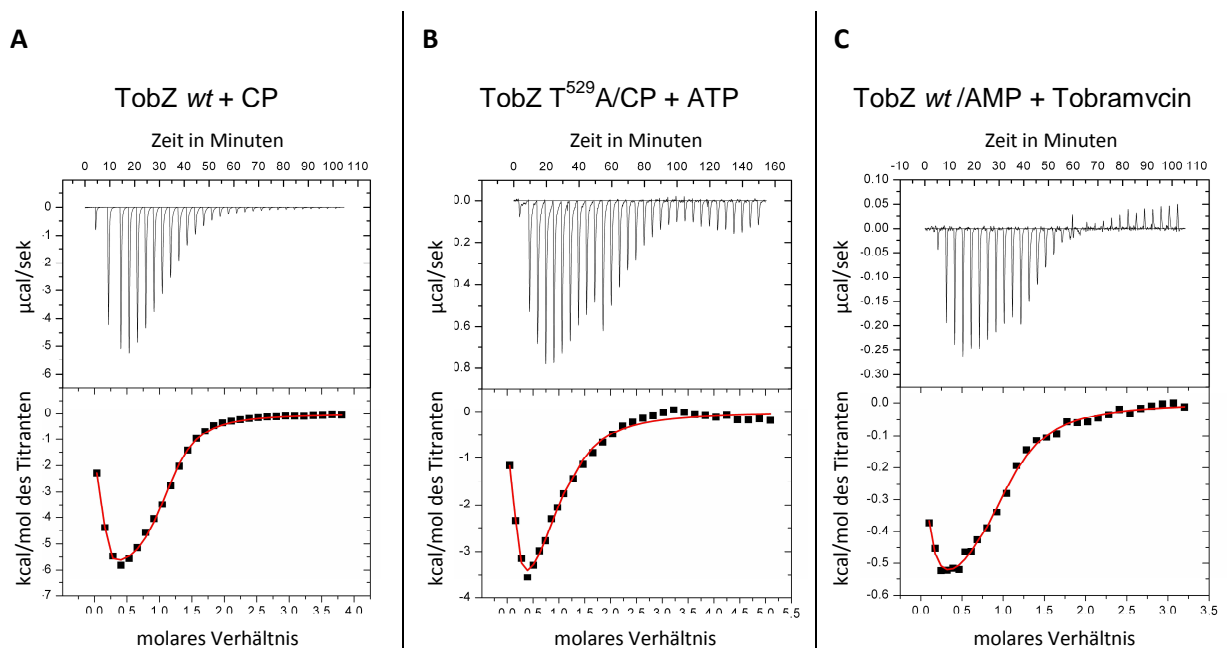
### 3.2.2 TobZ bindet seine Substrate mit mikromolarer Affinität

Die Affinitäten der Substrate zum Enzym wurden durch die Methode der Isothermalen Titrationskalorimetrie untersucht. Auf Grundlage der Kristallstruktur von TobZ im Komplex mit CP scheint die Bindung von CP unabhängig von weiteren Liganden zu sein (Vgl. PDB: 3VEO und 3VF4 (Parthier *et al.*, 2012)). Um das Substratgemisch CP und ATP zu untersuchen, wurde die katalytisch-inaktive Variante TobZ T<sup>529</sup>A verwendet, da strukturell gezeigt werden konnte, dass die Aminosäure T<sup>529</sup> hauptsächlich an der CP-Bindung beteiligt ist und die Variante kein Umsatz von Tobramycin in der Dünnschichtchromatographie zeigte (Vgl. Abbildung 37, S. 74 und Abbildung 38 A, S. 75). Der Einsatz von  $\alpha,\beta$ -nicht-hydrolysierbaren ATP-Analoga war nicht möglich, da diese nur in bereits gelöster Form kommerziell verfügbar waren und daher ungeeignet für ITC-Messungen sind. Für die Tobramycin-Bindung ist die Anwesenheit eines Nukleotids in der Kae1-ähnlichen Domäne vermutlich essentiell, wobei sowohl ADP als auch AMP gebunden sein können (Vgl. Abbildung 8 D, S. 7 und Abbildung 48 B, S. 84). Die Messungen wurden bei 20 °C durchgeführt, da das Substrat CP einen temperaturabhängigen Zerfall zu Cyanat und



Phosphat zeigt und diese Reaktionswärme möglichst gering gehalten werden sollte (Legrain *et al.*, 1995).

Es zeigte sich bei allen Messungen zwei Übergänge bei einer Stöchiometrie von etwa 0,5 und 1,0 (Abbildung 23, S. 60). Deshalb wurde für die Auswertung das Bindungsmodell für zwei Bindestellen genutzt, obwohl auf Grundlage der Kristallstruktur nur eine Bindung des jeweiligen Liganden pro TobZ-Molekül beobachtet wurden ist (Vgl. Abschnitt 1.1.2.1, S. 6). Die Bindungswärme  $\Delta_B H_{app}$  der CP- und ATP-Bindung stellt den überwiegenden thermodynamischen Anteil (enthalpisch getrieben) an der Assoziation dar, während die Bindung des Tobramycin Entropie-getrieben zu sein scheint. Es zeigte sich, dass CP die größte apparente Bindungsenthalpie freisetzt.



**Abbildung 23: Kalorimetrische Titration von TobZ mit den Liganden CP, ATP und Tobramycin**

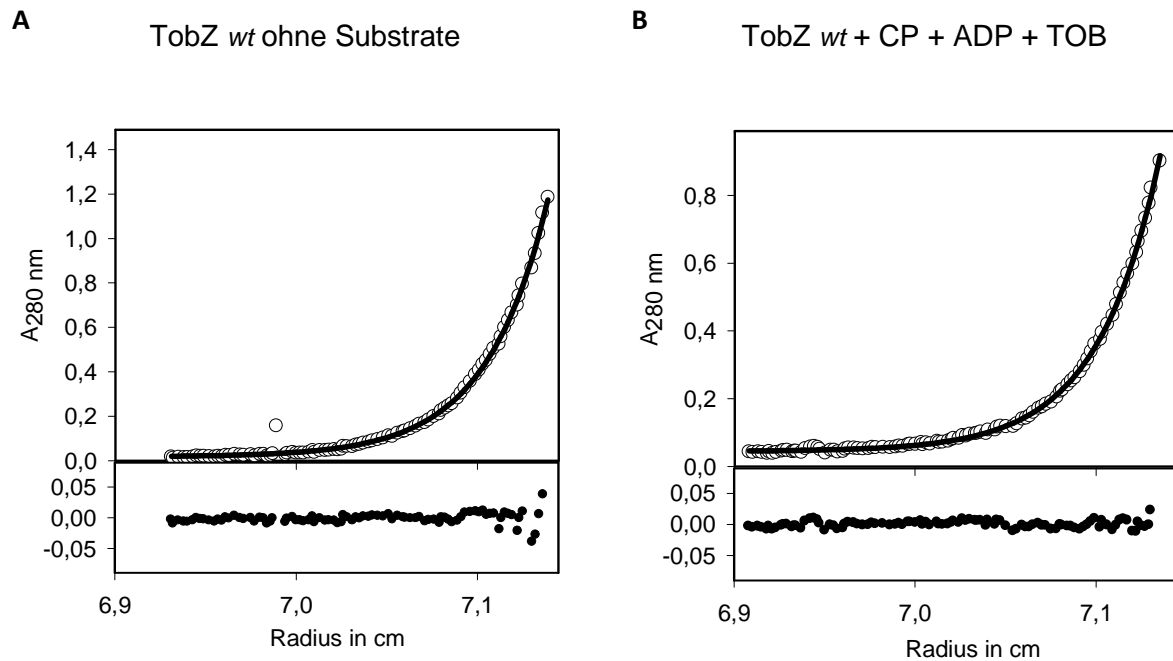
Die ITC-Messung von TobZ wt mit dem Substrat CP (A), TobZ T<sup>529</sup>A/CP mit dem Substrat ATP (B) und TobZ wt/AMP mit dem Substrat Tobramycin (C).

Substrat	CP	ATP	Tobramycin
Protein	TobZ <i>wt</i>	TobZ T <sup>529</sup> A	TobZ <i>wt</i>
Zusätzlicher Ligand	-	CP	AMP
$K_A$ in mM <sup>-1</sup>	94,2 ± 7,8	61,6 ± 10,7	72,4 ± 8,5
<b><math>K_D</math> in μM</b>	<b>10,6 ± 0,9</b>	<b>16,2 ± 2,8</b>	<b>13,8 ± 1,6</b>
Stöchiometrie N	1,02 ± 0,01	0,89 ± 0,06	0,94 ± 0,05
$\Delta_B G^\circ$ in kcal/mol	- 6,7 ± 0,1	- 6,4 ± 0,1	- 6,5 ± 0,1
$\Delta_B H_{app}$ in kcal/mol	- 6,4 ± 0,2	- 4,9 ± 0,5	- 0,7 ± 0,1
$-T\Delta_B S_{app}$ in kcal/mol	- 0,3	- 1,5	- 5,8

**Tabelle 1: Übersicht über die ermittelten thermodynamischen Bindungsparameter von CP, ATP und Tobramycin an TobZ**

Dargestellt sind die thermodynamischen Parameter der Bindung von CP, ATP und Tobramycin zum Enzym TobZ *wt* bzw. TobZ T<sup>529</sup>A. Für die ATP-Bindung werden zusätzlich die Liganden CP und Mg<sup>2+</sup> benötigt. Für die Bindung von Tobramycin ist die Anwesenheit von AMP nötig. Die ermittelten Fehler beruhen auf der Standardabweichung der gemessenen Daten zum Fit.

Die Übergänge bei einer Stöchiometrie von 0,5 könnten auf einen möglichen oligomeren Zustand des Enzyms TobZ hinweisen (Abbildung 23, S. 60). Somit wurde die mittlere, apparente molare Masse in An- und Abwesenheit durch Sedimentationsgleichgewichtsläufe in der analytischen Ultrazentrifuge gemessen (Abbildung 24, S. 62). TobZ liegt offensichtlich als Dimer vor, da die ermittelte molare Masse bei 125 kDa lag (Abbildung 24 A, S. 62; die theoretische Masse eines Monomers beträgt 63,4 kDa). In Anwesenheit der Substrate wurde keine Änderung des Oligomer-Zustandes erreicht (Abbildung 24 B, S. 62). Weitere Messungen in verschiedenen Substrat-gebundenen Zuständen von TobZ sind in Anhang 4 (S. 165) aufgeführt. Durch die Strukturbestimmung einer zweiten Kristallform konnte eine vergleichbare Anordnung der möglichen Dimerisierung beobachtet werden (Anhang 6, S. 167). Demnach kann eine Änderung der Oligomerisierung als Ursache für den ersten Übergang während der ITC-Messungen ausgeschlossen werden.

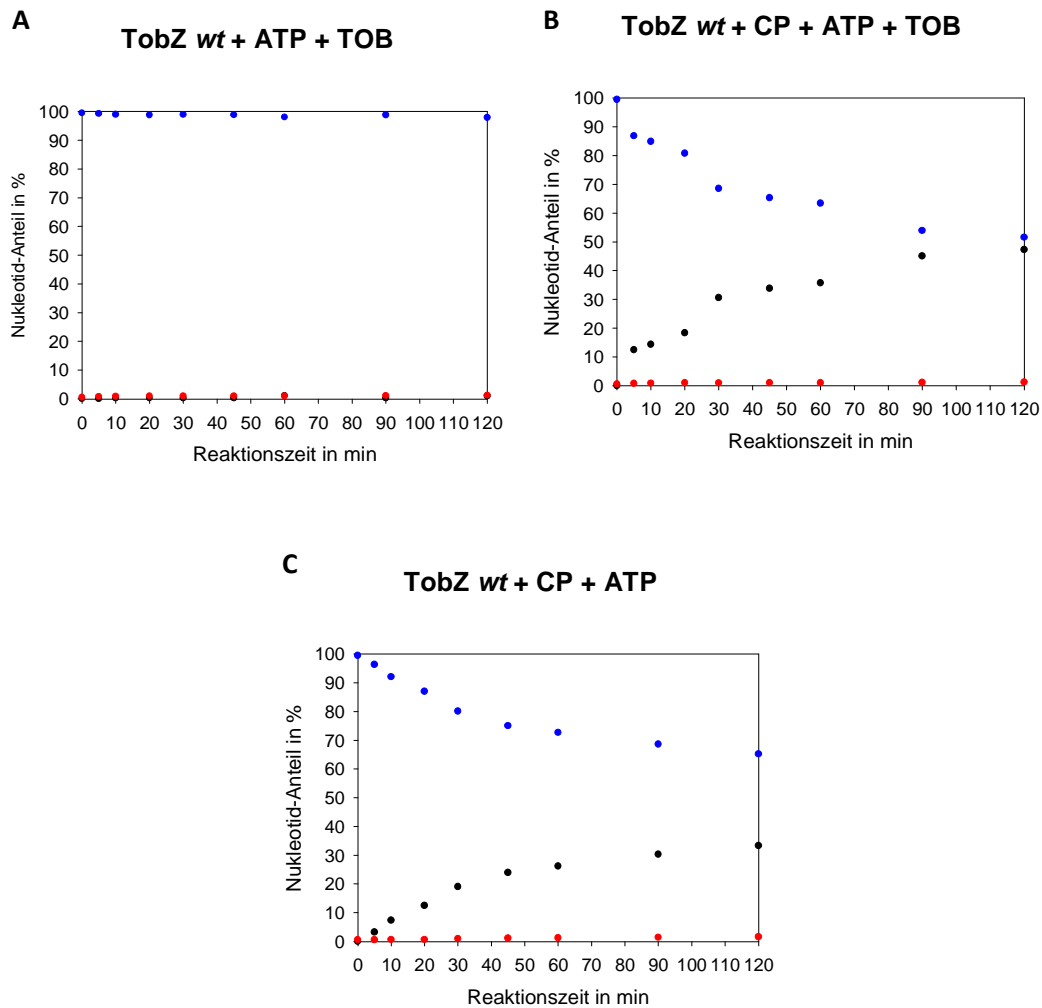


**Abbildung 24: Analytische Ultrazentrifugation von TobZ *wt* ohne und mit Liganden**

A) aUZ-Lauf von TobZ *wt* ohne Liganden, sowie den Liganden CP, ADP und Tobramycin (B). Die erhaltenen mittleren, apparenten molaren Massen betragen in beiden Läufen 125 kDa.

### 3.2.3 TobZ zeigt eine CP-abhängige ATP-Pyrophosphatase-Aktivität

Der Nukleotidumsatz wurde mittels *rp*-HPLC verfolgt. Dabei wurden zwei Ansätze in An- und Abwesenheit von CP untersucht (Abbildung 25 A und B, S. 63). In der Referenzreaktion ohne Zusatz von CP ist kein signifikanter Umsatz zu AMP oder ADP erkennbar. Dagegen ist in Anwesenheit von CP eine deutliche AMP-Zunahme nachweisbar (ca. 47 % nach 2 h), während die Konzentration von ADP im Verlauf der Reaktion kaum zunimmt. Demnach wird AMP als zweites Produkt der Carbamoylierungsreaktion gebildet. Der Umsatz von ATP entspricht dem Tobramycin-Umsatz, der mittels DC detektiert wurde (Vgl. Abbildung 22, S. 58).



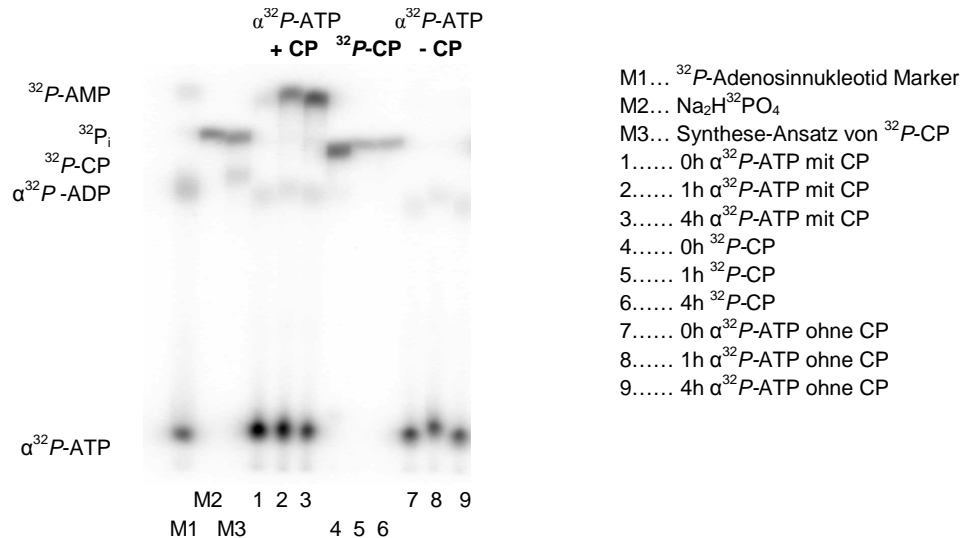
**Abbildung 25: TobZ-katalysierter CP-abhängiger ATP-Umsatz in An- und Abwesenheit des Akzeptors Tobramycin**  
 Dargestellt sind drei Diagramme über die Abhängigkeit des ATP-Umsatzes ohne das Substrat CP (A), in Anwesenheit von CP (B) und in Abwesenheit des terminalen Akzeptors Tobramycin (C). Die Daten für ATP sind als blaue Kreise, von ADP als rote und AMP als schwarze Kreise gezeigt. Die AMP-Daten werden von ADP-Daten überlagert und sind daher nur schwer ersichtlich (A). TOB: Tobramycin

Ein möglicher Grund für den unvollständigen Umsatz könnte in dem zeitabhängigen Zerfall zu Cyanat- und Phosphationen begründet sein ((Legrain *et al.*, 1995),  $t_{1/2}^{30^{\circ}\text{C}} = 50 \text{ min}$ ).

Da CP und ATP für die Carbamoylierung notwendig sind, ergibt sich die Frage, ob die Anwesenheit von Tobramycin Voraussetzung für die Reaktion dieser beiden Substrate ist. Daher wurde eine Reaktion ohne Tobramycin analysiert (Abbildung 25 C, S. 63). Auffällig ist, dass auch ohne Anwesenheit des terminalen Akzeptors Tobramycin ein Umsatz von ATP zu AMP stattfindet. Die AMP-Entstehung ist im Vergleich zur Anwesenheit von Tobramycin verringert (ca. 33 % nach 2 h). Weiterhin kann keine signifikante Bildung von ADP beobachtet werden.

Aus den bisherigen Ergebnissen konnte die ATP-Abhängigkeit der Carbamoylierungsreaktion gezeigt werden, wobei AMP als Produkt entsteht. Daraus resultiert die Frage, wie die Substrate CP und ATP miteinander von TobZ zur Reaktion gebracht werden und ob

eventuelle Intermediate, sowie weitere Produkte der Reaktion entstehen. Somit wurde die Reaktion mit dem Einsatz von radioaktiv-markierten Substraten in Form von  $\alpha^{32}\text{P-ATP}$  und  $^{32}\text{P}$ -markiertes CP ( $^{32}\text{P-CP}$ ) durchgeführt (Abbildung 26, S. 64). Letzteres wurde synthetisiert aus  $^{32}\text{P}_i$  und Kaliumcyanat (Abschnitt 2.9, S. 49).

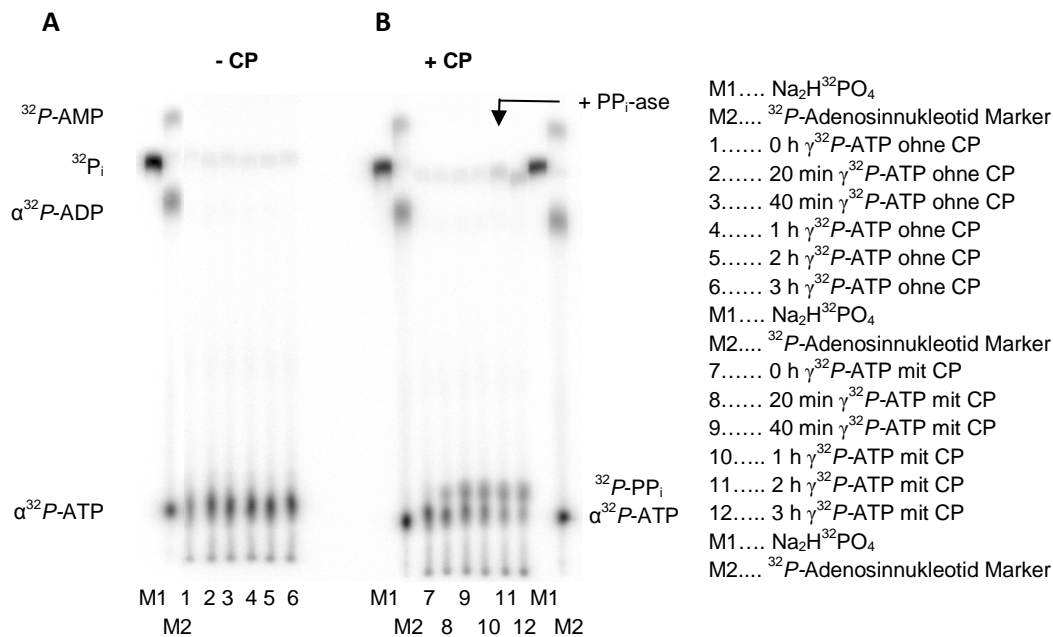


**Abbildung 26: Autoradiogramm des Umsatzes von  $^{32}\text{P}$ -markierten Substraten**

Dargestellt ist ein Autoradiogramm einer Ionenaustausch-DC der einzelnen Reaktionsansätze unter Verwendung von  $\alpha^{32}\text{P-ATP}$  bzw.  $^{32}\text{P-CP}$  in Abhängigkeit vom eingesetzten nicht-radioaktiv markierten CP. In allen Reaktionsansätzen wurde nicht-markiertes ATP und Tobramycin hinzugefügt. Die Beschriftung der Spuren ist rechts neben der Abbildung aufgeführt.

Für die Analyse der Aktivität von TobZ wurden die Phosphat-haltigen Spezies mittels Ionenaustausch-Dünnschichtchromatographie getrennt und über einen Phosphorimager detektiert. Die Reaktion mit radioaktiv markiertem  $^{32}\text{P-CP}$  und nicht-markiertem ATP weist in Spur 4 zwei Banden entsprechend dem Marker M3 auf (Abbildung 26, S. 64). Somit kann eine ATP-Triphosphat-Hydrolysereaktion analog der von der SAM-Synthetase katalysierten Reaktion ausgeschlossen werden (Komoto *et al.*, 2004). Andererseits ist ersichtlich, dass nach Einsatz von  $\alpha^{32}\text{P-ATP}$  und CP  $^{32}\text{P-AMP}$  entsteht, wobei die entsprechende Bande im Reaktionsverlauf zunimmt (Spuren 1 - 3). Hingegen ist in der Referenzreaktion ohne CP (Spuren 7 - 9) kein  $^{32}\text{P-AMP}$  zu sehen.

Da für diese Reaktion eine Freisetzung von  $\text{PP}_i$  postuliert werden kann, wurde  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -markiertes ATP ( $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ ) eingesetzt, womit gegebenenfalls  $^{32}\text{P-PP}_i$  freigesetzt werden müsste. Für dieses Experiment stand keine Referenzsubstanz in Form von  $^{32}\text{P-PP}_i$  zur Verfügung, jedoch sollte sich das Laufverhalten von  $\text{PP}_i$  durch Zusatz einer  $\text{PP}_i$ -ase erkennen lassen. Das Ergebnis verdeutlicht eine CP-abhängige Reaktion, da ohne CP kein Umsatz von  $\gamma^{32}\text{P-ATP}$  zu erkennen ist (Abbildung 27 A, S. 65). In Gegenwart von CP entsteht eine neue Bande oberhalb der  $\gamma^{32}\text{P-ATP}$  Bande, die nach ca. 40 min (Abbildung 27 B, Spur 9, S. 65) an Intensität nicht weiter zunimmt. Nach 1 h Reaktionszeit wurde eine



**Abbildung 27: Einsatz von  $\gamma\text{-}^{32}\text{P-ATP}$  deutet auf eine Freisetzung von  $\text{PP}_i$  hin**

Dargestellt ist ein Autoradiogramm einer Ionenaustausch-DC der einzelnen Reaktionsansätze unter Verwendung von  $\gamma\text{-}^{32}\text{P-ATP}$  in Abhängigkeit vom eingesetzten nicht-radioaktiv markierten CP (A,B). In allen Reaktionsansätzen wurde nicht-markiertes ATP und Tobramycin hinzugefügt. Bei der Reaktion mit CP wurde nach ca. 1 h eine  $\text{PP}_i$ -ase zugegeben. Die Beschriftung der Spuren ist rechts neben der Abbildung aufgeführt.

$\text{PP}_i$ -ase zugegeben, welche in der Lage ist,  $^{32}\text{P-PP}_i$  zu  $^{32}\text{P}_i$  und unmarkiertem  $\text{P}_i$  hydrolytisch zu spalten. Die Zunahme einer Bande in der Höhe von  $\text{P}_i$  ist ersichtlich, womit eine Entstehung von  $\text{PP}_i$  bestätigt wurde, jedoch wurde kein vollständiger Umsatz von  $^{32}\text{P-PP}_i$  beobachtet (Vergleich Spur 10 und 11, Abbildung 27, S. 65).

Aufgrund der beobachteten  $\text{PP}_i$ -Bildung ergibt sich die Frage, ob TobZ eine Rückreaktion von  $\text{PP}_i$  zum ATP katalysieren kann. Um diesen Versuch durchzuführen, wurde neben dem Substrat CP und ATP auch unmarkiertes  $\text{PP}_i$  sowie markiertes  $^{32}\text{P-PP}_i$  eingesetzt (Abbildung 28, S. 66). Nach 10 Minuten erkennt man die Zunahme einer schwachen Bande unterhalb der  $^{32}\text{P-PP}_i$  Bande, die auf  $^{32}\text{P-ATP}$  hindeutet (Abbildung 28 B, S. 66). Die Reaktion ist CP-abhängig, wie der Vergleich in Abwesenheit von CP zeigt, wobei kein markiertes ATP gebildet wird (Abbildung 28 A, S. 66). Der Einbau von  $^{32}\text{P-PP}_i$  setzt das Vorhandensein eines reaktiven Zwischenproduktes voraus, das in der Lage ist, mit Pyrophosphat zu ATP zu reagieren, da das zweite Produkt AMP energetisch dazu nicht in der Lage ist.

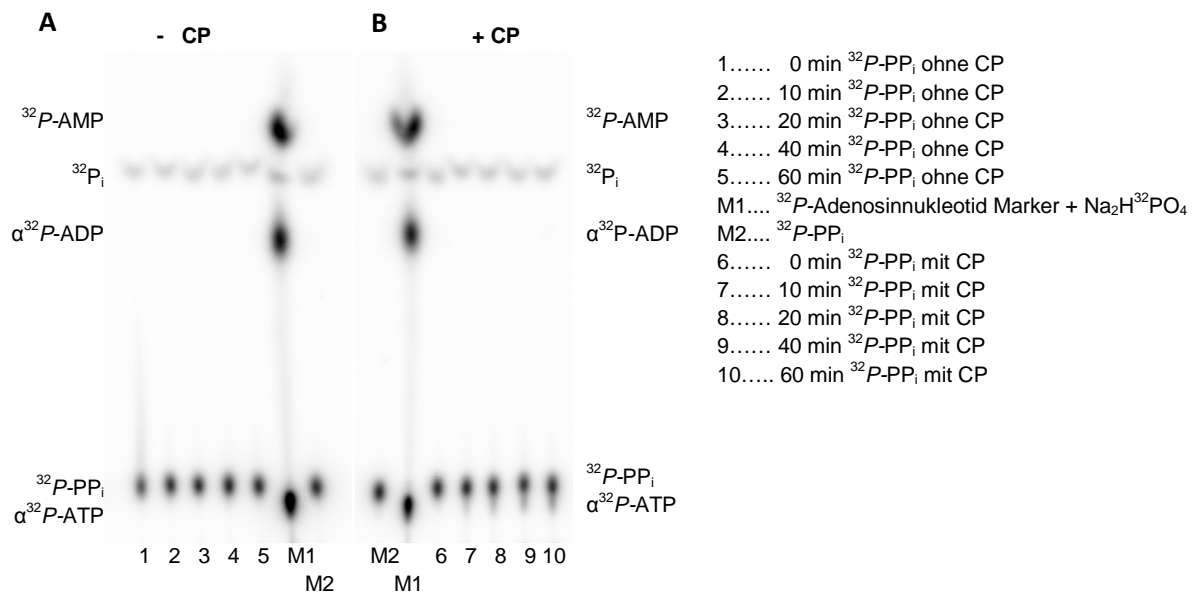


Abbildung 28: TobZ-katalysierte  $^{32}\text{P-PP}_i$  Austauschreaktion

Dargestellt ist ein Autoradiogramm einer Ionenaustausch-DC der einzelnen Reaktionsansätze unter Verwendung von  $^{32}\text{P-PP}_i$  in Abhängigkeit vom eingesetzten nicht-radioaktiv markierten CP (A,B). In allen Reaktionsansätzen wurde nicht-markiertes ATP hinzugefügt. Die Beschriftung der Spuren ist rechts neben der Abbildung aufgeführt.

### 3.2.4 Identifizierung eines Carbamat-Adenylat als Zwischenprodukt

Ein mögliches Carbamoyl-AMP Intermediat ist vermutlich sehr energiereich und zeigt wahrscheinlich ähnlich dem CP eine Zerfallsreaktion, womit der *in vitro* Nachweis vorrausichtlich schwer durchführbar wäre. Möglicherweise ist die Stabilität dieses Intermediates im Enzym-gebunden Zustand höher als in Lösung, da Wechselwirkungen mit dem Enzym die Stabilität erhöhen können. Die Struktur von TobZ konnte bereits in der Arbeitsgruppe Stubbs gelöst werden, weshalb unter Nutzung von TobZ *wt* Kristallen *soaking*-Experimente in Gegenwart der Substrate CP und ATP durchgeführt wurden. Anschließend erfolgte eine Röntgenstrukturanalyse der Kristalle, wobei Datensätze mit einer Auflösung von 2,3 Å erhalten werden konnten. Die Statistiken zu dem erhaltenen Datensatz sind im Anhang 9 (S. 171) aufgelistet.

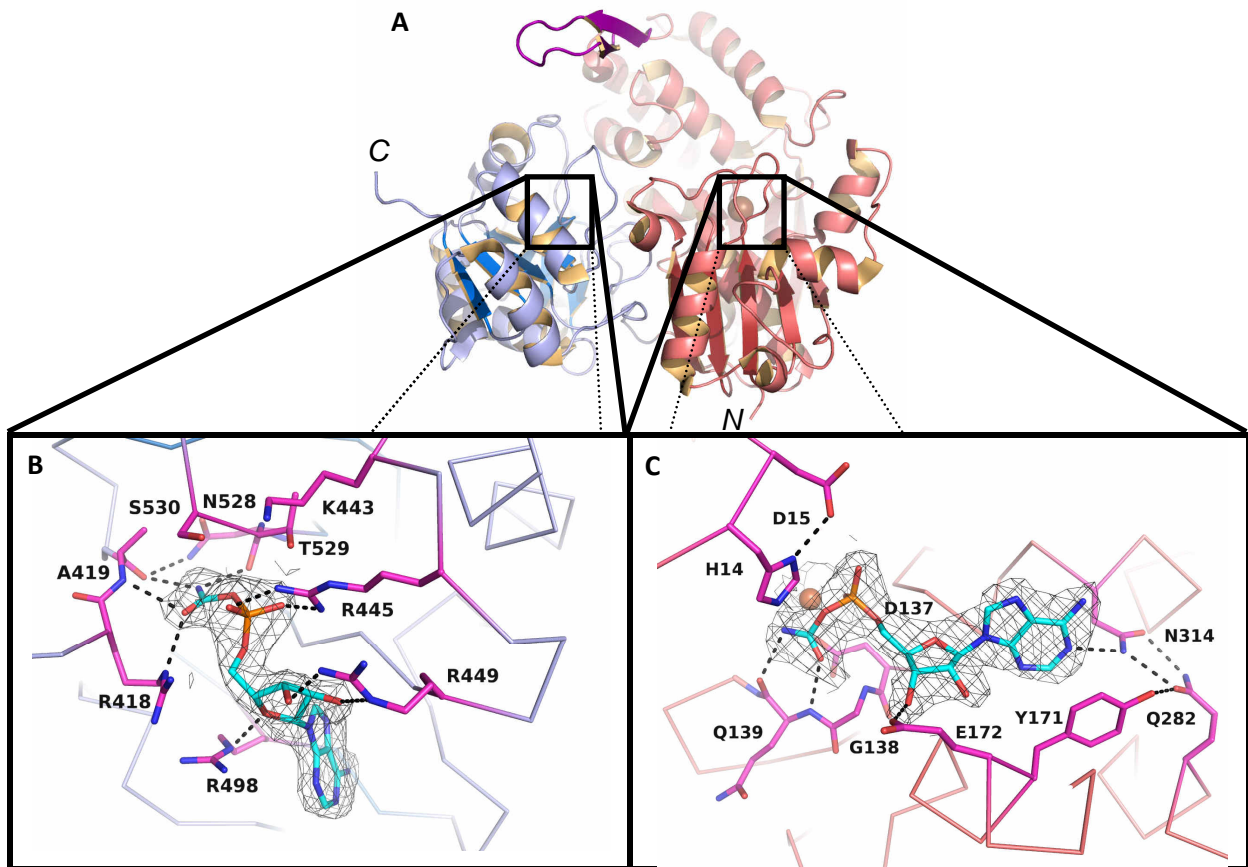


Abbildung 29: Bindung des Carbamoyl-AMP in den beiden Domänen von TobZ

A) Cartoondarstellung des Enzyms TobZ mit der YrdC-ähnlichen Domäne (blau) und der Kae1-ähnlichen Domäne (rot), sowie dem  $\beta$ -finger (violett). Der N- und C-Terminus sind im Bild markiert. B) Ribbondarstellung der YrdC Kae1-ähnlichen Domäne (blau); C) Ribbondarstellung der Kae1-ähnlichen Domäne (rot); Die abgebildeten Reste sind in stick-Darstellung gezeigt. Nicht-C-Atome sind mit den üblichen Farben versehen, wobei das C-Atom des Zwischenproduktes türkis und die C-Atome der Aminosäuren violett eingefärbt sind. Die omit-map der  $F_o-F_c$ -Dichte (Auflösung 2,3 Å, konturiert mit  $3\sigma$ ) ist in grau dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen (Abstand: 2,2 - 3,5 Å) sind in schwarz gefärbt. Das Eisenion ist als braune Kugel eingezeichnet. PDB: 3VER

Eine ununterbrochene Elektronendichte von der Adeninbase bis zur Carbamoylgruppe konnte in der YrdC-ähnlichen Domäne beobachtet werden und wurde als das postulierte Carbamoyl-AMP interpretiert (Abbildung 29 A, S. 67). Die Bindung der Adeninbase unterscheidet sich nicht von der bereits bekannten Bindung von ADP (Vgl. Abbildung 8 C, S. 7). Der Riboseteil wurde allerdings verschoben, wobei nun die 2'- und 3'-OH-Gruppe mit der Seitenkette von R<sup>449</sup> wechselwirken können. Das Phosphat und die Carbamoylgruppe bilden fast vollständig die gleichen Interaktionen wie das Substrat Carbamoylphosphat aus, jedoch wechselwirkt der Phosphatteil zusätzlich mit der Seitenkette von R<sup>445</sup> (Vgl. Abbildung 8 C, S. 7).

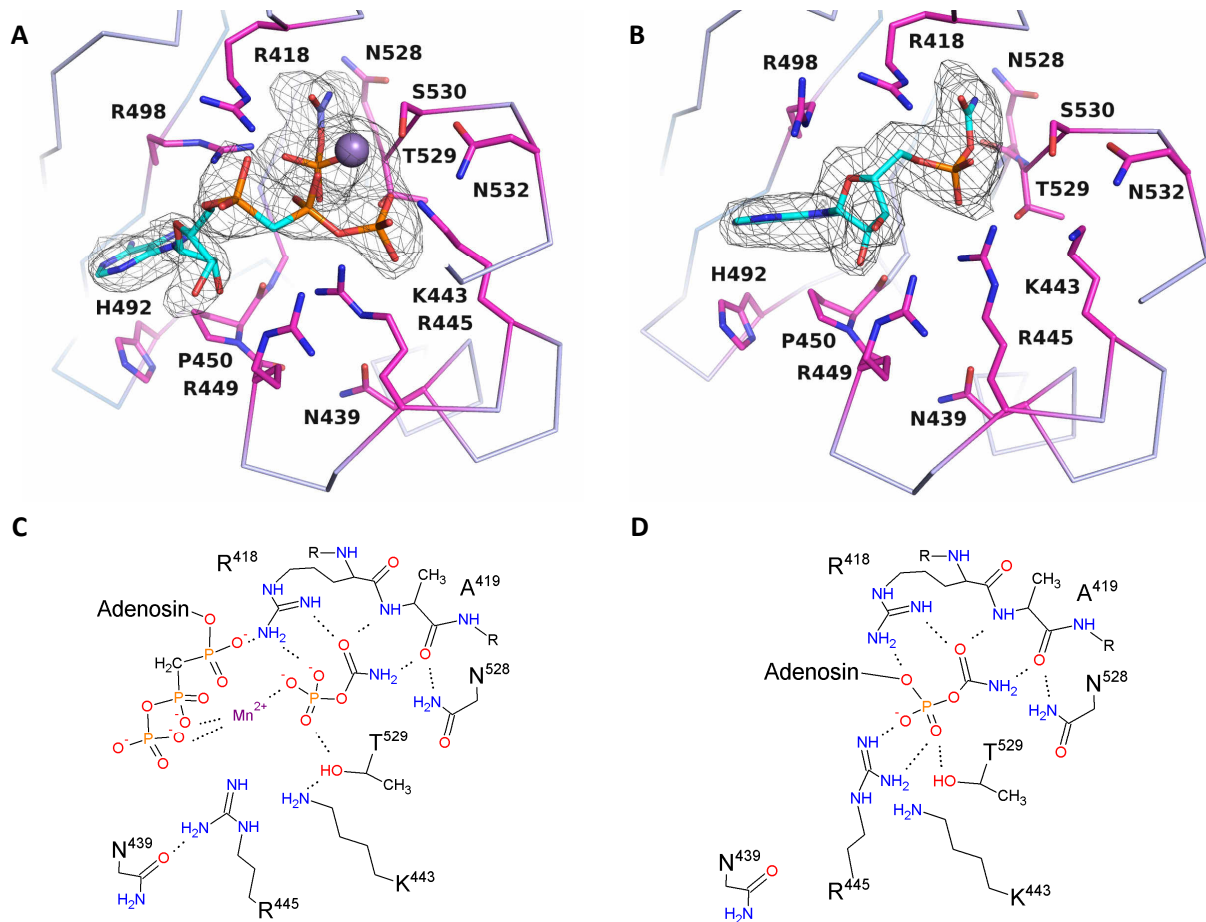
Bei Betrachtung der Kae1-ähnlichen Domäne ist ebenfalls eine Elektronendichte an der ADP-Bindestelle zusehen, wobei sich die Dichte am  $\beta$ -Phosphat deutlich von der des ADP unterscheidet (Abbildung 29 C, S. 67). Daher wurde diese Dichte ebenfalls als Carbamoyl-AMP interpretiert. Der AMP-Teil des Adenylates bildet die gleichen Interaktionen wie der



AMP-Teil des ADP aus (Vgl. Abbildung 8 D, S. 7). Die Carbamoylgruppe interagiert über Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Peptidrückgrat von G<sup>138</sup> und Q<sup>139</sup>.

### 3.2.5 Analyse der initialen Schritte der Carbamoylierung

Neben der Struktur von TobZ im Komplex mit dem Carbamoyl-AMP (CA), die den Zustand nach CA-Bildung widerspiegelt, stand zu Beginn dieser Arbeit eine Komplexstruktur von TobZ mit dem Substrat CP und dem ATP-Analogen AMPCPP zur Verfügung, welche den Zustand vor der CA-Bildung repräsentiert (Abbildung 30, S. 68).



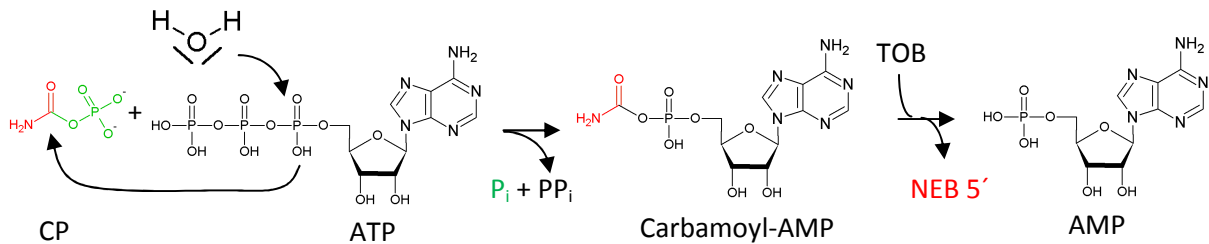
**Abbildung 30: Vergleich der Bindung von CP und AMPCPP sowie des Carbamoyl-Adenylates in der YrdC-ähnlichen Domäne von TobZ**

Gezeigt ist eine Ribbondarstellung der YrdC-ähnlichen von TobZ im Komplex mit CP und AMPCPP (A) sowie dem Carbamoyl-AMP (B). Die abgebildeten Reste sind in *stick*-Darstellung gezeigt. Nicht-C-Atome sind mit den üblichen Farben versehen, wobei das C-Atom der Liganden türkis und die C-Atome der Aminosäuren violett eingefärbt sind. Die *omit-map* der F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>-Dichte (Auflösung 2,2 Å (A) und 2,3 Å (B), konturiert mit 3 σ) ist in grau dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen (Abstand: 2,2 - 3,5 Å) sind in schwarz gefärbt. Das Manganion ist als lila Kugel dargestellt. Komplex von TobZ mit CP und AMPCPP PDB: 3VES (Parthier *et al.*, 2012)

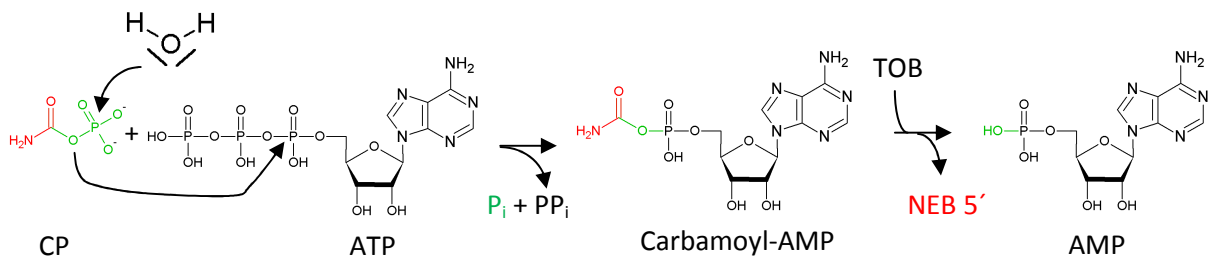
C) Das aktive Zentrum der YrdC-ähnlichen Domäne von TobZ in Anwesenheit der Substrate/Liganden CP und Mn<sup>2+</sup>•AMPCPP  
D) Bindung des CA in der CP-Bindetasche. Die Abbildung wurde auf Basis der Kristallstrukturen aus A) und B) erstellt.

Um ein CA zu bilden, bedarf es der Phosphat-Abspaltung von CP und der PP<sub>i</sub>-Abspaltung von ATP. Dabei können zwei verschiedene Reaktionen zur Bildung eines CA in der YrdC-ähnlichen Domäne postuliert werden, die im Folgenden dargestellt sind.

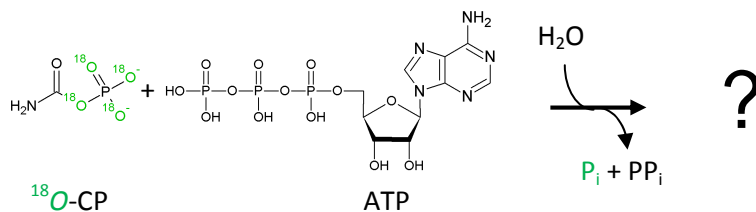
1. ATP-Hydrolyse zu AMP und PP<sub>i</sub> und Angriff des AMP auf das Carbonyl-C-Atom des CP unter Bildung von Carbamoyl-AMP und P<sub>i</sub>



2. CP-Hydrolyse in Carbamat und P<sub>i</sub> und Angriff des Carbamates auf den α-Phosphor des ATP unter Bildung von Carbamoyl-AMP und PP<sub>i</sub>



Um zwischen beiden Reaktionen unterscheiden zu können, eignet sich der Einsatz von teilweise markiertem <sup>18</sup>O-CP, bei dem nur die Sauerstoffatome der P-O Bindung <sup>18</sup>O-markiert sind, während der doppelt gebundene Sauerstoff am Carbonyl-C-Atom nicht markiert ist.



Je nach Reaktionsverlauf sollte unmarkiertes AMP (1. Reaktion) bzw. <sup>18</sup>O-markiertes AMP (2. Reaktion) gebildet werden.

Der Erfolg der Synthese von <sup>18</sup>O-CP wurde mittels eines DC-Trennverfahrens überprüft (Abbildung 31 A, S. 70). Die vollständige <sup>18</sup>O-Markierung der phosphorgebundenen

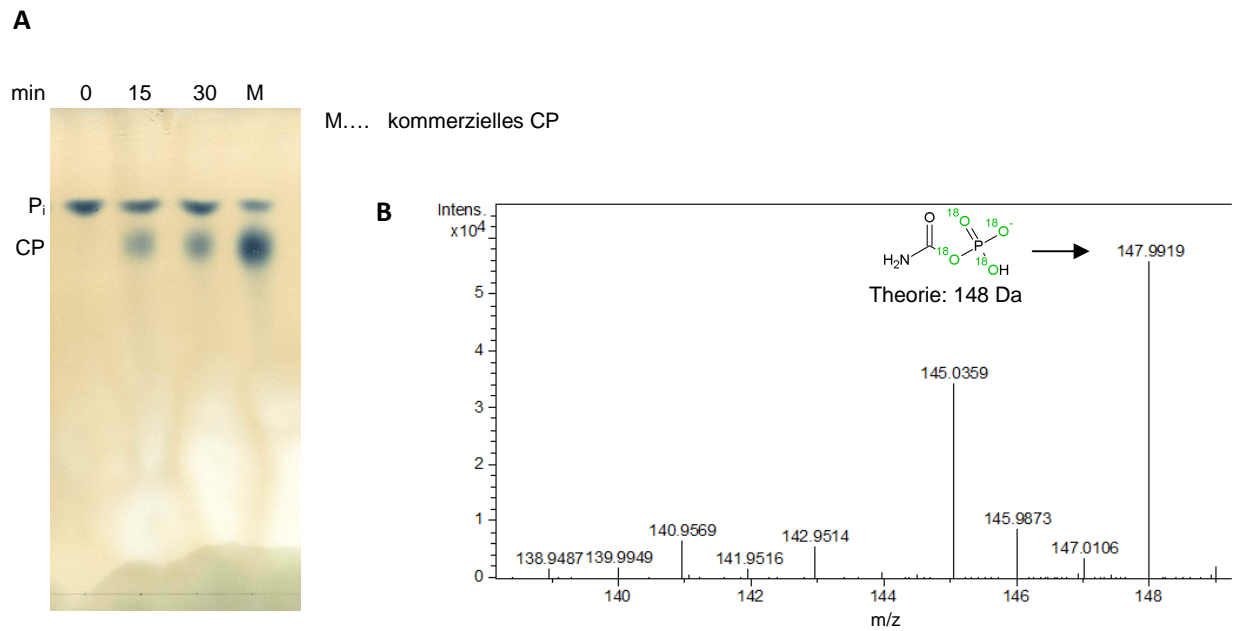


Abbildung 31: Verlauf der <sup>18</sup>O-CP Synthese verfolgt mittels DC und Massenspektrum von <sup>18</sup>O-CP

A) Bild einer Ionenaustausch-DC-Platte der Synthese von <sup>18</sup>O-CP, die mittels eines Ammonium-Molybdat-Ascorbinsäure-Gemisches gefärbte wurde. B) Massenspektrum von <sup>18</sup>O-CP

Sauerstoffe konnte mittels Massenspektrometrie nachgewiesen werden (Abbildung 31 B, S. 70). Zum Startzeitpunkt liegt nur <sup>18</sup>O-markiertes Phosphat vor (Abbildung 31 A, S. 70). Im Verlauf der Reaktion erscheint eine zusätzliche Bande, die dem <sup>18</sup>O-CP zugeordnet werden kann, wobei kein vollständiger Umsatz erzielt werden konnte. Die densitometrische Auswertung ergab ein Substrat-Produkt-Verhältnis von ca. 50 % nach 30 Minuten. Als Referenz wurde kommerzielles CP aufgetragen, jedoch konnte eine Bande entsprechend dem P<sub>i</sub> beobachtet werden. Die densitometrische Auswertung ergab einen Anteil von ca. 85 % CP in der Referenz.

Zur Analyse der Adenosin-Spezies wurden diese analog zum vorherigen Abschnitt mittels Ionenaustausch-Dünnschichtchromatographie getrennt, die AMP-Bande mittels UV-Fluoreszenzlöschung detektiert, von der Oberfläche isoliert und massenspektrometrisch untersucht (Abbildung 32, S. 71).

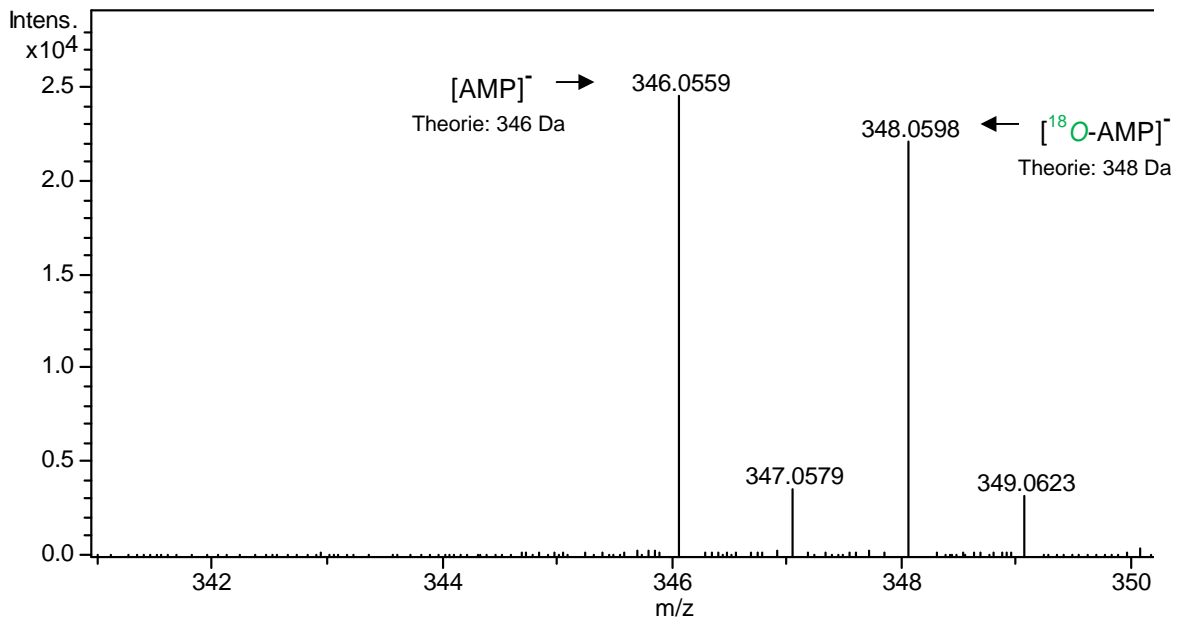


Abbildung 32: Massenspektrum der Analyse von AMP

Dargestellt ist ein Massenspektrum von AMP unter der Verwendung von <sup>18</sup>O-CP für die von TobZ katalysierte Reaktion.

Die Analyse ergab eine fast annähernd gleiche Verteilung von unmarkiertem (Masse: 346 Da) und <sup>18</sup>O-markiertem AMP (Masse: 348 Da), wobei die ermittelten Massen den theoretischen Massen entsprechen (Abbildung 32, S. 71). Interessanterweise deutet dieses Ergebnis auf beide postulierten Reaktionswege hin. Deshalb wurde auch das Produkt Nebramycin 5' massenspektrometrisch untersucht. Aufgrund der methodischen Einschränkung der MS-Analyse konnten nur die zweifach protonierten Spezies nachgewiesen werden, wodurch sich die ermittelten Massen zu den theoretischen Massen halbieren (Abbildung 33, S. 71). Auch für das carbamoylierte Produkt konnte eine annähernd gleiche Verteilung von markierter und unmarkierter Spezies detektiert werden.

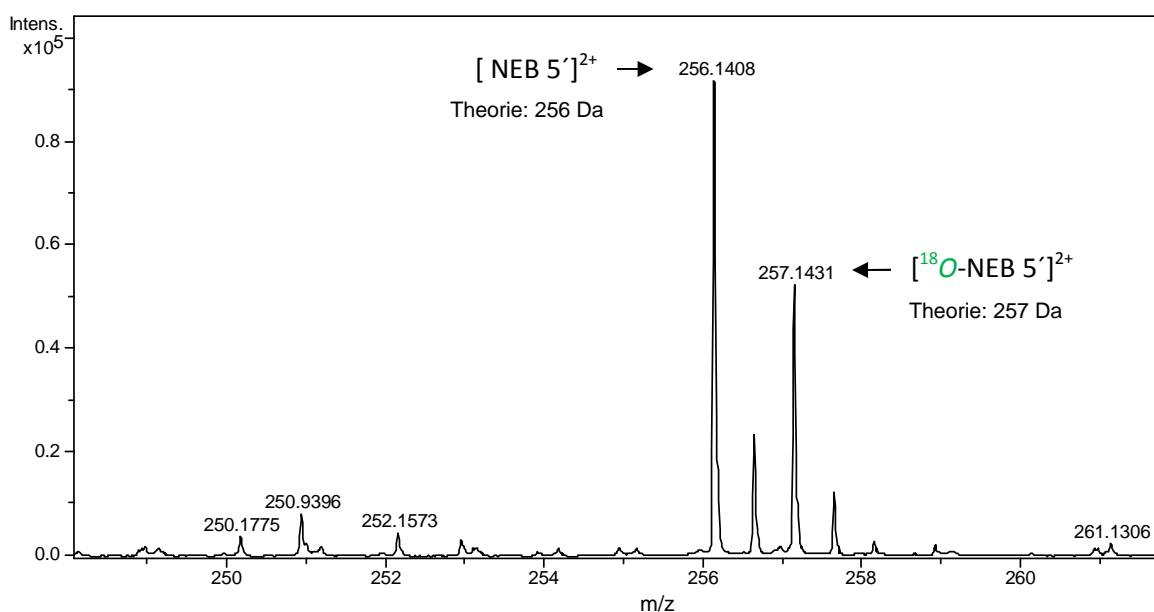


Abbildung 33: Massenspektrum der Analyse von Nebramycin 5'

Dargestellt ist ein Massenspektrum von Nebramycin 5' unter der Verwendung von <sup>18</sup>O-CP für die von TobZ-katalysierte Reaktion, wobei hier die zweifach geladenen Ionen gezeigt sind. NEB 5': Nebramycin 5'

Auf der Basis dieser Ergebnisse kann eine Carbamoyl-AMP-Bildung unter vorheriger ATP-Hydrolyse ausgeschlossen werden. Vielmehr deuten die Ergebnisse auf eine initiale CP-Hydrolyse mit anschließender Adenylierungsreaktion von Carbamat und ATP zum Intermediat Carbamoyl-AMP hin (2. Reaktion).

Um Informationen über den ersten Schritt der CA-Bildung zu erhalten, wurde versucht, verschiedene Substrat-Analoga, sowie eine Pyrophosphatase ( $PP_i$ -ase) einzusetzen (Abbildung 34, S. 72). Wenn ATP $\alpha$ S anstatt ATP eingesetzt wurde, konnte keine carbamoylierte Spezies nachgewiesen werden. Bei Zugabe einer Pyrophosphatase im Vergleich zur Reaktion ohne Pyrophosphatase erfolgte eine stärkere Produkt-Akkumulation, die jedoch nicht in vollständig umgesetzten Tobramycin mündete (Vgl. Abbildung 22, S. 58). Auch eine Verlängerung der Reaktionszeit konnte den Umsatz nicht weiter steigern (nicht gezeigt). Der Einsatz von dATP anstatt des ATP wirkte sich geschwindigkeitsverringend aus. Erst nach etwa 20 Minuten kann die Bildung von Nebramycin 5' beobachtet werden. Der Umsatz ist ebenfalls verringert, sodass nach 2 Stunden noch eine stärkere Bande von Tobramycin im Vergleich zur Produkt-Bande detektiert werden konnte.

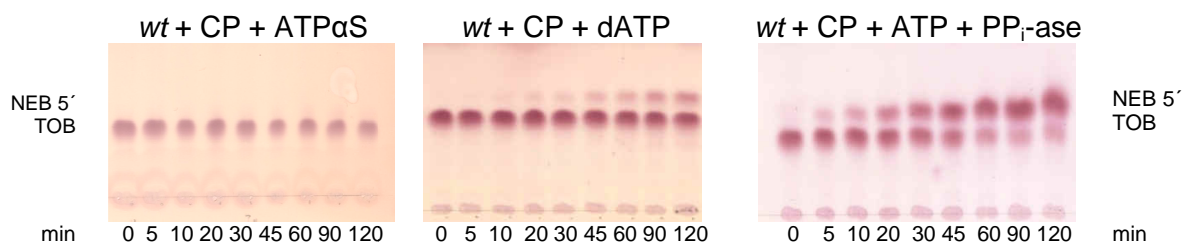
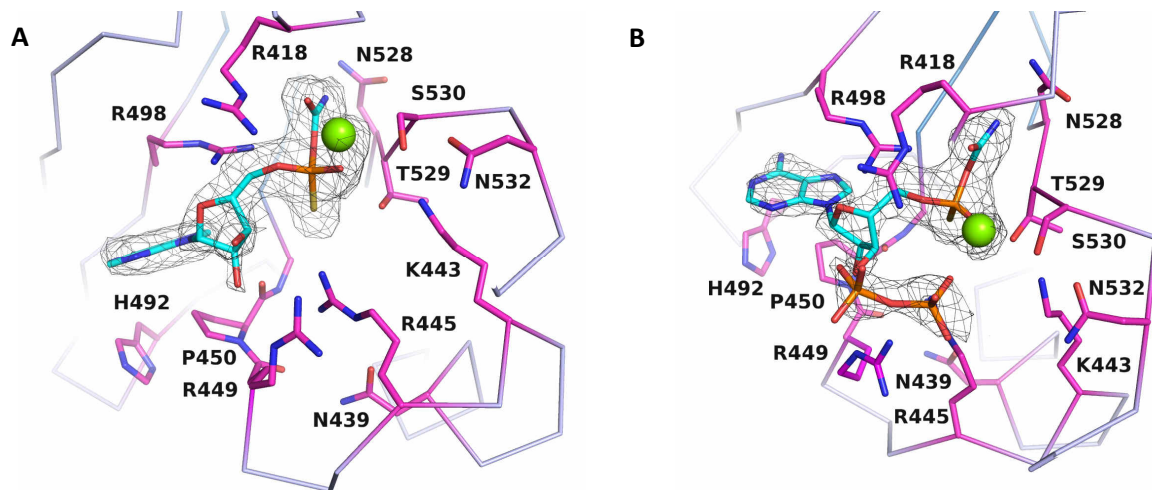


Abbildung 34: DC-Analyse der Aktivität von TobZ wt in Abhängigkeit von ATP $\alpha$ S, dATP bzw. einer  $PP_i$ -ase

Da bei dem ATP-Analogen ATP $\alpha$ S nicht der Brücken-Sauerstoff modifiziert ist, sondern der doppelt-gebundene Sauerstoff am  $\alpha$ -Phosphor durch Schwefel ersetzt ist, besteht ein Stereozentrum am  $\alpha$ -Phosphat, wodurch ein Racemat aus *S*-Enantiomer und *R*-Enantiomer vorliegt. Aus Abbildung 34 (S.72) ist ersichtlich, dass durch den Einsatz von ATP $\alpha$ S kein Tobramycin-Umsatz nachweisbar ist. Eventuell ist eine CP-Hydrolyse-Reaktion möglich, aber aufgrund der Schwefelmodifikation könnte der zweite Schritt der CA-Bildung, der Angriff des Carbamates auf den  $\alpha$ -Phosphor, blockiert sein (Herschlag *et al.*, 1991; Purcell und Hengge, 2005).

Um Informationen über das Reaktionsverhalten des Enzyms mit dem Substrat ATP $\alpha$ S zu erlangen, wurden TobZ wt Kristalle mit CP, ATP $\alpha$ S und Manganchlorid versetzt und anschließend röntgenkristallographisch untersucht. Die Beugungsdaten konnten bis zu einer Auflösung von 2,2 Å ausgewertet werden (Statistiken, Anhang 9, S. 171). Bei Betrachtung der Elektronendichte in der YrdC-ähnlichen Domäne konnte diese eindeutig einem Carbamoyl-AMPS (CAS) zugeordnet werden (Abbildung 35, S. 73). Die Konformation des

Adenylat entsprach dabei der, die für das unmodifizierte Carbamoyl-AMP erhalten wurde (Vgl. Abbildung 29 A, S. 67). Da durch den Ersatz eines Sauerstoffatoms mit Schwefel im ATP $\alpha$ S ein Stereozentrum am  $\alpha$ -Phosphat eingeführt wird, ist auch im CAS ein Stereozentrum vorhanden. Die genauere Betrachtung der Elektronendichte ergab, dass es sich vermutlich vollständig um das *R*-Enantiomer (*R<sub>p</sub>*-CAS) in dieser Domäne handelt (Abbildung 35 A, S. 73). Es konnte eine weitere Elektronendichte in der Nähe der Magnesiumbindestelle beobachtet werden, die als Pyrophosphat interpretiert wurde (Abbildung 35 B, S. 73). Dabei nehmen die beiden Phosphate die Bindestellen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphate des ATP ein. Eine mögliche ATP-Bindung kann höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden, da die Dichte des Carbamoyl-AMPS auf einen vollen Besetzungsgrad des Liganden hindeutet und eine Dichte für das  $\gamma$ -Phosphat nicht vorhanden ist. Unterstützt wird diese Vermutung durch das Vorhandensein einer Dichte an der Metallbindestelle in der Domäne.

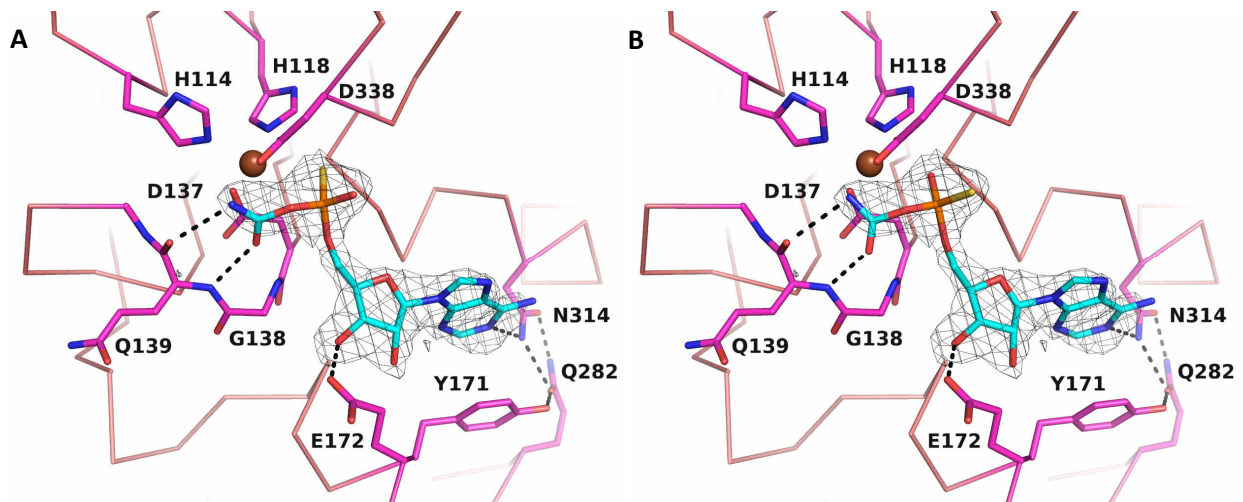


**Abbildung 35: Bindung der Liganden Carbamoyl-AMPS und PP<sub>i</sub> in der YrdC-ähnlichen Domäne von TobZ wt**

Gezeigt ist eine Ribbondarstellung der YrdC-ähnlichen Domäne (blau) des Enzyms TobZ aus verschiedenen Blickwinkeln (A, B). Die abgebildeten Reste sind in *stick*-Darstellung gezeigt. Nicht-C-Atome sind mit den üblichen Farben versehen, wobei die C-Atome der Liganden türkis und die C-Atome der Aminosäuren violett eingefärbt sind. Die *omit-map* der F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>-Dichte (Auflösung 2,2 Å, konturiert mit 3,5  $\sigma$ ) ist in grau dargestellt. Das Magnesiumion ist als grüne Kugel eingezeichnet. Zur Übersichtlichkeit wurde im Bild (A) die Darstellung des Pyrophosphates vernachlässigt.

Die Analyse der Elektronendichte in der Kae1-ähnlichen Domäne ergab ebenfalls eine Dichte, die als CAS interpretiert werden konnte (Abbildung 36, S. 74). Auffällig dabei war, dass die Dichte der Carbamoylgruppe wesentlich schwächer konturiert war im Vergleich zur Dichte, die in der YrdC-ähnlichen Domäne erhalten wurde (Vgl. Abbildung 35 A, S. 73). Dies deutet auf einen geringeren Besetzungsgrad des Carbamoyl-AMPS in der Kae1-ähnlichen Domäne hin. Aufgrund der schwächeren Elektronendichte konnte eine genaue Zuordnung des Stereoisomers nicht erfolgen. Bei Einhaltung der Konfiguration des *R<sub>p</sub>*-CAS aus der YrdC-ähnlichen Domäne konnte festgestellt werden, dass der Schwefel am  $\alpha$ -Phosphat zum gebunden Eisen zeigt (Abbildung 36 A, S. 74). Eine Wechselwirkung kann nicht zu Stande kommen, da Eisen(II)-Ionen ausschließlich mit Phosphat-gebundenen Sauerstoff und nicht

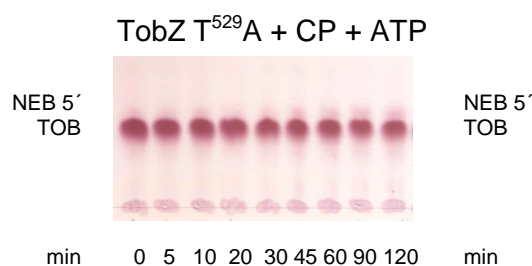
mit Schwefel interagieren können (Richter und Fischer, 2003). Vielmehr ist vorstellbar, dass der Schwefel zur gegenüberliegenden Seite zeigt, wodurch ein Sauerstoffatom mit dem Eisen interagieren würde, was der Bindung des unmodifizierten Carbamoyl-AMP entspricht. Demnach könnte es sich in der Kae1-ähnlichen Domäne höchstwahrscheinlich um das S-Enantiomer des CAS handeln (Abbildung 36 B, S. 74).



**Abbildung 36: Bindung des Liganden Carbamoyl-AMPS in der Kae1-ähnlichen Domäne von TobZ wt**

Gezeigt ist eine Ribbondarstellung der Kae1-ähnlichen Domäne (rot) des Enzyms TobZ mit dem jeweiligen Stereoisomer des CAS (A, B). Die abgebildeten Reste sind in stick-Darstellung gezeigt. Nicht-C-Atome sind mit den üblichen Farben versehen, wobei die C-Atome des R-Enantiomers (links) und des S-Enantiomers (rechts) türkis und die C-Atome der Aminosäuren violett eingefärbt sind. Die omit-map der  $F_0-F_c$ -Dichte (Auflösung 2,2 Å, konturiert mit  $3,5\sigma$ ) ist in grau dargestellt. Das Eisenatom ist als braune Kugel gezeigt.

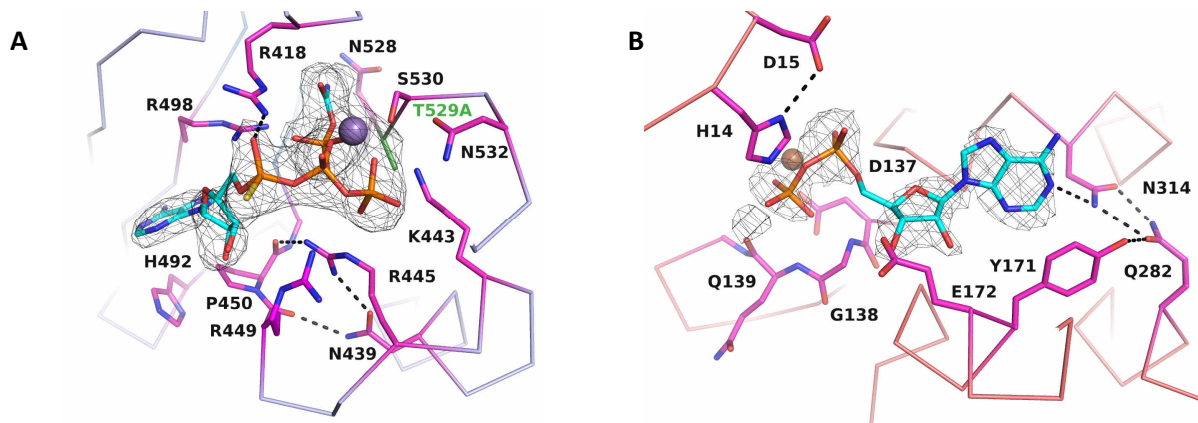
Für die Darstellung des ATP $\alpha$ S-gebundenen Zustands in der YrdC-ähnlichen Domäne ist eine Variante von TobZ erforderlich, die keine initiale CP-Hydrolyse katalysieren kann. Eine Übersicht über die konservierten Reste aufgrund des Vergleiches mit den O-Carbamoyltransferasen NovN, CmcH und NodU ist in Anhang I (S. 160) ersichtlich. Auf Mutationen der Arginin-Reste wurde weitestgehend verzichtet, da diese wahrscheinlich essentiell für die Bindung von CP und ATP sind, um die negative Ladung des Phosphatteils zu kompensieren. Am geeignetsten erschien die Mutation T<sup>529</sup>A, deren Rest über die Hydroxygruppe nur mit dem Phosphat des CP wechselwirkt (Abbildung 30 A und C, S. 68). Die Analyse der Aktivität erfolgte über den Umsatz von Tobramycin. Dabei konnte nur ein sehr geringer Tobramycin-Umsatz detektiert werden, was die Vermutung nahelegt, dass die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich reduziert ist (Abbildung 37, S. 74).



**Abbildung 37: DC-Analyse der Aktivität von TobZ T<sup>529</sup>A**

Da bekannt war, dass ohne das Substrat CP keine Nukleotid-Bindung in der YrdC-ähnlichen Domäne möglich ist, bestand die Gegebenheit, dass durch die Mutation T<sup>529</sup>A die CP-Bindung gestört wurde, was ebenfalls zu einer inaktiven Variante führt (Parthier *et al.*, 2012). Nachdem geeignete Kristalle in den bereits publizierten Bedingungen erhalten wurden, konnten *soaking*-Experimente durchgeführt werden (Parthier *et al.*, 2012). Als Substrate kamen dabei CP und ATPαS in Anwesenheit von Manganchlorid zum Einsatz. Die erhaltenen Streudaten konnten bis zu einer Auflösung von 2,6 Å ausgewertet werden (Statistiken, Anhang 9, S. 171).

Die Analyse der Elektronendichte in der YrdC-ähnlichen Domäne ergab eindeutig interpretierbare Dichte für CP und ATPαS (Abbildung 38 A, 75). Die Bindungseigenschaften des ATP-Analogons sind vergleichbar mit der AMPCPP-Bindung (Vgl. Abbildung 30 A, S.68). Aufgrund der Interaktion des α-Phosphats mit der Seitenkette von R<sup>418</sup> ist wahrscheinlich die Bindung des *R*-Enantiomers im aktiven Zentrum der YrdC-ähnlichen Domäne bevorzugt. Auffällig ist, dass die Seitenkette von R<sup>445</sup> ein Wasserstoffbrückennetzwerk mit dem Hauptketten-Sauerstoff von P<sup>450</sup> sowie der Seitenkette von N<sup>439</sup> ausbildet. Letztere bildet zusätzlich eine *H*-Brücke zum Carbonyl-Sauerstoff von R<sup>449</sup> aus.



**Abbildung 38: Bindung von ATPαS in TobZ T<sup>529</sup>A**

Gezeigt ist eine Ribbondarstellung des Enzyms TobZ mit YrdC-ähnlichen Domäne (blau, A) und der Kae1-ähnlichen Domäne (rot, B). Die abgebildeten Reste sind in *stick*-Darstellung gezeigt. Nicht-C-Atome sind mit den üblichen Farben versehen, wobei die C-Atome der Liganden türkis und die C-Atome der Aminosäuren violett eingefärbt sind. Die *omit-map* der F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>-Dichte (Auflösung 2,6 Å, konturiert mit 3 σ) ist in grau dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen (Abstand: 2,2 - 3,5 Å) sind in schwarz gefärbt. Das Manganion ist als lila Kugel, während das Eisenatom als braune Kugel dargestellt ist.

Die Elektronendichte in der Kae1-ähnlichen Domäne war für den Liganden schwach ausgeprägt, konnte jedoch als ADPαS (welches wahrscheinlich nicht-enzymatischen aus der Hydrolyse von ATPαS resultiert) identifiziert werden, wobei die Stereochemie aufgrund des geringen Besetzungsgrades nicht bestimmt werden konnte. Die Bindung des Nukleotids ist vergleichbar mit der Bindung von unmodifiziertem ADP (Vgl. Abbildung 8 D, S. 7)



Da die Interaktion der Seitenkette von T<sup>529</sup>A hauptsächlich mit dem CP besteht, eignet sich diese Variante für ITC-Messungen zur Bestimmung der ATP-Affinität, wie bereits in Abschnitt 3.2.2 (S. 59) beschrieben wurde.

Aufgrund des beobachteten *H*-Brückennetzwerkes ausgehend von R<sup>445</sup> wurde der Einfluss des Restes an der CP-Hydrolyse untersucht (Abbildung 38 A, 75). Daher wurde die Mutante R<sup>445</sup>K erstellt, die ebenfalls die positive Ladung trägt, wobei der eingeführte Lysin-Rest nicht in der Lage sein sollte, das bereits beschriebene Wasserstoffbrückennetzwerk vollständig auszubilden. Die enzymatische Analyse der Aktivität erfolgte über den Umsatz von Tobramycin, wobei für die Mutante R<sup>445</sup>K kaum Umsatz von Tobramycin mittels DC gemessen werden konnte (Abbildung 39, S. 76). Daher ist möglicherweise auch der Rest R<sup>445</sup> an der CP-Hydrolyse beteiligt. Nach der Kristallisation des Proteins im Tartrat-Puffer

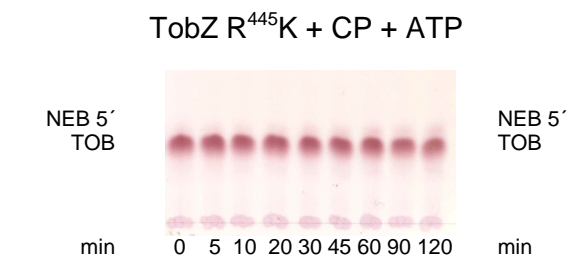


Abbildung 39: DC-Analyse der Aktivität von TobZ R<sup>445</sup>K

konnte anschließend ein *soaking*-Experiment analog zur Variante TobZ T<sup>529</sup>A mit den Substraten CP und ATP durchgeführt werden, wobei der aufgenommene Datensatz bis zu einer Auflösung von 2,3 Å prozessiert werden konnte (Abbildung 40, S. 77) (Statistiken, Anhang 9, S. 171).

Die erhaltenen Elektronendichten für CP und ATP unterscheiden sich kaum im Vergleich zur Struktur von TobZ T<sup>529</sup>A (Vgl. Abbildung 38 A, S. 75). Der Rest R<sup>445</sup>K bildet dabei keine Interaktionen zu dem Carbonyl-Sauerstoff von P<sup>450</sup> aus, jedoch besteht weiterhin die Wechselwirkung zur Seitenkette von N<sup>439</sup>. Wie auch für die Variante T<sup>529</sup>A konnte die in der Kae1-ähnlichen Domäne vorhandene Elektronendichte klar als ADP interpretiert werden, welches wahrscheinlich ebenfalls nicht-enzymatisch aus dem ATP resultiert (Abbildung 40 B, S. 77).

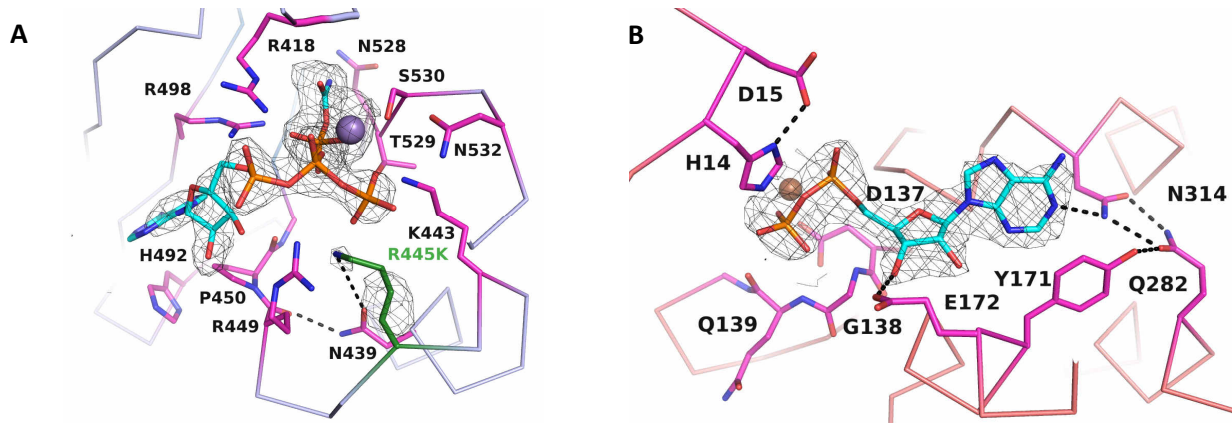


Abbildung 40: Bindung der Liganden in TobZ R<sup>445</sup>K

Gezeigt ist eine Ribbondarstellung des Enzyms TobZ mit YrdC-ähnlichen Domäne (blau, A) und der Kae1-ähnlichen Domäne (rot, B). Die abgebildeten Reste sind in *stick*-Darstellung gezeigt. Nicht-C-Atome sind mit den üblichen Farben versehen, wobei die C-Atome der Liganden türkis und die C-Atome der Aminosäuren violett eingefärbt sind. Die *omit-map* der F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>-Dichte (Auflösung 2,3 Å, konturiert mit 3  $\sigma$ ) ist in grau dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen (Abstand: 2,2 - 3,5 Å) sind in schwarz gefärbt. Das Manganion ist als lila Kugel, während das Eisenatom als braune Kugel dargestellt ist.

Um Informationen über den Einfluss des Wasserstoffbrückennetzwerks mit den beteiligten Resten N<sup>439</sup>, R<sup>445</sup>, R<sup>449</sup> und P<sup>450</sup> zu erhalten, wurde eine Variante TobZ N<sup>439</sup>S generiert, wodurch die Stabilisierung der Seitenkette von R<sup>445</sup> nicht mehr erfolgen sollte. Der Asparaginrest ist ebenfalls hochkonserviert und daher wahrscheinlich essentiell für die CP-Hydrolyse-Reaktion (Anhang 1, S. 160). Der neueingeführte Serinrest sollte zur Stabilisierung der R<sup>445</sup>-beinhalteten Schleife beitragen. Die Variante konnte exprimiert werden, jedoch zeigte sich nach der Reinigung ein starkes Aggregationsverhalten, wodurch keine enzymatische Charakterisierung erfolgen konnte. Es konnten aber Proteinkristalle im Sulfat-haltigen Puffer erhalten werden, die ausreichend verwertbare Streudaten lieferten. Diese wurden dann mit den Substraten CP, ATP und Manganchlorid im Tartrat-Puffer versetzt und anschließend mittels Röntgenkristallographie untersucht. Die Streudaten konnten bis zu einer maximalen Auflösung von 2,4 Å ausgewertet werden (Abbildung 41, S. 78) (Statistiken, Anhang 9, S. 171).

Es konnte Elektronendichte für die beiden Substrate CP und ATP erhalten werden. Die Bindung zeigt keine wesentlichen Unterschiede zu den bisher beschriebenen Substratbindungen. Aufgrund der geringen Dichte am Rest R<sup>445</sup> ist vermutlich keine feste Konformation vorhanden, die wahrscheinlich aus dem fehlenden Wasserstoffbrückennetzwerk resultiert. In der Kae1-ähnlichen Domäne ist weder Dichte für ein ADP noch Carbamoyl-AMP zu erkennen. Ein Hinweis auf Aktivität dieser Variante konnte daher nicht erhalten werden (Abbildung 41 B, S. 78).

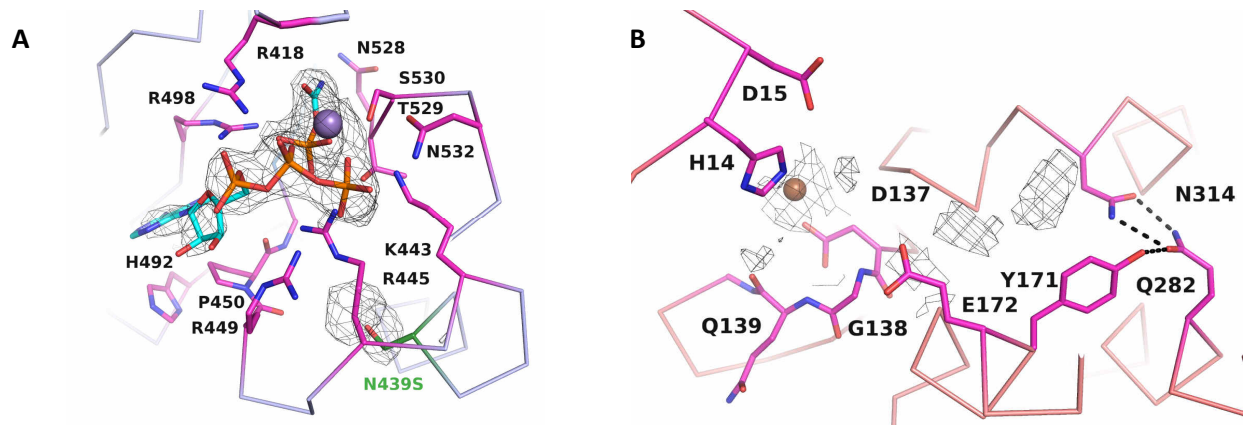


Abbildung 41: Bindung der Liganden in TobZ N<sup>439</sup>S

Gezeigt ist eine Ribbondarstellung des Enzyms TobZ mit YrdC-ähnlichen Domäne (blau, links) und der Kae1-ähnlichen Domäne (rot, rechts). Die abgebildeten Reste sind in *stick*-Darstellung gezeigt. Nicht-C-Atome sind mit den üblichen Farben versehen, wobei die C-Atome der Liganden türkis und die C-Atome der Aminosäuren violett eingefärbt sind. Die *omit-map* der F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>-Dichte (Auflösung 2,4 Å, konturiert mit 3  $\sigma$ ) ist in grau dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen (Abstand: 2,2 - 3,5 Å) sind in schwarz gefärbt. Das Manganion ist als lila Kugel, während das Eisenatom als braune Kugel dargestellt ist.

Die initiale CP-Hydrolyse erfordert vermutlich die Deprotonierung von Wasser, welches anschließend CP zu Carbamat und Phosphat spalten kann. Als mögliche Base kam dabei das K<sup>443</sup> in Betracht, da sich die Aminosäure in der Nähe von T<sup>529</sup> und R<sup>445</sup> befindet und hoch konserviert ist (Abbildung 30 A und C, S. 68 und Anhang I S. 160). Um den Einfluss der Ladung des Restes zu untersuchen, eignen sich Lysin-Methionin-Mutanten. Um aber eine Abstoßung des  $\gamma$ -Phosphates mit der hydrophoben endständigen Methylgruppe der Seitenkette zu vermeiden, wurde eine Variante K<sup>443</sup>A generiert. Diese Variante zeigte ebenfalls kein Umsatz von Tobramycin, welcher mittels DC analysiert wurde (Abbildung 42, S. 78).

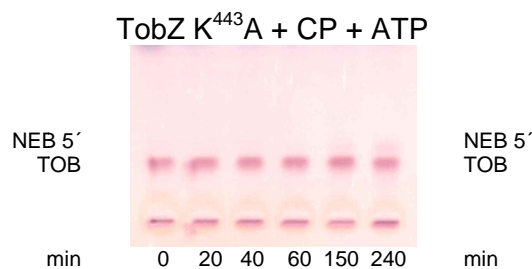


Abbildung 42: DC-Analyse der Aktivität von TobZ K<sup>443</sup>A

Daher wurde die Variante im Tartrat-Puffer kristallisiert und anschließend *soaking*-Experimente mit den Substraten CP, ATP in Anwesenheit von Magnesiumchlorid durchgeführt. Es konnte ein Datensatz bis 2,2 Å aufgenommen und ausgewertet werden (Abbildung 43, S. 79) (Statistiken, Anhang 9, S. 171).

Die Elektronendichte in der YrdC-ähnlichen Domäne konnte eindeutig den Substraten CP und ATP zugeordnet werden. Der Nucleosid-Diphosphat-Teil des ATPs unterscheidet sich kaum von den Strukturen der bisherigen Varianten, dagegen bewegt sich das  $\gamma$ -Phosphat um

ca. 2,2 Å von der Magnesiumbindestelle (nicht im Detail gezeigt). Auffällig ist, dass R<sup>445</sup> wiederum das bereits beschriebene Wasserstoffbrückennetzwerk ausbildet.

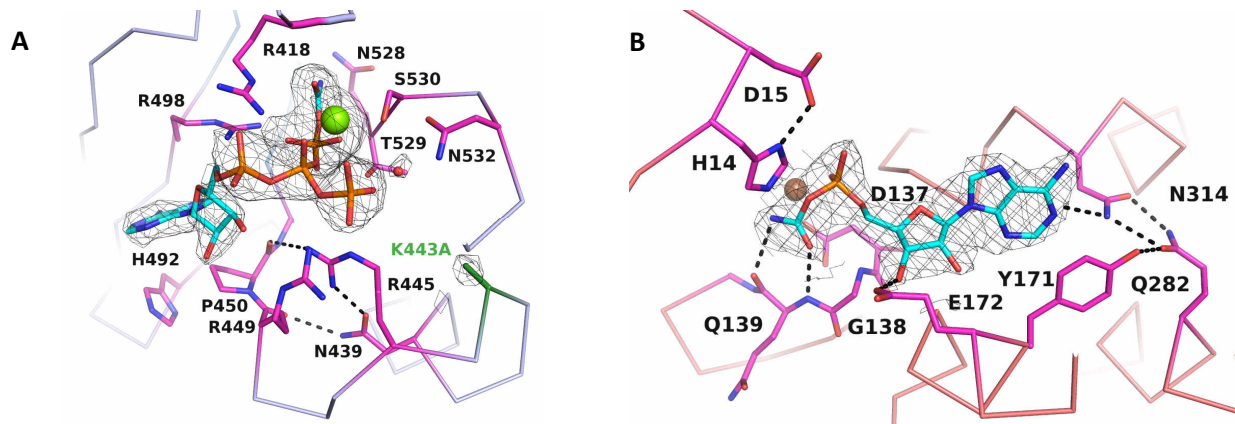


Abbildung 43: Bindung der Liganden in TobZ K<sup>443</sup>A

Gezeigt ist eine Ribbondarstellung des Enzyms TobZ mit YrdC-ähnlicher Domäne (blau, A) und der Kae1-ähnlichen Domäne (rot, B). Die abgebildeten Reste sind in *stick*-Darstellung gezeigt. Nicht-C-Atome sind mit den üblichen Farben versehen, wobei die C-Atome der Liganden türkis und die C-Atome der Aminosäuren violett eingefärbt sind. Die *omit-map* F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>-Dichte (Auflösung 2,3 Å, konturiert mit 3 σ) ist in grau dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen (Abstand: 2,2 - 3,5 Å) sind in schwarz gefärbt. Das Magnesiumion ist als lila Kugel, das Wassermolekül als rote Kugel und das Eisenatom als braune Kugel dargestellt.

Die Interpretation der erhaltenen Elektronendichte in der Kae1-ähnlichen Domäne lässt den Schluss zu, dass es sich um ein Carbamoyl-AMP handelt (Abbildung 43 B, S. 79). Die Bindung ist vergleichbar mit der vorherigen beschriebenen Struktur des TobZ *wt* im Komplex mit dem CA (Vgl. Abbildung 29 B, S. 67).

Die bisher beschriebenen Varianten decken eine Vielzahl von Mutationen der konservierten Reste der CP- und ATP-Bindung ab. Der Rest N<sup>528</sup> ebenfalls hochkonserviert, obwohl dieser nur mit dem Carbonyl-Sauerstoffatom und nicht direkt mit der Seitenkette mit dem CP wechselwirkt (Abbildung 30 A und C, S. 68 und Anhang 1, S. 160). Andererseits stabilisiert die Seitenkette von N<sup>528</sup> die A<sup>419</sup>-beinhaltende Schleife, welche über die Hauptkettenatome von A<sup>419</sup> in direkter Interaktion mit der Carbamoylgruppe des CP bzw. des CA tritt. Deshalb wurde der Einfluss des Restes auf die CA-Bildung mittels N<sup>528</sup>A-Mutante untersucht. Wie für die Variante N<sup>439</sup>S beobachtet wurde, war nach der Reinigung ebenfalls ein starkes Aggregationsverhalten zu verzeichnen. Dies verhinderte eine Bestimmung der Enzymaktivität, jedoch konnte auch für diese Variante Kristalle im Sulfat-haltigen Puffer generiert werden, die dann im Tartrat-Puffer mit CP, ATP und Manganchlorid versetzt wurden. Die Streudaten wurden bis zu einer Auflösung von 2,5 Å ausgewertet (Abbildung 44, S. 80) (Statistiken, Anhang 9, S. 171).

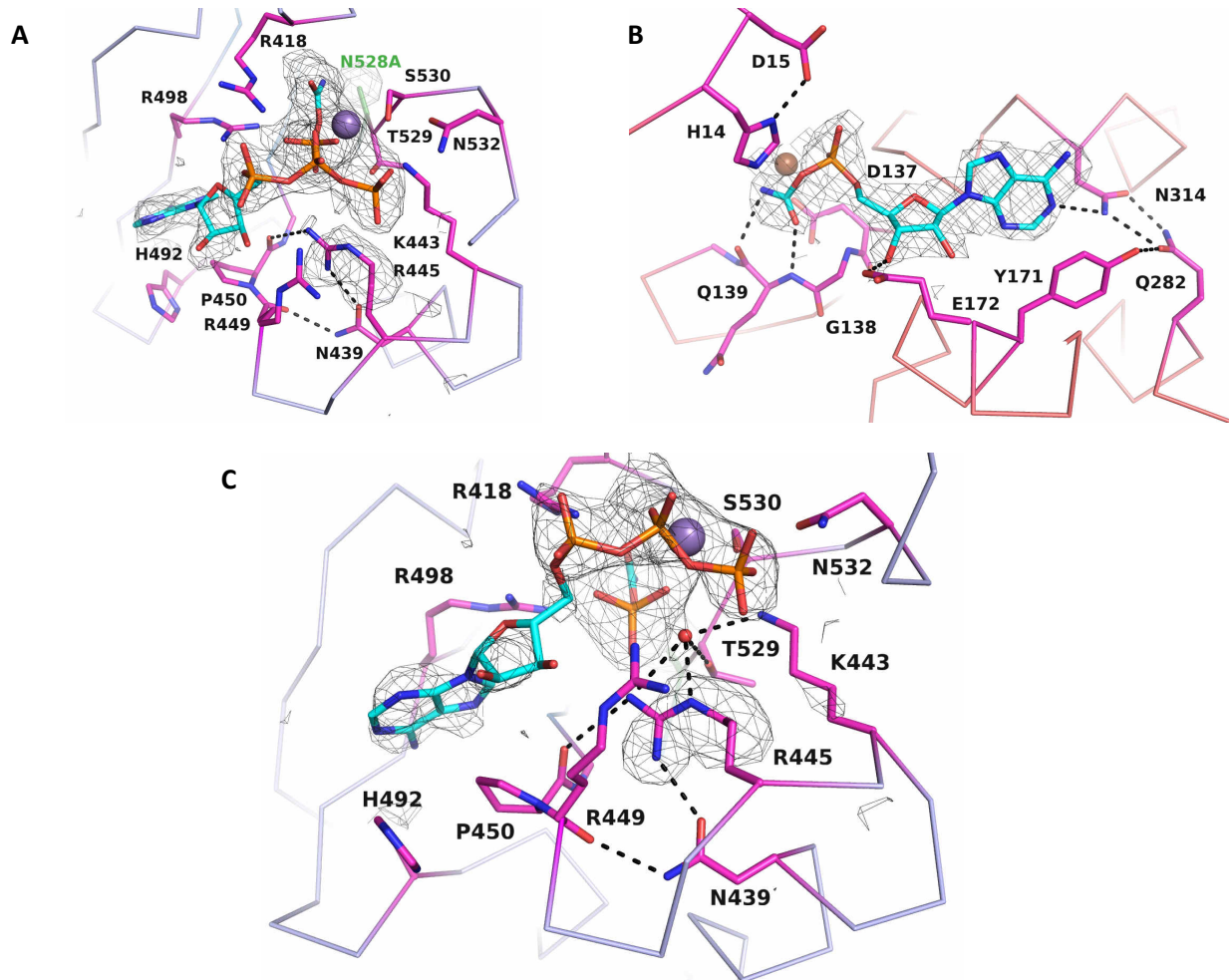


Abbildung 44: Bindung der Liganden in TobZ N<sup>528</sup>A

Gezeigt ist eine Ribbondarstellung des Enzyms TobZ mit YrdC-ähnlichen Domäne (blau, A) und der Kae1-ähnlichen Domäne (rot, B). C) Nahansicht auf das interpretierte Wassermolekül. Die abgebildeten Reste sind in *stick*-Darstellung gezeigt. Nicht-C-Atome sind mit den üblichen Farben versehen, wobei die C-Atome der Liganden türkis und die C-Atome der Aminosäuren violett eingefärbt sind. Die *omit-map* der F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>-Dichte (Auflösung 2,5 Å, konturiert mit 2,5  $\sigma$ ) ist in grau dargestellt. Mögliche Wasserstoffbrückenbindungen (Abstand: 2,2 - 3,5 Å) sind in schwarz gefärbt. Das Manganion ist als lila Kugel, während das Eisenatom als braune Kugel dargestellt ist. Das Wassermolekül ist als rote Kugel eingezeichnet.

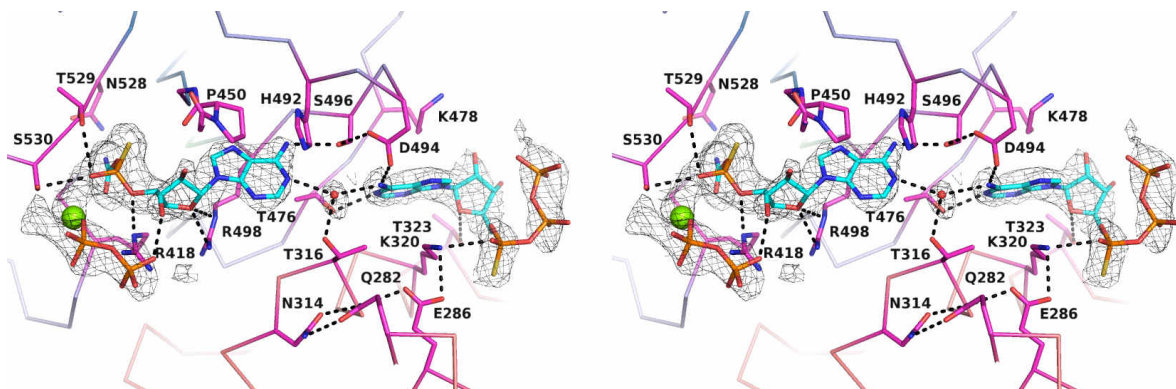
Die Interpretation der Elektronendichte der YrdC-ähnlichen Domäne ergab eine Dichteverteilung für die beiden Substrate CP und ATP, obwohl die Dichte für das Nukleotid deutliche Unterbrechungen zeigt (Abbildung 44 A und C, S. 80). Da keine Dichte für das CA-Intermediat erhalten wurde, kann vermutet werden, dass der Rest N<sup>528</sup> wichtig für die CP-Hydrolyse ist, obwohl keine direkte Wechselwirkung mit den vorher identifizierten Resten K<sup>443</sup>, R<sup>445</sup> und T<sup>529</sup> besteht. Es konnte eine weitere Elektronendichte beobachtet werden, die sich zwischen den Resten K<sup>443</sup>, R<sup>445</sup> und T<sup>529</sup> befindet (Abbildung 44 A und C, S. 80). Diese Dichte wurde als Wassermolekül interpretiert, wobei sich ebenfalls das  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphat des ATP sowie der Phosphatteil des CP in Wasserstoffbrückenbindungsabstand befinden (nicht gezeigt).

Die Analyse der Kae1-ähnlichen Domäne zeigte Elektronendichte, die eindeutig als Carbamoyl-AMP-Molekül interpretiert werden kann, weil sich die Dichte deutlich von einer möglichen ADP-Dichteverteilung unterscheidet. Demnach besitzt die Variante eine reduzierte

Hydrolyse-Aktivität, welche dennoch zum Zwischenprodukt Carbamoyl-AMP führt, welches danach in die Tobramycin-Bindungsdomäne transferiert werden kann. Aufgrund des starken Aggregationsverhaltens der Variante kann diese Annahme nicht mittels enzymatischer Analyse nachgeprüft werden.

### 3.2.6 Identifizierung einer zusätzlichen Nukleotidbindestelle außerhalb der YrdC-ähnlichen Domäne von TobZ

Durch den Einsatz von ATP $\alpha$ S in den *soaking*-Experimenten mit TobZ *wt* Kristallen konnte ein schwefelmodifiziertes Carbamoyl-AMP (CAS) in beiden Domänen von TobZ identifiziert werden (Vgl. Abbildung 35, S. 73 und Abbildung 36, S. 74). Interessanterweise konnte auf der Oberfläche von TobZ außerhalb der Schleußenschleife (V<sup>491</sup> – R<sup>498</sup>) der YrdC-ähnlichen Domäne eine Elektronendichte beobachtet werden, die als R<sub>p</sub>-ATP $\alpha$ S-Molekül interpretiert wurde, wobei kein vollständiger Besetzungsgrad vorlag (Abbildung 45, S. 81).



**Abbildung 45: Stereoabbildung der Bindung von ATP $\alpha$ S außerhalb der YrdC-ähnlichen Domäne von TobZ *wt***

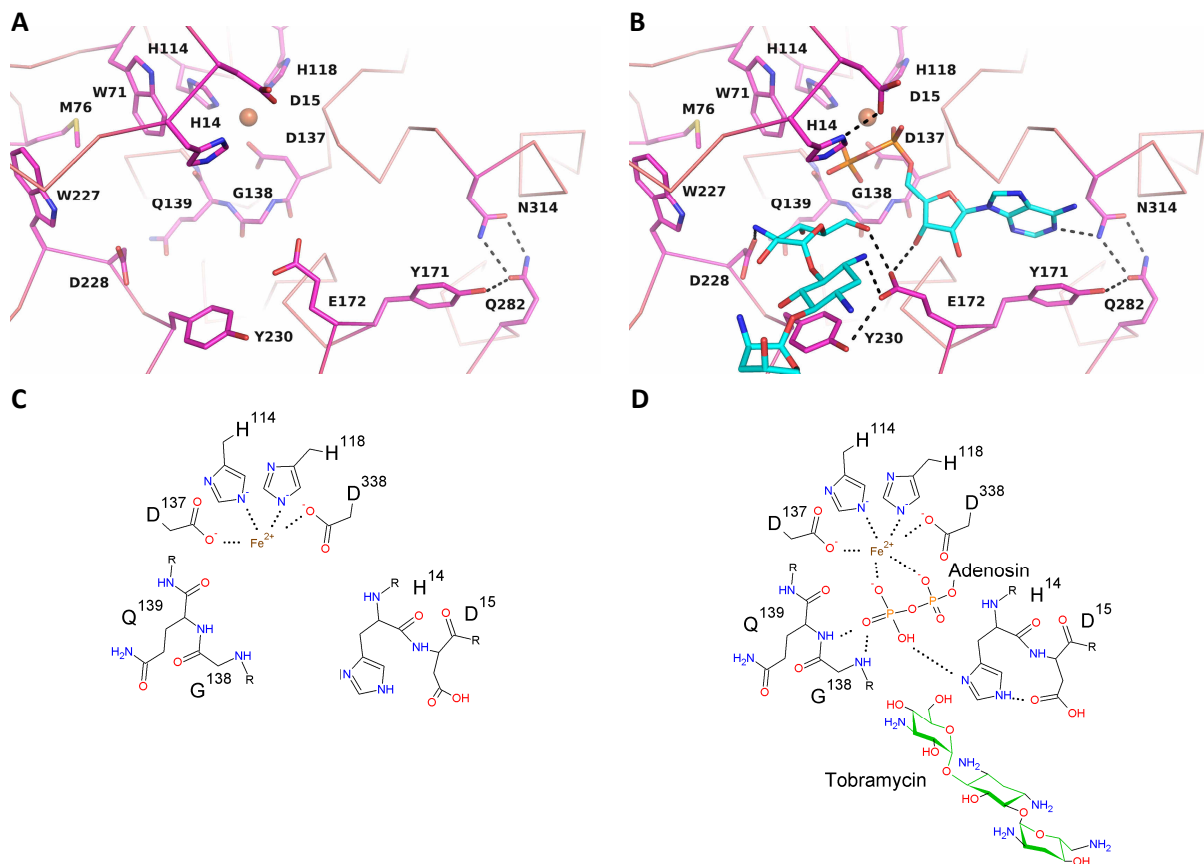
Gezeigt ist eine Ribbondarstellung des Enzyms TobZ mit YrdC-ähnlichen Domäne (blau) und der Kae1-ähnlichen Domäne (rot). Die abgebildeten Reste sind in *stick*-Darstellung gezeigt. Nicht-C-Atome sind mit den üblichen Farben versehen, wobei die C-Atome der Liganden türkis und die C-Atome der Aminosäuren violett und die C-Atome der Schleußenschleife in Gelb eingefärbt sind. Die *omit-map* der F<sub>0</sub>-F<sub>c</sub>-Dichte (Auflösung 2,2 Å, konturiert bei 3  $\sigma$ , abgeschnitten bei 3 Å Abstand) ist in grau dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen (Abstand: 2,2 - 3,5 Å) sind in schwarz gefärbt. Das Magnesiumion ist in grün während das Wassermolekül als rote Kugel eingezeichnet ist.

Die Adeninbase des R<sub>p</sub>-ATP $\alpha$ S wird von dem hydrophoben Teil der Seitenketten K<sup>320</sup> und K<sup>478</sup> in einer *sandwich*-ähnlichen Struktur gebunden. Die polare terminale Aminogruppe des K<sup>320</sup> interagiert mit dem  $\alpha$ -Phosphat des ATP $\alpha$ S über ionische Wechselwirkung und über ein Wasserstoffbrückennetzwerk mit Hilfe der Seitenkette von E<sup>282</sup> mit den Resten Q<sup>282</sup> und N<sup>314</sup>. Interessanterweise sind die beiden letztgenannten wichtig für die Bindung der Adeninbase in der Kae1-ähnlichen Domäne (Vgl. Abbildung 29, C 67). Daher ergibt sich, dass wahrscheinlich das R-Enantiomer des ATP $\alpha$ S bevorzugt an dieser Bindestelle gebunden werden kann, da anderenfalls der weniger elektronegative Schwefel mit der Seitenkette von K<sup>320</sup> interagieren würde, was thermodynamisch nicht favorisiert ist. Zusätzlich besteht ein

Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen der Adeninbase des CAS, welches mit den Seitenketten von T<sup>476</sup>, T<sup>316</sup>, S<sup>496</sup> und D<sup>494</sup> und über ein gebundenes Wassermolekül mit der Adeninbase des R<sub>p</sub>-ATPαS wechselwirkt. Der Riboseteil interagiert über den Ringsauerstoff mit der Seitenkette von T<sup>323</sup>. Eine Interaktion des β- und γ-Phosphates mit dem Enzym konnte nicht festgestellt werden. Eine Elektronendichte, die auf ein Magnesiumion in der Nähe der Phosphate hinweist, konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Es wird ersichtlich, dass Aminosäuren beider Domänen von TobZ an der Nukleotidbindung beteiligt sind. Aufgrund des komplexen Netzwerkes auf der Oberfläche des Enzyms kann davon ausgegangen werden, dass diese Bindestelle tatsächlich existiert und kein Kristallisationsartefakt darstellt.

## 3.2.7 Untersuchung zum Carbamoyltransfer in der Kae1-ähnlichen Domäne

Neben der Charakterisierung des Reaktionsmechanismus der YrdC-ähnlichen Domäne wurde versucht, das Reaktions- und Bindungsverhalten der Kae1-ähnlichen Domäne zu untersuchen. Die hochkonservierten Reste H<sup>14</sup> und D<sup>15</sup> von TobZ befinden sich in der Nähe zur Carbamoylgruppe des CA sowie zur 6''-OH-Gruppe des terminalen Akzeptors Tobramycin und bilden eine *H*-Brücke im nukleotidgebundenen Zustand aus (Abbildung 46, S. 83) (Statistiken, Anhang 9, S. 171).



**Abbildung 46: Vergleich der Kae1-ähnlichen Domäne von TobZ in Abhängigkeit des Ligand-gebundenen Zustands**

Gezeigt ist eine Ribbondarstellung der Kae1-ähnlichen Domäne (rot) des Enzyms TobZ in Abwesenheit aller Liganden (A) und im ADP-Tobramycin-gebundenen Zustand (B). Die abgebildeten Reste sind in *stick*-Darstellung gezeigt. Nicht-C-Atome sind mit den üblichen Farben versehen, wobei die C-Atome der Liganden türkis und die C-Atome der Aminosäuren violett eingefärbt sind. Wasserstoffbrückenbindungen (Abstand: 2,2 - 3,5 Å) sind in schwarz gefärbt. Das Eisenatom ist als braune Kugel dargestellt. PDB:3VEN und 3VET (Parthier *et al.*, 2012)

Das aktive Zentrum der Kae1-ähnlichen Domäne von TobZ in Abwesenheit der Liganden (C) und Bindung von ADP und Tobramycin (D). Die Abbildung wurde auf Basis der Kristallstrukturen aus A) und B) erstellt.

Vermutlich abstrahiert H<sup>14</sup> ein Proton von der 6''-OH-Gruppe des Tobramycins, woraufhin der nukleophile Angriff auf den Carbonylkohlenstoff des CA erfolgen kann. Das protonierte H<sup>14</sup> wird dann vermutlich über die Wechselwirkung mit D<sup>15</sup> stabilisiert. Um eine Aktivierung der 6''-OH-Gruppe zu unterbinden, wurde die Variante H<sup>14</sup>N generiert, da die Seitenkette von Asparagin im physiologischen Milieu nicht protonierbar ist. Die Variante TobZ H<sup>14</sup>N



zeigte einen vernachlässigbaren Umsatz von Tobramycin zum Produkt Nebramycin 5' (Abbildung 47, S. 84).

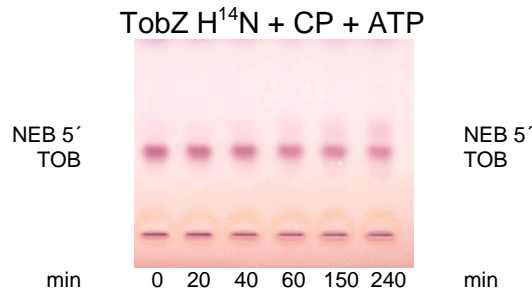


Abbildung 47: DC-Analyse der Aktivität von TobZ H<sup>14</sup>N

Da die bisher veröffentlichte Struktur von TobZ im Komplex mit Tobramycin im ADP-gebundenen Zustand gelöst wurde, sollte sich die Variante H<sup>14</sup>N dazu eignen, den Bindungszustand vor der Carbamoylübertragung auf den Akzeptor Tobramycin im CA-gebundenen Zustand im Kristall zu erhalten. Als Nukleotid wurde das ATP-Analogon ATPαS hinzugeben, um das Enzym im CAS-gebundenen Zustand zu arretieren. Die Arretierung sollte die Bindung von Tobramycin im aktiven Zentrum der Kae1-ähnlichen Domäne begünstigen. Danach wurde das Antibiotikum Tobramycin zu den Kristallen gegeben. Anschließend erfolgte die röntgenkristallographische Untersuchung (Statistiken, Anhang 9, S. 171).

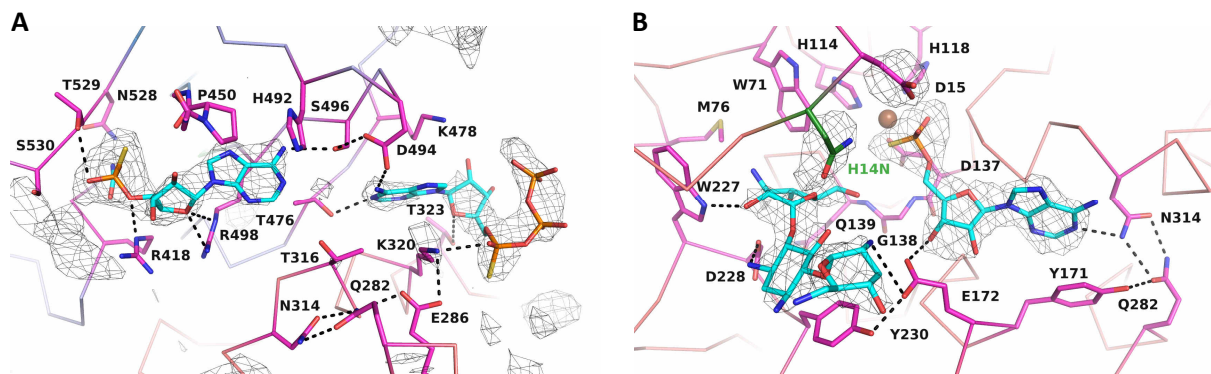


Abbildung 48: Bindung der Liganden in TobZ H<sup>14</sup>N

Gezeigt ist eine Ribbondarstellung des Enzyms TobZ mit YrdC-ähnlichen Domäne (blau, links) und der Kae1-ähnlichen Domäne (rot, rechts). Die abgebildeten Reste sind in *stick*-Darstellung gezeigt. Nicht-C-Atome sind mit den üblichen Farben versehen, wobei die C-Atome der Liganden türkis und die C-Atome der Aminosäuren violett und die C-Atome der Schleusenschleife in Gelb eingefärbt sind. Die *omit-map* der F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>-Dichte (Auflösung 2,8 Å, konturiert mit 2,5σ) ist in grau dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen (Abstand: 2,2 - 3,5 Å) sind in schwarz gefärbt. Das Eisenion ist als braune Kugel gezeigt (rechts).

Die Elektronendichte in der YrdC-ähnlichen Domäne konnte wie erwartet als R<sub>p</sub>-CAS interpretiert werden und zeigte auch die dritte Nukleotidbindestelle auf der Oberfläche des Enzyms (Abbildung 48 A, S. 84 und Vgl. Abbildung 45, S. 81). Die Elektronendichte für das Wassermolekül zwischen den Adeninbasen der Nukleotide und die Dichte für das Magnesiumion und das Pyrophosphat waren deutlich schwächer ausgeprägt, was vermutlich auf die vergleichsweise geringe Auflösung von 2,8 Å zurückzuführen ist.

In der Kae1-ähnlichen Domäne konnte eine Elektronendichte beobachtet werden, die klar dem Substrat Tobramycin entsprach. Die Bindung des Akzeptors unterschied sich leicht von der im ADP gebundenen Zustand (Vgl. Abbildung 46 B, S. 83). Es konnte für alle Ringe des Tobramycins Elektronendichte festgestellt werden. Dabei ist nun der zentrale 4,6-substituierte Desoxystreptamin-Ring über die Seitenkette von Y<sup>230</sup> aufgeschichtet. Die Aminogruppe am C1 interagiert über ionische Wechselwirkung mit der Seitenkette von D<sup>12</sup> und D<sup>228</sup>. Der 6-substituierte Zuckerring ist näher zum möglichen aktiven Zentrum gebunden und die 6''-OH-Gruppe befindet sich in Wasserstoffbrückenbindungsabstand zum Nukleotid. Wahrscheinlich verhinderte das  $\beta$ -Phosphat des ADP durch molekulare Abstoßung eine entsprechende Bindung im ADP-gebundenen Zustand. Die Aminogruppe am C4'' des Tobramycins zeigt dabei energetisch ungünstig in eine hydrophobe Tasche, die von den Aminosäuren F<sup>13</sup>, W<sup>71</sup>, M<sup>76</sup> und W<sup>227</sup> gebildet wird. Zusätzlich bildet die Hydroxygruppe am C2'' eine Wasserstoffbrückenbindung zum Ringstickstoff des W<sup>227</sup> aus. Der 4-substituierte Zuckerring ist über die Seitenkette von Y<sup>42</sup> aufgeschichtet (nicht gezeigt). Des Weiteren interagiert die Aminogruppe am C2' mit der Seitenkette von E<sup>172</sup>.

Es konnte keine Elektronendichte für die Carbamoylgruppe des vermuteten CAS festgestellt werden. Vielmehr deutet die Dichte auf das Vorhandensein des Produktes AMPS hin.

## 3.2.8 Untersuchung zur Substratspezifität von TobZ

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass TobZ neben den natürlichen Akzeptoren Tobramycin und Kanamycin B auch Kanamycin A umsetzen kann (Clausnitzer, 2010). Deshalb wurde versucht, die Substratspezifität von TobZ näher zu untersuchen, um möglicherweise dadurch weitere Akzeptoren für die Carbamoylierung zu finden und dadurch neue Antibiotika mit veränderten Eigenschaften zu generieren. Neben den bereits erwähnten Antibiotika wurden auch Dibekacin und Geneticin (G418) eingesetzt (Abbildung 49, S. 86)

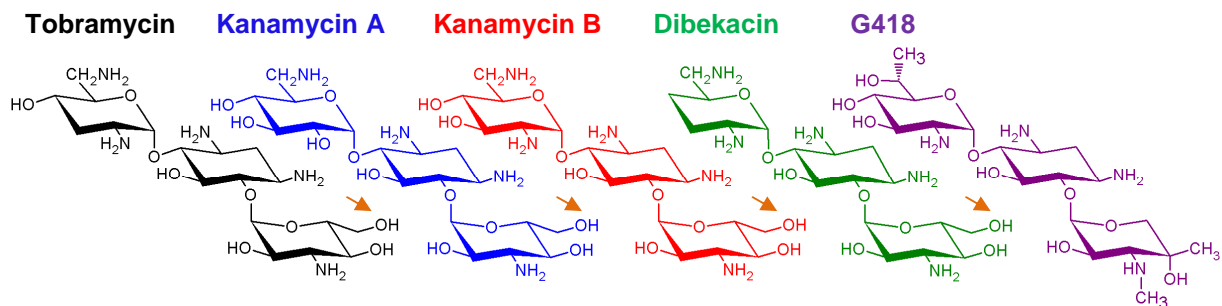


Abbildung 49: Vergleich der Strukturen von TOB, KAN-A, KAN-B, DIB und G418

Chemische Strukturen der AGA Tobramycin, Kanamycin A, Kanamycin B, Dibekacin und G418. Auf die 6''-OH-Gruppe wird mit einem orange-markierten Pfeil hingewiesen.

Wie bereits gezeigt, konnte der Umsatz der sowohl natürlichen Substrate Tobramycin und Kanamycin B als auch für das Kanamycin A nachgewiesen werden (Abbildung 50, S. 86). Für das carbamoylierte Produkt von Kanamycin A, 6''-O-carbamoyl-Kanamycin A, wurde ebenfalls eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt, die eine Carbamoylierung bestätigt, jedoch blieb aufgrund der identischen Massen der Ringe I und III die Modifikation offen, worauf nur aufbauend auf der Tobramycin-Carbamoylierung eine gezielte 6''-O-Carbamoylierung vermutet wurde (Abbildung 49, S. 86) (Anhang 3, S. 163).

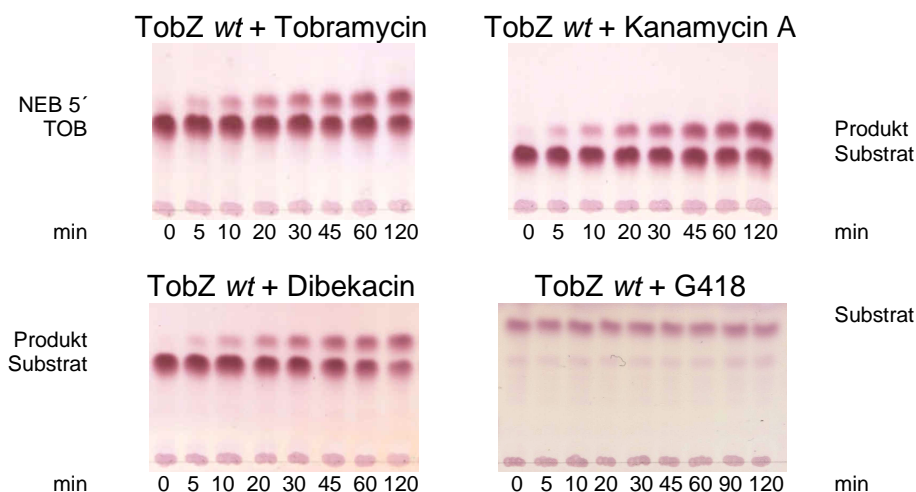
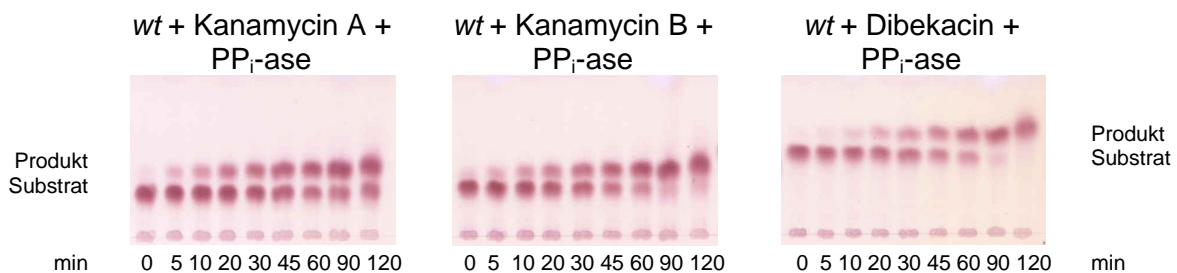


Abbildung 50: DC-Analyse der Aktivität von TobZ wt in Abhängigkeit von Tobramycin, Kanamycin A, Dibekacin und G418

Neben den angegebenen terminalen Akzeptoren wurden zum Aktivitätstest auch die Substrate CP und ATP hinzugefügt.

Des Weiteren ist TobZ in der Lage das semisynthetische Antibiotikum Dibekacin zum Produkt 6''-O-cabamoyl-Dibekacin umzusetzen. Dies stellt neben Kanamycin A ein weiteres Substrat für das Enzym dar. Wie erwartet wurde für G418 (Geneticin) durch das Fehlen der 6''-OH-Gruppe keine Carbamoylierung detektiert.

Da für die Tobramycin-Umsetzung gezeigt wurde, dass der Einsatz einer Pyrophosphatase zu einer erhöhten Produkt-Akkumulation führt, wurde diese auch für die weiteren Substrate eingesetzt (Abbildung 34, S. 72). Das Kanamycin A und B werden ähnlich dem Tobramycin umgesetzt, wobei auch hier kein vollständiger Umsatz vorliegt. Hingegen ist für das Antibiotikum Dibekacin ein nahezu vollständiger Umsatz zu beobachten.



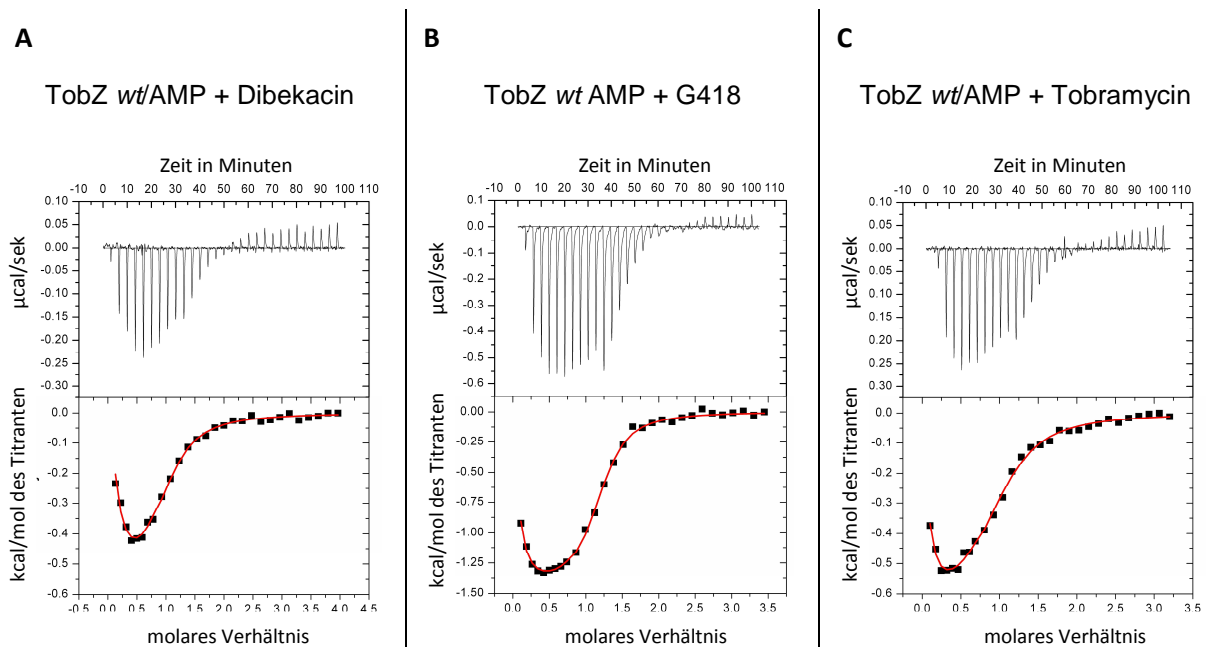
**Abbildung 51: DC-Analyse der Aktivität von TobZ wt in Abhängigkeit vom Akzeptor und einer PP<sub>i</sub>-ase**

Neben den angegebenen terminalen Akzeptoren und der PP<sub>i</sub>-ase wurden zum Aktivitätstest auch die Substrate CP und ATP hinzugefügt.

Da TobZ neben Tobramycin auch das semisynthetische Antibiotikum Dibekacin umsetzen kann, wurde die Affinität der Akzeptoren zum Enzym bestimmt. Desweiteren wurde das Antibiotikum G418 untersucht, das vermutlich aufgrund der fehlenden 6''-OH-Gruppe nicht carbamoyliert werden kann, möglicherweise aber Bindung an das Enzym zeigt. Um eine Bindung der AGA an das Enzym zu ermöglichen, wurde das Enzym vorher mit AMP gesättigt.

Auffällig ist, dass beim Einsatz von G418 deutlich stärkere Bindungswärmen messbar sind im Vergleich zur Tobramycin- und Dibekacin-Messung (Abbildung 52, S. 88). Wie auch schon für die Substrate CP und ATP ist bei der Messung ein weiterer Übergang bei einer Stöchiometrie von ca. 0,5 ersichtlich (Vgl. Abbildung 23, S. 60). Die ermittelten Parameter der beiden Messungen sind in Tabelle 2 (S. 88) zusammengefasst.

Der entropische Beitrag zur Bindung ist bei allen untersuchten Antibiotika nahezu gleich, jedoch ist der enthalpische Beitrag bei G418 mehr als doppelt so hoch, woraus sich eine höhere Affinität des Liganden ergibt. Damit besitzt das strukturell am weitesten entfernte G418 die höchste Affinität der untersuchten Liganden zum Enzym.



**Abbildung 52: Bindungsanalyse von TobZ zu den Liganden Dibekacin, G418 und Tobramycin**

Dargestellt sind die Chromatogramme der Isothermalen Titrationskalorimetrie zwischen TobZ wt mit dem Substrat Dibekacin (A) und dem Akzeptor G418 (B). Zum Vergleich ist die Messung mit dem Substrat Tobramycin aus Abbildung 23 (S. 60) gezeigt (C).

Substrat	Dibekacin	G418	Tobramycin
Protein	TobZ wt	TobZ wt	TobZ wt
Zusätzlicher Ligand	AMP	AMP	AMP
$K_A$ in $\text{mM}^{-1}$	$97,4 \pm 21,7$	$223 \pm 21,8$	$72,4 \pm 8,5$
$K_D$ in $\mu\text{M}$	<b><math>10,3 \pm 2,3</math></b>	<b><math>4,5 \pm 0,4</math></b>	<b><math>13,8 \pm 1,6</math></b>
Stöchiometrie N	$0,94 \pm 0,16$	$1,12 \pm 0,04$	$0,94 \pm 0,05$
$\Delta_B G^\circ$ in kcal/mol	$-6,692 \pm 0,130$	$-7,169 \pm 0,057$	$-6,514 \pm 0,07$
$\Delta_B H_{app}$ in kcal/mol	$-0,653 \pm 0,165$	$-1,482 \pm 0,040$	$-0,680 \pm 0,05$
$-T\Delta_B S_{app}$ in kcal/mol	-6,039	-5,687	-5,834

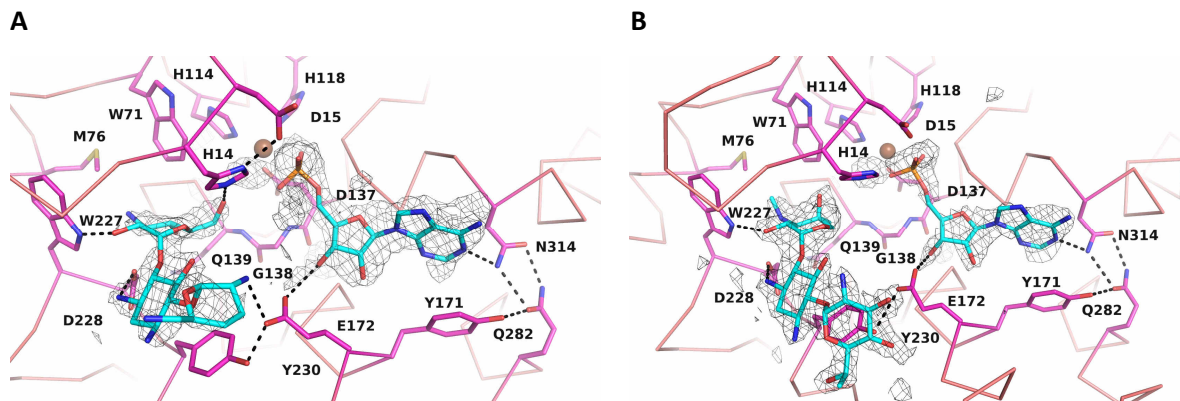
**Tabelle 2: Übersicht über die thermodynamischen Bindungsparameter von Dibekacin, G418 und Tobramycin an TobZ**

Dargestellt sind die thermodynamischen Parameter der Bindung von Dibekacin, G418 bzw. Tobramycin zum Enzym TobZ wt. Für die Bindung der Akzeptoren ist eine Sättigung des Enzyms mit AMP essentiell.

Da aufgrund der erhaltenen Ergebnisse aus dem vorherigen Abschnitt die Bindung des Aminoglykosid-Antibiotikums auch im AMP gebunden Zustand möglich scheint, wurde versucht, Strukturen im Komplex mit den weiteren Akzeptoren Dibekacin und das weniger verwandte G418 zu erhalten (Vgl. Abbildung 48 B, S. 84).

Daher wurden TobZ wt Kristalle mit AMP und dem Antibiotikum Dibekacin bzw. G418 im Tartrat-Puffer versetzt und anschließend röntgenkristallographisch untersucht. Die

Streudaten konnten bis zu einer Auflösung von 2,1 Å bzw. 2,2 Å ausgewertet werden (Statistiken, Anhang 9, S. 171).



**Abbildung 53: Bindung von Dibekacin und G418 in TobZ wt**

Gezeigt ist eine Ribbondarstellung der Kae1-ähnlichen Domäne (rot) des Enzyms TobZ im Komplex mit Dibekacin (A) und G418 (B). Die abgebildeten Reste sind in stick-Darstellung gezeigt. Nicht-C-Atome sind mit den üblichen Farben versehen, wobei die C-Atome des AMP, Dibekacins und des G418 türkis und die C-Atome der Aminosäuren violett eingefärbt sind. Die omit-map der  $F_o - F_c$ -Dichte (Auflösung 2,1 Å für Dibekacin und 2,2 Å für G418, konturiert bei  $3\sigma$ ) ist in grau dargestellt. Das Eisenion ist als braune Kugel gezeigt.

Es konnte eine klare Elektronendichte für AMP sowie das Antibiotikum Dibekacin in der Kae1-ähnlichen Domäne beobachtet werden (Abbildung 53 A, S. 89). Der Bindungsmodus ist vergleichbar mit der des Tobramycins (Vgl. Abbildung 48 B, S.84). Auffälligerweise bildet die 6''-OH-Gruppe des Dibekacins eine H-Brücke zur Seitenkette von H<sup>14</sup> aus. Des Weiteren konnte eine klare Elektronendichte für die Bindung des Antibiotikums G418 beobachtet werden (Abbildung 53 B, S. 89). Der zentrale 4,6-substituierte Desoxystreptamin-Ring ist wiederum über die Seitenkette von Y<sup>230</sup> aufgeschichtet. Die Aminogruppe am C1 interagiert weiterhin mit den Seitenketten von D<sup>12</sup> und D<sup>228</sup>. Die Hydroxygruppe am C2'' interagiert mit dem Ringstickstoff des W<sup>227</sup>, jedoch passt die methylierte Aminogruppe am C3''' energetisch günstig in die hydrophobe Tasche, die von den Aminosäuren F<sup>13</sup>, W<sup>71</sup>, M<sup>76</sup> und W<sup>226</sup> gebildet wird (Abbildung 53 B, S. 89). Aufgrund des Fehlens der 6''-Methylen-, sowie Hydroxygruppe kann die Position der 6''-OH-Gruppe des Dibekacins nicht imitiert werden. Dieser Position kommt dabei die axiale 4''-Hydroxygruppe des G418 am nächsten, wobei zwischen beiden eine Distanz von 2,3 Å besteht, die wahrscheinlich zu groß ist, um eine Carbamoylübertragung zu begünstigen (nicht gezeigt). Der 4-substituierte Zuckerring von G418 zeigt eine Verschiebung zum entsprechenden Ring des Dibekacins, sodass dieser nicht mehr über die Seitenkette von Y<sup>42</sup> aufgeschichtet ist (Vgl. Abbildung 53 A und B, S. 89). Vielmehr wird die geänderte Ausrichtung durch Wechselwirkungen der Aminogruppe am C2' mit der endständigen Hydroxygruppe von Y<sup>42</sup> sowie die Interaktion der 6'-OH-Gruppe mit der Seitenkette von E<sup>234</sup> stabilisiert (nicht gezeigt).

## 3.2.9 Kinetische Untersuchung

Die densitometrische Auswertung der DC-Ergebnisse lieferte für Tobramycin nur unzureichend verlässliche Daten, wohingegen für das Substrat Dibekacin deutlich verlässlichere Daten erhalten werden konnten. Daraus wurde die Reaktionsgeschwindigkeit von TobZ in Gegenwart von Pyrophosphat sowie einer Pyrophosphatase bestimmt (Abbildung 54, S. 90).

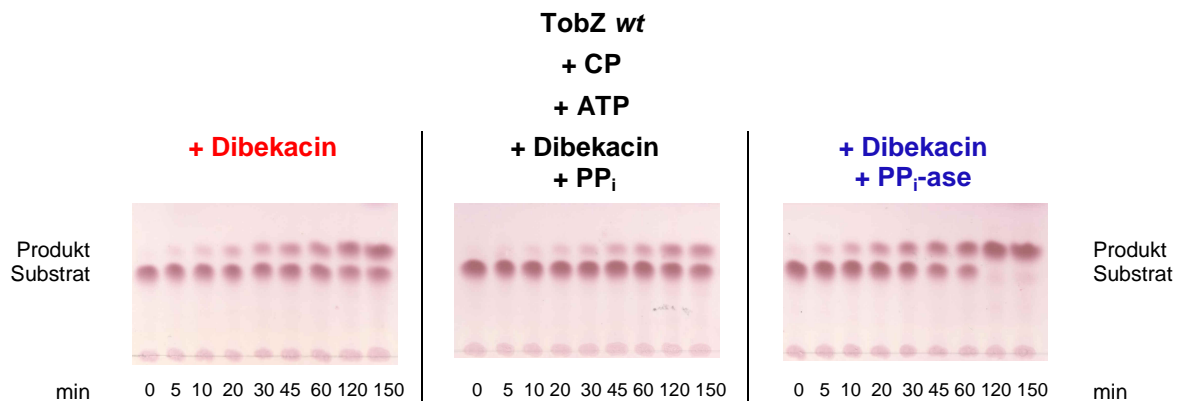


Abbildung 54: DC-Analyse der Aktivität von TobZ wt in Abhängigkeit von  $PP_i$  und einer  $PP_i$ -ase

Die densitometrische Auswertung ergab folgende Werte für den Umsatz von Dibekacin.

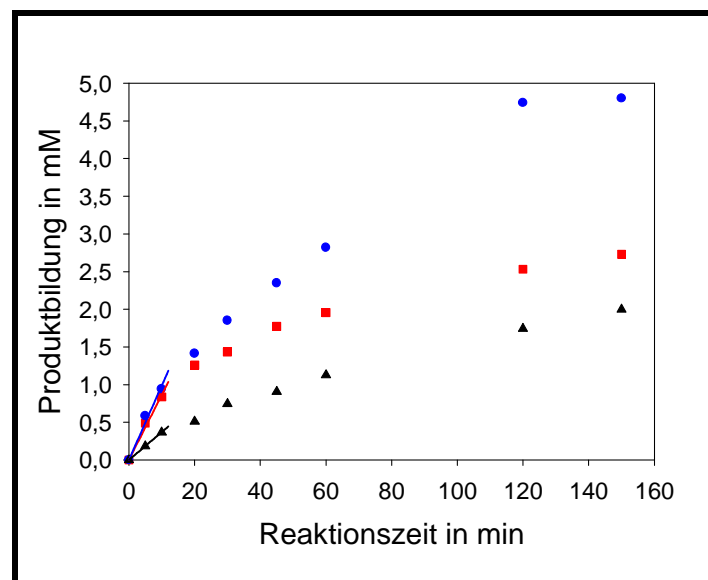


Abbildung 55: Graphische Darstellung der Aktivität von TobZ wt in Abhängigkeit von  $PP_i$  und einer  $PP_i$ -ase

Der gewählte Farbcode für das Diagramm wurde aus Abbildung 54 (S. 90) übernommen. Der ermittelte Anfangsanstieg der jeweiligen Reaktion ist als Linie im Diagramm eingezeichnet

Aus den gemessenen Werten kann der Anfangsanstieg von  $t = 0$  min bis  $t = 10$  Minuten linear ermittelt werden, aus dem sich die Reaktionsgeschwindigkeit berechnen lässt.

	TobZ wt + CP + ATP		
	+ Dibekacin	+ Dibekacin + PP <sub>i</sub>	+ Dibekacin + PP <sub>i</sub> -ase
Anfangsanstieg	86 µM/min	36 µM/min	99 µM/min
$k_{cat}$	4,3 min <sup>-1</sup>	1,8 min <sup>-1</sup>	5,0 min <sup>-1</sup>

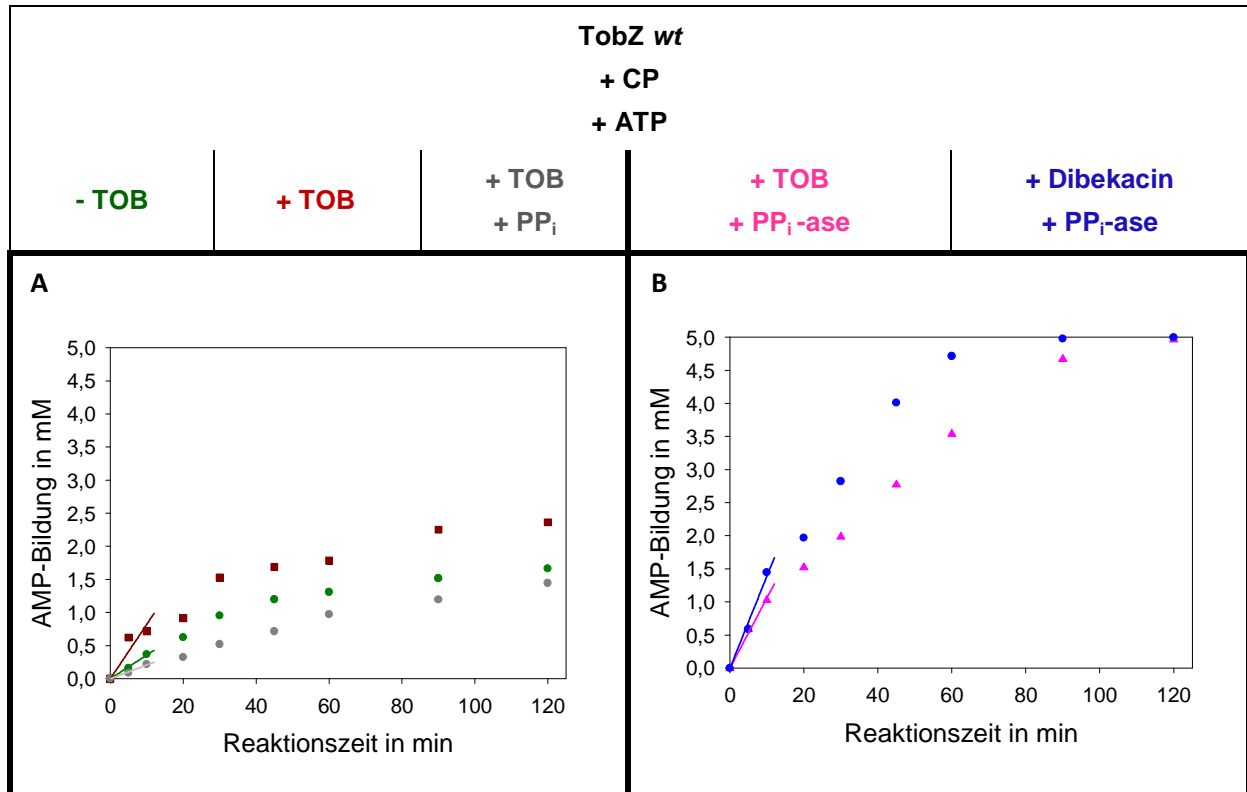
**Tabelle 3: Übersicht über die ermittelten  $k_{cat}$ -Werte**

Dargestellt sind die ermittelten Anfangsanstiege aus den Werten  $t = 0$  min bis  $t = 10$  min aus Abbildung 55 (S. 90). Der  $k_{cat}$ -Wert der entsprechenden Reaktion ergibt sich aus dem Quotient des Anfangsanstieges und der eingesetzten Enzymkonzentration von 20 µM. Der gewählte Farbcode wurde aus Abbildung 54 (S. 90) übernommen

Wie bereits in den vorherigen Ergebnissen gezeigt wurde, katalysiert TobZ in Abwesenheit einer Pyrophosphatase einen ca. 50 % Umsatz des eingesetzten Antibiotikums. Die katalytische Aktivität des Enzyms wurde auf 4,3 Umsätze pro Minute bestimmt (Tabelle 3, S. 91). Dies bedeutet, dass das Enzym ca. 14 Sekunden für einen Umsatz benötigt. Bei Zusatz einer Pyrophosphatase kann ein nahezu vollständiger Umsatz des Dibekacins erreicht werden, wobei die katalytische Aktivität minimal gesteigert wird. Bei Zugabe von Pyrophosphat wird der Umsatz deutlich gesenkt und die Aktivität sinkt um mehr als das Doppelte auf 1,8 min<sup>-1</sup> im Vergleich zur Reaktion ohne Pyrophosphat.

Zum Vergleich der verwendeten Methoden zur Quantifizierung der Zeit/Umsatz Kurven sind im Folgenden ähnliche Ansätze wie in Abbildung 55 (S. 90) mittels *rp*-HPLC getrennt und ausgewertet worden. Zur Übersichtlichkeit sind nur die Werte für AMP aufgezeigt, da die ADP-Werte sehr gering waren und sich über die Zeit kaum änderten (Abbildung 56, S. 92 und Vgl. Abbildung 25, S. 63).





**Abbildung 56: Graphische Darstellung des AMP-Umsatzes in Abhängigkeit des terminalen Akzeptors sowie von PP<sub>i</sub> und einer PP<sub>i</sub>-ase**  
 Dargestellt sind Chromatogramme der AMP-Bildung in Abhängigkeit verschiedener Faktoren A) Reaktion ohne Tobramycin (TOB), in Anwesenheit von TOB und in zusätzlicher Anwesenheit von PP<sub>i</sub>. B) Reaktion in Anwesenheit von TOB und einer PP<sub>i</sub>-ase sowie in Anwesenheit von Dibekacin und einer PP<sub>i</sub>-ase. Der ermittelte Anfangsanstieg der jeweiligen Reaktion ist als Linie im Diagramm eingezeichnet. Der gewählte Farbcode wurde in ähnlicher Form aus Abbildung 54 (S. 90) übernommen

Aus den gemessenen Werten kann der Anfangsanstieg von  $t = 0$  min bis  $t = 10$  Minuten linear ermittelt werden, aus dem sich die Reaktionsgeschwindigkeit berechnen lässt (Tabelle 4, S. 92).

	<b>TobZ wt</b> <b>+ CP</b> <b>+ ATP</b>				
	<b>- TOB</b>	<b>+ TOB</b>	<b>+ TOB + PP<sub>i</sub></b>	<b>+ TOB + PP<sub>i</sub>-ase</b>	<b>+ Dibekacin + PP<sub>i</sub>-ase</b>
Anfangsanstieg	36 $\mu\text{M}/\text{min}$	82 $\mu\text{M}/\text{min}$	20,7 $\mu\text{M}/\text{min}$	106 $\mu\text{M}/\text{min}$	139 $\mu\text{M}/\text{min}$
$k_{\text{cat}}$ (rp-HPLC)	1,8 $\text{min}^{-1}$	4,1 $\text{min}^{-1}$	1,0 $\text{min}^{-1}$	5,3 $\text{min}^{-1}$	7,0 $\text{min}^{-1}$
$k_{\text{cat}}$ (densitom.)	-	(4,3 $\text{min}^{-1}$ )	(1,8 $\text{min}^{-1}$ )	-	5,0 $\text{min}^{-1}$

**Tabelle 4: Ermittelte Geschwindigkeitskonstanten von TobZ in Abhängigkeit des terminalen Akzeptors sowie von PP<sub>i</sub> und einer PP<sub>i</sub>-ase**  
 Dargestellt sind die durch rp-HPLC- bzw. DC-Trennung ermittelten Anfangsanstiege, sowie  $k_{\text{cat}}$ -Werte in Abhängigkeit von PP<sub>i</sub>, einer PP<sub>i</sub>-ase und dem terminalen Akzeptor. Dabei wurden die densitometrisch bestimmten Werte aus Tabelle 3 (S. 91) übernommen. Die in Klammern angeführten Werte wurden nicht mit dem gleichen Akzeptor bestimmt, wodurch ein Vergleich zwischen den Werten möglicherweise unzulässig ist. Der gewählte Farbcode wurde aus Abbildung 56 (S. 92) übernommen

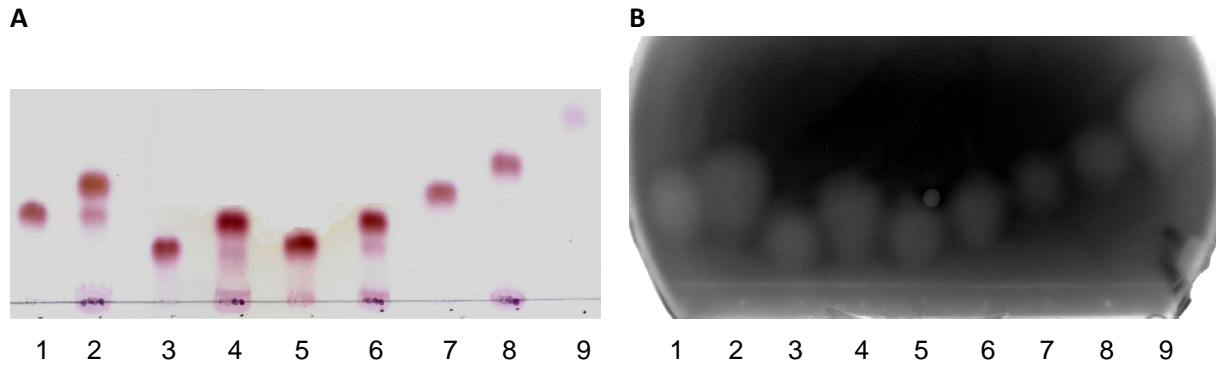
In Abwesenheit einer Pyrophosphatase konnte ein ähnlicher Reaktionsverlauf mit den terminalen Tobramycin bzw. Dibekacin erhalten werden, da bei beiden ein ca. 50 % Umsatz detektiert wurde (Vgl. Abbildung 55, S. 90 und Abbildung 56 A, S. 92). Auch die initialen

Geschwindigkeitskonstanten unterscheiden sich nur minimal. Weiterhin wird ersichtlich, dass die Geschwindigkeit ohne den terminalen Akzeptor nur etwa halb so groß ist im Vergleich zur Reaktion mit Tobramycin. Die Zugabe von  $PP_i$  verringert die Reaktionsgeschwindigkeit auf ca.  $1,0 \text{ min}^{-1}$ , wobei mit der densitometrischen Auswertung ein  $k_{cat}$ -Wert von  $1,8 \text{ min}^{-1}$  ermittelt wurde. Des Weiteren zeigt der Einsatz einer Pyrophosphatase eine geringe Erhöhung der Geschwindigkeit, unabhängig von dem zugesetzten Akzeptor. Somit sind die  $k_{cat}$ -Werte, die durch die beiden Methoden (densitometrisch und *rp*-HPLC) erhalten wurden vergleichbar, wobei densitometrisch nur Werte für das Antibiotikum Dibekacin verlässlich ausgewertet werden konnten.

### 3.3 Nachweis der antibiotischen Wirkung carbamoylierter Antibiotika

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die carbamoylierten Produkte Nebramycin 5' und Kanamycin A antibiotisch aktiv gegen den grampositiven Stamm *Micrococcus luteus* sind (Clausnitzer, 2010). In Rahmen dieser Arbeit wurde der antibiotische Effekt auf das gramnegative Bakterium *E. coli* untersucht sowie die Spezifität des Effekts durch die plasmidcodierte Resistenz gegenüber Kanamycin-Antibiotika weiter analysiert. Desweiteren lassen sich durch den Expressionsstamm *BL21 (DE3)* eine Vielzahl an verschiedenen klonierten Resistenzgenen exprimieren, wodurch der Einsatz von krankheitserregenden Organismen zur Untersuchung des antibiotischen Effekts vermieden werden kann.

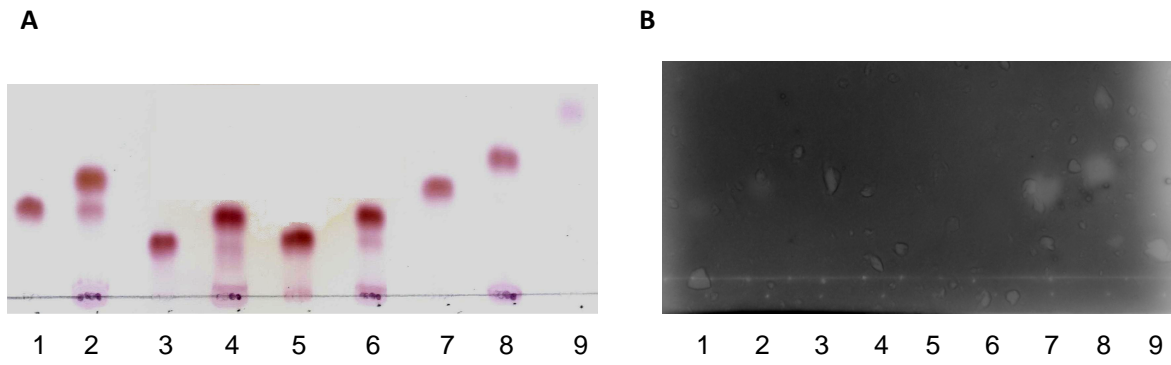
Für das Bioautogramm wurden zunächst die charakterisierten Antibiotika und deren jeweilige carbamoylierte Produkte nebeneinander aufgetragen und mittels DC separiert. Zusätzlich wurde auch das nicht-umgesetzte G418 aufgetragen. Zum Vergleich wurde eine Dünnschichtplatte mit Ninhydrinlösung entwickelt, während eine zweite, identische Platte mit einer Kultur eines *E. coli BL21 (DE3)* Stammes, der sich in der exponentiellen Wachstumsphase befand, überschichtet wurde. Nach ca. 4 Stunden wurden die lebenden Zellen über die intrinsische Fluoreszenz bei 470 nm angeregt und bei 509 nm detektiert (Renggli *et al.*, 2013). Das Bioautogramm zeigt 9 Hemmhöfe, die eindeutig dem jeweiligen Antibiotikum zugeordnet werden konnten (Abbildung 57, S. 94). Sämtliche Antibiotika, sowohl nicht-carbamoylierte (Spuren 1, 3, 5, 7, 9) als auch carbamoylierte (Spuren 2, 4, 6, 8) zeigen eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum von *E. coli* Zellen. Demnach erscheinen die carbamoylierten AGA ebenso antibiotisch aktiv (Abbildung 57 B, S. 94, Vgl. Spur 7 und 8).



**Abbildung 57: DC-Analyse verschiedener Akzeptoren und Bioautogramm**

Dargestellt ist die DC-Trennung verschiedener Akzeptoren (A). Der antibiotische Effekt wurde mittels Bioautogramm nachgewiesen (B). 1... Tobramycin, 2... Nebramycin 5', 3... Kanamycin A, 4... 6''-O-carbamoyl-Kanamycin A, 5... Kanamycin B, 6... Nebramycin 4, 7... Dibekacin, 8... 6''-O-carbamoyl-Dibekacin, 9... G418

Neben der antibiotischen Wirkung der carbamoylierten AGA könnte eine weitere Eigenschaft der Modifizierung in der Verhinderung der chemischen Inaktivierung durch Resistenzvermittelnde Enzyme liegen (Kondo und Hotta, 1999; Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999). Dies würde gegebenenfalls das Einsatzspektrum der carbamoylierten Antibiotika erweitern, da AGA durch Phosphorylierung, Acetylierung und Nukleotidylierung modifiziert und damit inaktiviert werden (siehe Abschnitt 1.2.2, S. 16). Um diesen Aspekt zu untersuchen, wurden *E. coli* BL21 (DE3) Stämme genutzt, die das pUBS Plasmid tragen (Brinkmann *et al.*, 1989). Dieses Plasmid codiert zwar für eine seltene tRNA, jedoch ist zur Selektion des Plasmids ein Resistenzgen enthalten, welches für eine Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase (APH (3')) codiert, das 3'-OH-Gruppen-enthaltende AGA spezifisch phosphoryliert (Hashimoto-Gotoh *et al.*, 1995). Somit sollten Kanamycin A, B und G418 inaktiviert, jedoch Tobramycin und Dibekacin unempfindlich gegenüber der Phosphotransferase sein (Vgl. Abbildung 17, S. 18 und Abbildung 49, S. 86). Es sind nur 4 Hemmhöfe zu erkennen, wobei die antibiotische Wirkung deutlich schwächer ausgeprägt ist (Abbildung 58, S. 95). Es konnte, wie erwartet, für Tobramycin und Dibekacin sowie deren carbamoylierter Produkte Hemmhöfe beobachtet werden (Spuren 1, 2, 7 und 8). Für Kanamycin A, B und G418 sind erwartungsgemäß keine Hemmspots erkennbar, was auf das Vorhandensein des Resistenzgens zurückzuführen ist. Für die Produkte 6''-O-carbamoyl-Kanamycin A und Nebramycin 4 sind ebenfalls keine Hemmhöfe erkennbar, was darauf schließen lässt, dass die TobZ-vermittelte 6''-O-Carbamoylierung die Aktivität der Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase nicht beeinträchtigt und somit die Resistenz der *E. coli* Zellen gegenüber diesen carbamoylierten Antibiotika erhalten bleibt.

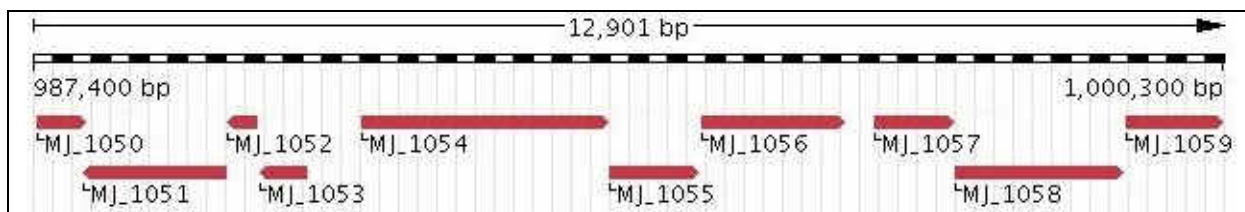


**Abbildung 58: DC-Analyse verschiedener Akzeptoren und Bioautogramm in Abhängigkeit einer APH(3')**

Dargestellt ist die DC-Trennung verschiedener Akzeptoren (A). Der antibiotische Effekt wurde mittels Bioautogramm nachgewiesen (B). 1... Tobramycin, 2... Nebramycin 5', 3... Kanamycin A, 4... 6''-O-carbamoyl-Kanamycin A, 5... Kanamycin B, 6... Nebramycin 4, 7... Dibekacin, 8... 6''-O-carbamoyl-Dibekacin, 9... G418

#### 4 Ergebnisse der Charakterisierung der putativen O-Carbamoyltransferase Mj1051

Um einen weiteren Vertreter der Enzymklasse zu untersuchen, wurde versucht eine putative O-Carbamoyltransferase aus einem thermophilen Organismus zu exprimieren. Proteine aus solch einem Organismus weisen auch *in vitro* eine enorme Thermostabilität auf. Dies hat einen zusätzlichen positiven Einfluss auf die Expression und Löslichkeit der Proteine, wenn sie heterolog z.B. in *E. coli* exprimiert werden. Die Suche nach ähnlichen Enzymen (*Blast-Search*) in der *UniProt*-Datenbank ausgehend von der Primärsequenz von TobZ ergab unter anderem zwei putative O-Carbamoyltransferasen aus dem methanogenen Organismus *Methanocaldococcus jannaschii* (Abbildung 60, S. 97) (*The UniProt Consortium, 2015*). Das apathogene thermophile Archaeon wurde erstmals 1983 wissenschaftlich beschrieben und weist eine optimale Wachstumstemperatur bei 85 °C auf (Jones *et al.*, 1983). Weiterhin war der Organismus der Erste aus der Domäne der Archaea, dessen Genom sequenziert werden konnte (Bult *et al.*, 1996; Graham *et al.*, 2001). Interessanterweise ist das Archaeon der bis dato (Stand: Februar 2012) einzige Organismus, der die Gene für zwei unterschiedliche putative O-Carbamoyltransferasen besitzt (Abbildung 59, S. 96). Eine biologische Funktion wurde für beide Enzyme bisher nicht beschrieben. Die Aminosäuresequenzen der beiden putativen O-CTasen Mj1051 und Mj1058 wurden mit der Sequenz von TobZ verglichen (Abbildung 60, S. 97). Auffällig ist, dass zum einem das HD-Motiv der N-terminalen Kae1-ähnlichen Domäne bei Mj1051 zu einem HN-Motiv verändert ist und zum anderen ist das KxR-Motiv in der C-terminalen YrdC-ähnlichen Domäne von TobZ nicht vollständig vorhanden ist. Hingegen sind diese Motive für Mj1058 konserviert. Das HD Motiv bildet eine mögliche katalytische Diade im nukleotidgebundenen Zustand der Kae1-ähnlichen Domäne von TobZ aus, während dem KxR Motiv vermutlich eine entscheidende Rolle im initialen Schritt der Carbamoyl-AMP-Synthese zukommt.



**Abbildung 59: Ausschnitt der codierten Gene von *M. jannaschii***

Der gezeigte Abschnitt des Genoms ist durch die entsprechenden Basenangaben gekennzeichnet. Die putativen exprimierten Gene sind als rote Balken dargestellt und entsprechend nummeriert. Der spitz-zulaufende Teil des Balkens markiert das Ende der Leserichtung. Mj1051 und Mj1058 stellen dabei die O-Carbamoyltransferasen dar. Abbildung übernommen und modifiziert aus *European Nucleotide Archive* (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/L77117>)

#### 4 Charakterisierung von Mj1051

Mj1051	----MILGIC-DG <b>HN</b> AS-SSLIKRDEILFAMSEERFTRKKNQRG-----	38
Mj1058	--MVKILGVKYFL <b>HD</b> SGVFYIDTKNKEIFGILTERVTRIKHDGGTVIPILNEYPKLKNID	58
TobZ	MRVLGLNGWPRDF <b>HD</b> ASAALLVDGRIAFAE-EERFTRKKHGYN-TAPVQAAAFCLAQAG	58
	: * : : : * . ** . ** * : .	
Mj1051	-----FPEKSVDYILNKVKPDEIN-----	57
Mj1058	YVAYPFEQTNLDFILFKHIDDIKRTYKPKYIKEYAKYKKELSQNKTKFVLNNIYRPFIV	118
TobZ	LTVDDLDAVAFGWDLPAMYRERLG-----	82
	: . : * : :	
Mj1051	-----YVSVGGVFRRGERIKKLEKQNRINKKFLYFYHHISHS---YLFKLS	102
Mj1058	EILAVYGLRKLFLKRFNNIYNKLGNLAIKRELKIKFRKDVSLYEHHLCHAASAYYFSPFF	178
TobZ	-----GWPHSDEALDILLPRDVFPRRTDPLHFVQHHLAHAASAYYFSGED	129
	. . : : . . ** : * *	
Mj1051	FKEALVISIDGGGDLSFLASIANKN-NLEIIAQS-----DLID-----	140
Mj1058	PKETLVFTLDGIGDWKYHSLWLFKEY-DYRLVSYSSFDIICYDDVEGIF-----KGA	229
TobZ	RGAVLIVDGQGECEVTLAHAEGGKITVLDTPVGAWSLGFYEHVSEYTGKGGDNPQKLM	189
	. * . : * : : : : : .	
Mj1051	SVGDFYASITELLGFKPMEDEGKVMSSSYEGEDDINLTTIDYIKELKSFKNYLGVIQYE	200
Mj1058	SIGHIYSLFTEILGFTPNSEDEGKTEALAAAYGKPNGE-----LYNLLKKGKINKEKLWE	284
TobZ	GLAAHGTTVDETLAFAFSDGYRLNLIDPQARDPED--WDEYSVTERAWFAHLERIYRL	247
	. : . : . * * . . . : * * : : * : : :	
Mj1051	ATKALKKLIVSDK---SQLSFEKDKVR---ISKFAQRTLENIVLKAIDDLSEYINIDNIVF	254
Mj1058	HDINILKKLHNKQ---YLQWKKEKIGDENFAATIQRWLEDTVVEYLNIVYEKFKIQRLAM	341
TobZ	PPNEFVRRYDPAKGRVVRDTRRDPEYERDLAATAQAALERAFLGLADSVLARTGERTLFV	307
	: : : : . : : : * * * . : : . : .	
Mj1051	VGGVAQNVKLNLSKIAEKY---NLFVPPFMGDEGLCLGASLADKRIDRININ---NTYFGY	308
Mj1058	AGGVVANVIMNINIFERTPFEEELYIFPAMGDDGVAAGAAIKAVELGEDISWLKDLEMPY	401
TobZ	AGGVGLNATMNGKLLTRSTVDKMFVPPVASDGVSLGAAAVALVELGDRIAP--MGDTAA	365
	. * * * . * . : * : : : : * . * * . * * : *	
Mj1051	EIENERAEKILEELKNKLNLDYKIEFVVEE-RDIPEVIGNLILDNKVVCLSRGKMEFGPRAL	367
Mj1058	WGPNYSREDVEKELKDKWKDKITYEYIGEKWPEIAAEMIAKGNIIAVYQGKMEFGPRAL	461
TobZ	WGPEFSPDQVRAALDR----TGLAYREP-ANLEREVAALIASGKVVGWAGRGEVGPAL	420
	: : : * . : : . . . : * . : : : * : * . * * * *	
Mj1051	GNSVIALPTK-ENKEKINKKL <b>KR</b> -SWFMFPAPTILYDFIDYILINPRYSPFMTQIFKVK	425
Mj1058	GNSILADPRDPKTRDKINSTV <b>KRR</b> PWFQPFPCPSVLEERERLFEKSYKHKHMAIAFRMK	521
TobZ	GQRSLLSAHSPTMRDHINLRV <b>KDR</b> EWWRPFAPSMRLRSVSDQVLEVDADFPYIMTTKVR	480
	* : * * : . . . : * * * : * * * * * . : : : . * : : :	
Mj1051	ENKIKEIEGVIHVDKTRPQTLKKDSNKTIFYGIIRYIYDSIGIPVVLNTSFNLHGEPIC	485
Mj1058	KEFWDKLPAMHIDGTARPQVVEEKDNPYRLLKFKFEITGYGIVINTSFNLHGRTIVR	581
TobZ	AAAYAERLPSVVHEDWSTRPQVTEASNPRYHRMLTELGLDVGDPVCLNTSFNDRGEPIS	540
	. . : . : * * : * * : : . * : : : : : * : : * * * * * : * . * * *	
Mj1051	NEKDAINSFLKADFDALLGNLYLISKVK--	513
Mj1058	TPEDAITDFIDCNIDAMFIEGYLVKRKI--	609
TobZ	SPADALLTFSRLPIDALAVGPYLVTKDLRH	570
	. * * : * : * * : : * * : :	

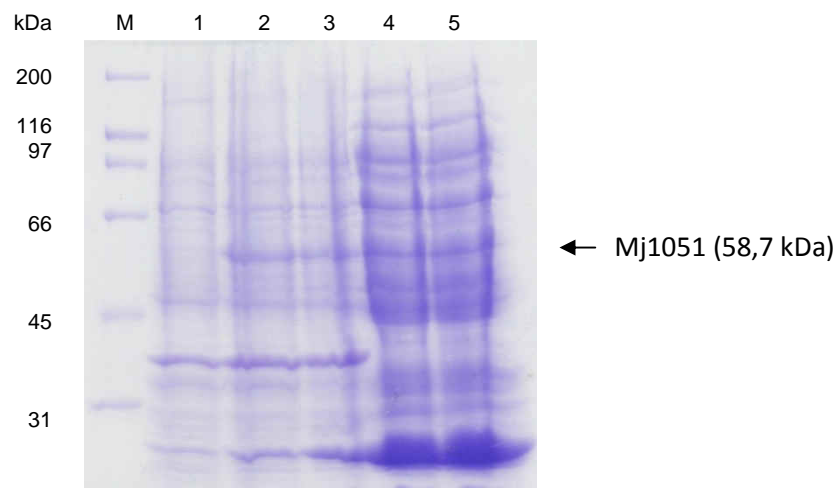
Abbildung 60: Aminosäuresequenzvergleich von Mj1051, Mj1058 und TobZ

Die Nummer am Ende jeder Zeile gibt die bis dahin verglichenen Aminosäuren für das jeweilige Enzym an. Die teilweise konservierte HD-Sequenz ist rot markiert während das KxR-Motiv grün markiert ist. UniProt-Entry Mj1051: Q58451; Mj1058: Q58458; TobZ: Q701Y1

## 4.1 Herstellung von Mj1051

### 4.1.1 Klonierung und Expression von Mj1051

Als Grundlage für die Klonierung diente das gesamte Genom von *M. jannaschii*, welche von der *Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen* bezogen wurde. Das Gen für Mj1051 wurde mit den in Abschnitt 2.1.7 (S. 31) aufgelisteten Primern amplifiziert, um nachfolgend die Klonierung in pET15bTEV-Vektor durchführen zu können. Das Plasmid enthält einen *N*-terminalen *His-tag*, wodurch zur Reinigung mittels einer entsprechenden immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie durchgeführt werden kann. Zum anderen ist es durch eine TEV-Schnittstellen-Sequenz, die zwischen *His-tag* und Proteinsequenz geschaltet ist und von der TEV-Protease erkannt wird, möglich, den *N*-terminalen *His-tag* abzuspalten und *tag*-freies Protein zu erhalten. Die Sequenzierung ergab keine Unterschiede zur veröffentlichten Sequenz, wodurch nachfolgend eine Testexpression durchgeführt werden konnten. Dazu wurde der Expressionsstamm *E. coli Rosetta (DE3)* genutzt, da dieser ein Plasmid enthält, der die Gene für seltene tRNAs trägt, die für eine effiziente Translation des Mj1051-Gens vorteilhaft sind. In Abbildung 61 (S. 98) ist der Verlauf der Expression von Mj1051 erkennbar.



**Abbildung 61: Testexpression von Mj1051**

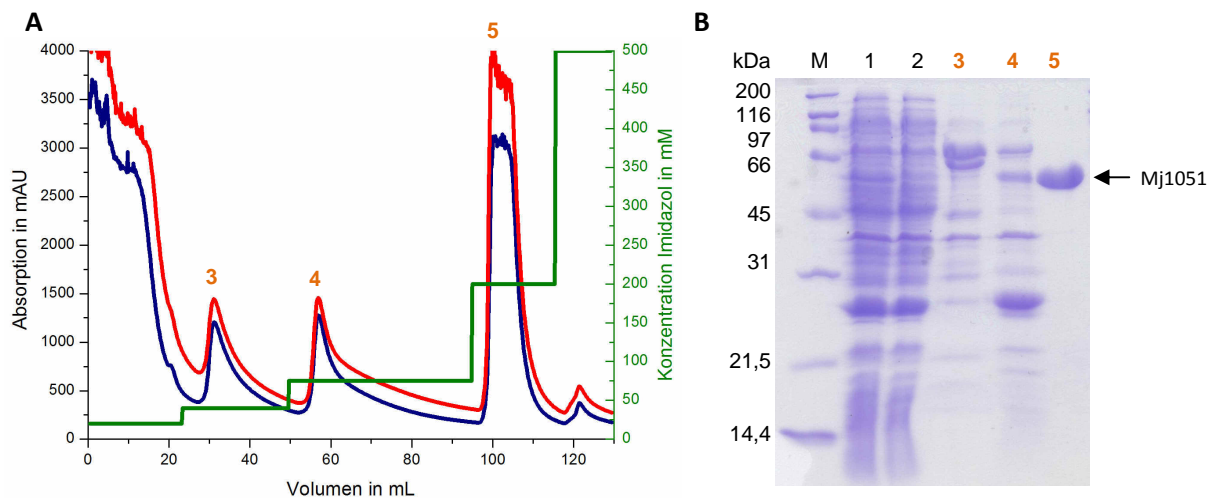
Für die Analyse der Proben mittels SDS-PAGE wurde ein 15 %-iges SDS-Gel genutzt.  
 1... Marker, 2... Vor Induktion, 3... 1 h nach Induktion, 4... 3 h nach Induktion,  
 5... Überstand 4 h nach Induktion, 6... Überstand 6 h nach Induktion

Im Unterschied zur Probe vor der Induktion ist nach einer Stunde eine Bande auf der Höhe der vermuteten Molekülmasse von Mj1051 (58,7 kDa) zu sehen (Abbildung 61, S. 98, Spur 2). Zusätzlich ist diese Bande im Überstand nach dem Zellaufschluss vorhanden,

wodurch von einer löslichen Expression des Proteins in *E. coli* ausgegangen werden kann (Abbildung 61, S. 98, Spur 4).

#### 4.1.2 Reinigung von Mj1051

Die Reinigung von Mj1051 erfolgte mittels immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) (Abbildung 62, S. 99).



**Abbildung 62: Reinigung von Mj1051 mittels erster IMAC**

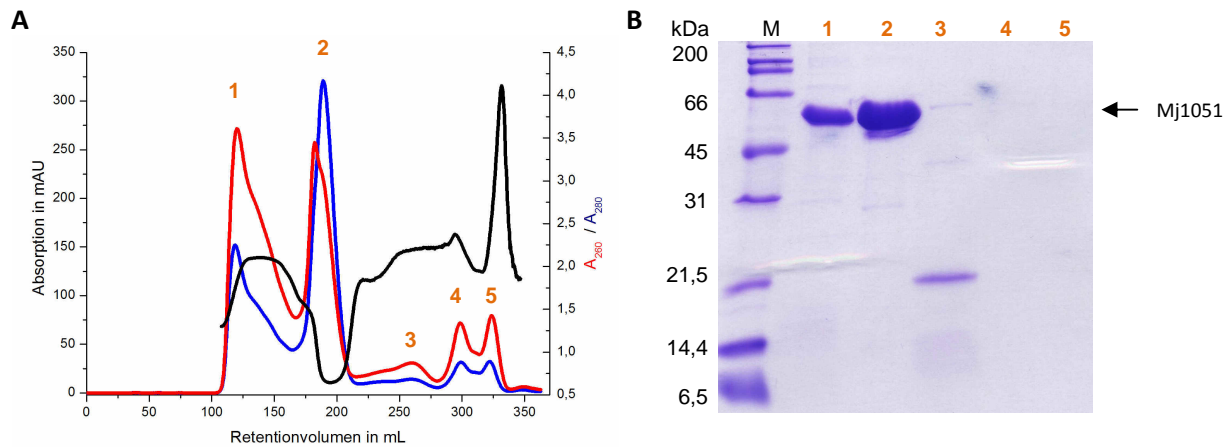
Dargestellt ist ein Profil der Reinigung (A) von Mj1051 mittels IMAC. Dabei ist die Absorption bei 260 nm in rot und bei 280 nm in blau dargestellt. Der Anteil an Imidazol ist in grün eingezeichnet. Entsprechende Proben (orange markiert) wurde mittels SDS-PAGE, unter Zuhilfenahme eines 15 %-igen SDS-Gels (B), analysiert.

M... Marker, 1... Zellysat, 2... Durchfluss, 3... 40 mM Imidazol, 4... 75 mM Imidazol, 5... 200 mM Imidazol

Auffällig ist, dass die Absorption bei 260 nm über den kompletten Reinigungsverlauf höher ist als die Absorption bei 280 nm. Die Analyse mittels SDS-PAGE ergab für die Elutionsprobe (Probe 5, Abbildung 62, S. 99) nur eine Bande, die dem Mj1051 zuzuordnen war.

Anschließend wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt (Abbildung 63, S. 100). Das Retentionsvolumen des ersten Peaks deutet auf aggregiertes Protein hin, jedoch ist ein Absorptionsverhältnis ( $A_{260}/A_{280}$ ) von zwei ersichtlich, was auf Nukleinsäuren hindeuten würde. Da mittels SDS-PAGE eine nahezu reine und starke Bande von Mj1051 zu sehen ist, könnte dies zum einem aggregiertes Protein darstellen, jedoch könnte auch ein Komplex mit höheren Nukleinsäuren zugrunde liegen (Spur 1, Abbildung 63 B, S. 100). Das Absorptionsverhältnis von 260 und 280 nm kehrt sich im zweiten Peak um. Zusätzlich ergab die Analyse mittels SDS-PAGE ebenfalls eine starke Bande, die Mj1051 entspricht (Spur 2, Abbildung 63 B, S. 100).



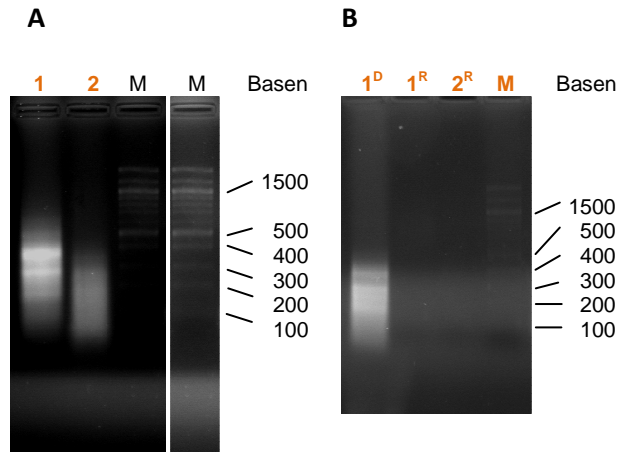


**Abbildung 63: Reinigung von Mj1051 mittels SEC**

Dargestellt ist ein Profil der Reinigung (A) von Mj1051 unter Verwendung einer S200 26/60 Säule. Dabei ist die Absorption bei 260 nm in rot und bei 280 nm in blau dargestellt. Das Absorptionsverhältnis der beiden ist in schwarz eingezeichnet. Entsprechende Proben (orange markiert) wurden mittels SDS-PAGE, unter Zuhilfenahme eines 15 %-igen SDS-Gels (B), analysiert. M... Marker

Eine mögliche Erklärung für den beschriebenen Reinigungsverlauf könnten Nukleinsäuren darstellen, die zusammen mit dem Protein während der IMAC Co-eluierten und anschließend mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) abgetrennt werden (Auxilien *et al.*, 2007; Goto-Ito *et al.*, 2008). Um Sicherzustellen, ob es sich um Nukleinsäuren handelt, wurde eine denaturierende Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt, die es erlaubt, auch RNA aufzutrennen (Abbildung 64, S. 101). Dazu wurden Proben von Peak 1 und 2 um das zehnfache verdünnt, um die Salzkonzentration zu senken und anschließend mittels PCR-Reinigungskit aufkonzentriert. Die Analyse ergab das Auftreten von drei distinkten Banden entsprechend Peak 1 und ein „Schmier“ für Peak 2. Das bedeutet, dass das Mj1051 zwar größtenteils von Proteinverunreinigungen befreit werden konnte, jedoch weiterhin Nukleinsäuren vorhanden sind (Vgl. Abbildung 63 A, 100 und Abbildung 64 A, S. 101). Um festzustellen, ob es sich bei den gereinigten Nukleinsäuren um DNA oder RNA handelt, wurde ein DNase bzw. RNase Verdau der Proben durchgeführt (Abbildung 64 B, S. 101). Dabei konnte nur für den DNase-Verdau Banden beobachtet werden, während für den RNase-Verdau keine Banden mehr zu sehen sind, was darauf hindeutet, dass die Co-gereinigten Nukleinsäuren RNA ist.

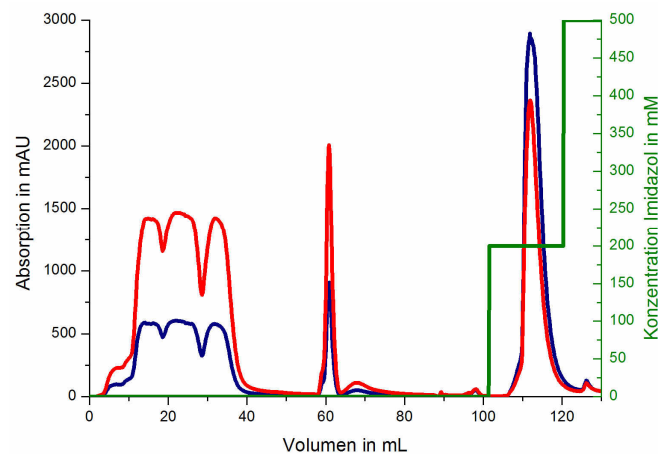
Da das Protein Mj1051 heterolog in *E. coli* exprimiert wurde, sollte die Wechselwirkung des Proteins mit der RNA unspezifisch sein. Um dies zu untersuchen, wurde der Reinigungsverlauf geändert. Entgegen der durchgeführten SEC wurde die Reinigungsstrategie verändert und fortan nach der ersten IMAC (Abbildung 62, S. 99) eine zweite IMAC angeschlossen. Dafür wurde die Probe um das Zehnfache mit Puffer A (Abschnitt 2.3.5, S. 40) verdünnt, um die Interaktion von Mj1051 mit der RNA zu schwächen und um den Imidazol-Anteil auf 20 mM zu senken. Anschließend erfolgte die Reinigung



**Abbildung 64: Analyse der Co-gereinigten Nucleinsäuren und DNase bzw. RNase-Verdau**

A) Gelbild nach denaturierender Agarose-Gelelektrophorese der Proben von Peak 1 und 2 aus Abbildung 63 (S. 100). Die Marker-Spur ist zweimal dargestellt, da das Kontrastverhältnis angepasst wurde, um die Proben und den Marker bestmöglichst darzustellen. B) DNase und RNase-Verdau, wobei 1<sup>D</sup> für den DNase-Verdau von Peak 1 und 1<sup>R</sup> für den RNase-Verdau von Peak 1 und 2<sup>R</sup> für den RNase-Verdau von Peak 2 steht. M... 100 Basenpaar-Marker

mittels zweiter IMAC (Abbildung 65, S. 101). Im Durchfluss steigt die Absorption stark an, wobei ein Verhältnis von 260 nm zu 280 nm von etwa 2 detektiert wurde, was der RNA entsprechen würde. Um die vermutlich elektrostatische Interaktion weiter zu schwächen, wurde anschließend mit 1 M NaCl gewaschen, wobei unter Umständen weitere Nucleinsäuren eluiert werden konnten. Anschließend wurde das Protein durch einen Imidazol-Anteil von 200 mM eluiert.



**Abbildung 65: Reinigung von Mj1051 mittels zweiter IMAC**

Dargestellt ist ein Profil der Reinigung von Mj1051 mittels zweiter IMAC. Dabei ist die Absorption bei 260 nm in rot und bei 280 nm in blau dargestellt. Der Anteil an Imidazol ist in grün eingezeichnet.

Der Erfolg der Nucleinsäureabtrennung wurde durch die Aufnahme eines UV-Spektrums nachgewiesen (Abbildung 66, S. 102). Es ist ersichtlich, dass das Verhältnis der Absorptionen nach der ersten IMAC bei 1,45 liegt, was den hohen Anteil an Nucleinsäuren widerspiegelt. Nach der zweiten IMAC beträgt das Verhältnis 0,56 und auch die typische Tryptophanschulter der Proteinabsorption ist im Spektrum erkennbar.

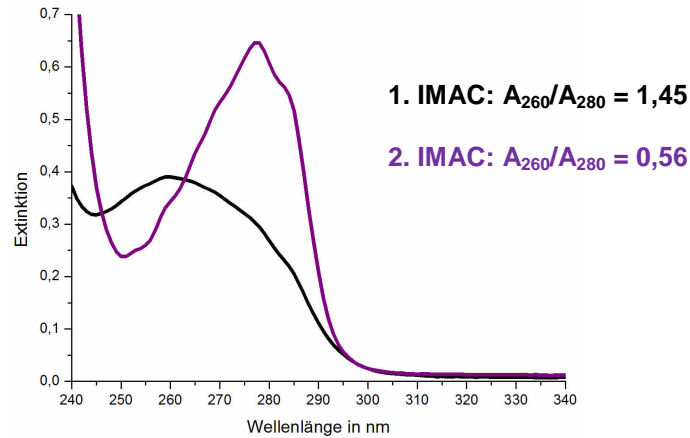


Abbildung 66: UV-Spektren von Mj1051 nach erster und zweiter IMAC

Das UV-Spektrum von Mj1051 nach der ersten IMAC ist in schwarz eingezeichnet, während das Spektrum nach zweiter IMAC in violett gezeigt ist. Zusätzlich ist das Absorptionsverhältnis von  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  in den entsprechenden Farben dargestellt.

Es konnte eine maximale Ausbeute von ca. 1,34 mg Mj1051 aus 1 g Zellen erzielt werden. Dies entspricht einer Ausbeute von 3,9 mg Mj1051 je Liter Expressionsmedium.

Da TobZ in Lösung als Dimer vorliegt, wurde für Mj1051 ebenfalls der Oligomierzustand mittels analytischen Ultrazentrifugation (aUZ) untersucht (Abbildung 67, S. 102). Aus der Aminosäuresequenz konnte die molare Masse für Mj1051 von 58,7 kDa berechnet werden. Es konnte eine molare Masse von 128 kDa mittels aUZ festgestellt werden, was auf ein mögliches Dimer mit theoretisch 117,4 kDa hindeutet.

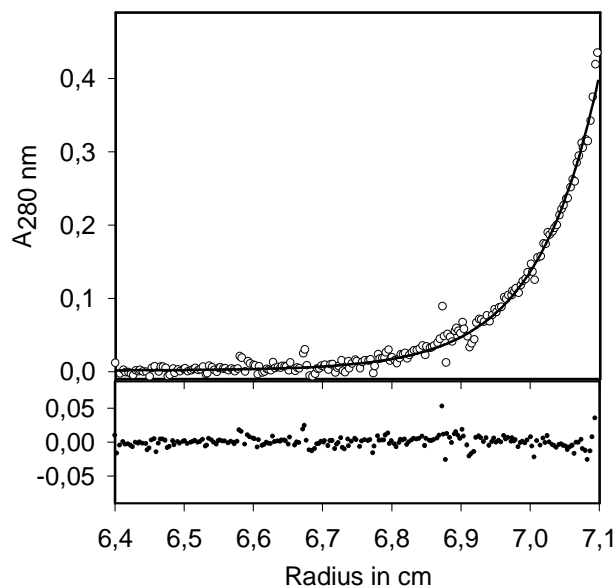


Abbildung 67: Analytische Ultrazentrifugation von Mj1051

Die erhaltene mittlere, apparente molare Masse beträgt 128 kDa.

#### 4.2 Mj1051 zeigt eine CP-abhängige ATP-Pyrophosphatase-Aktivität

Im folgenden Abschnitt wird die biochemische und biophysikalische Charakterisierung von Mj1051 näher erläutert. Da Mj1051 aus einem thermophilen Organismus stammt, könnte die optimale Enzymaktivität möglicherweise erst bei sehr hohen Temperaturen erreicht werden, was in Hinblick auf den temperaturabhängigen Zerfall des Substrates CP ebenfalls ein Problem darstellen kann (Vgl. Abschnitt 1.1, S. 1). Nichtsdestotrotz wurde versucht, die Enzymaktivität über einen möglichen Umsatz von ATP zu AMP mittels *rp*-HPLC zu untersuchen. Dabei wurde eine Reaktionstemperatur von 60 °C gewählt, die einen Kompromiss zwischen optimaler Enzymaktivität und temperaturabhängigen Zerfall von CP darstellt. Bei 60 °C beträgt die Halbwertszeit des thermischen Zerfalls des CP ca. 105 Sekunden (Legrain *et al.*, 1995). Um diesen zu kompensieren, wurde eine dreifach höhere CP-Konzentration (30 mM) im Vergleich zu TobZ eingesetzt. Zudem wurde eine sehr hohe Enzymkonzentration (50 µM) verwendet, um auch einen schwachen Umsatz detektieren zu können. Da für TobZ bekannt war, dass der Einsatz einer Pyrophosphatase (PP<sub>i</sub>-ase) die Produktbildung begünstigt, wurde dem Reaktionsansatz eine kommerzielle thermostabile PP<sub>i</sub>-ase zugesetzt (Vgl. Abbildung 54, S. 90).

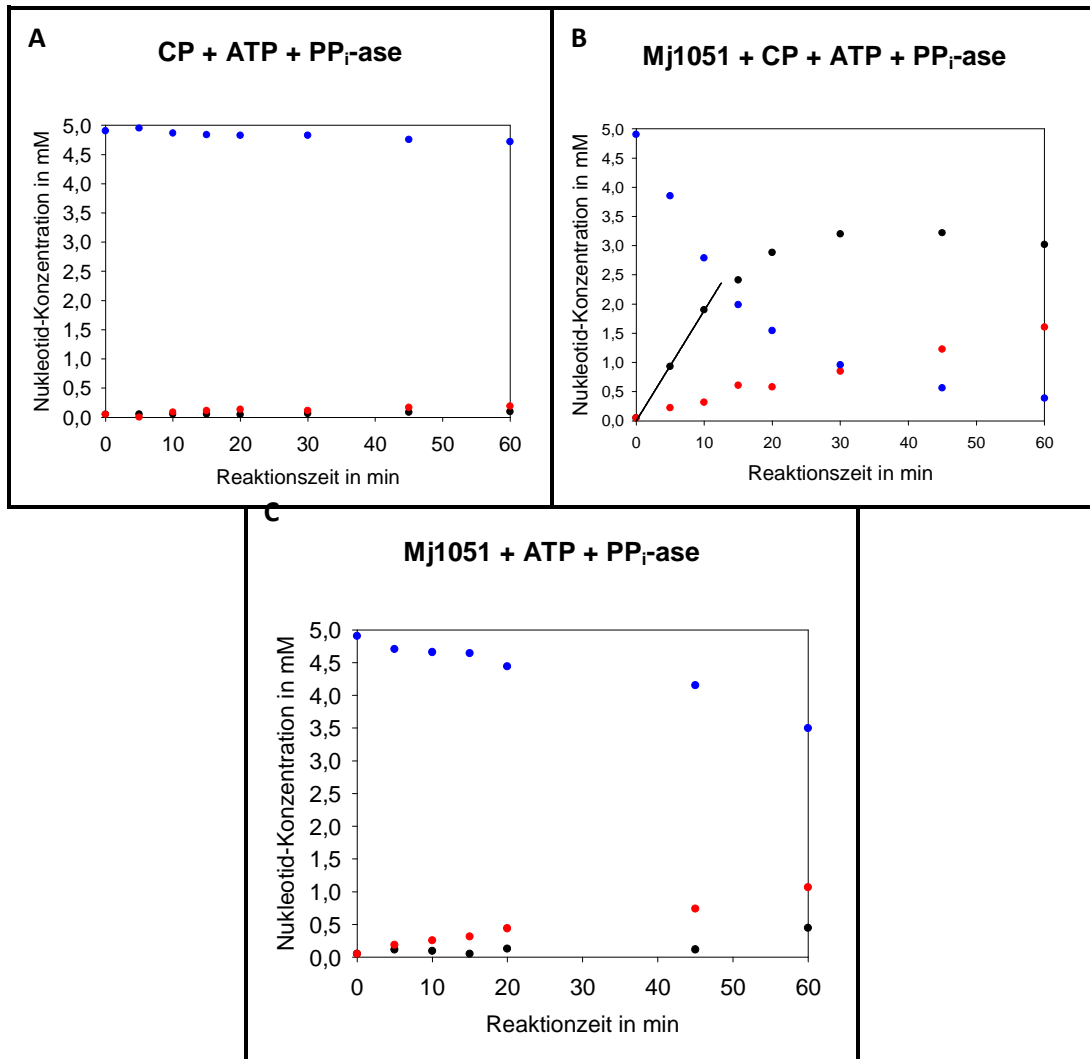


Abbildung 68: Graphische Übersicht der Aktivität von Mj1051 anhand der Verteilung von AMP, ADP und ATP

Dargestellt sind drei Diagramme über die Abhängigkeit des ATP-Umsatzes ohne das Enzym Mj1051 (A), in Anwesenheit von Mj1051 (B) und in Abwesenheit des Substrates CP (C). Die Daten für ATP sind als blaue Kreise, von ADP als rote und AMP als schwarze Kreise gezeigt. Die AMP-Daten werden teilweise von ADP-Daten überlagert und sind daher nur schwer ersichtllich (A). Der ermittelte Anfangsanstieg der Reaktion (B) ist als schwarze Linie im Diagramm eingezeichnet

In der Referenzreaktion ohne Zusatz des Proteins ist keine signifikante Entstehung von AMP oder ADP erkennbar (Abbildung 68 A, S. 104). In Anwesenheit des Enzyms kann eine Abnahme der ATP-Konzentration bei gleichzeitiger Zunahme der AMP-Konzentration detektiert werden (Abbildung 68 B, S. 104). Das Enzym ist daher in der Lage AMP zu bilden und ist damit katalytisch aktiv. Aus dem ermittelten Anfangsanstieg kann eine katalytische Aktivität von  $k_{cat} = 3,8 \text{ min}^{-1}$  berechnet werden. Damit benötigt Mj1051 15,8 Sekunden für einen Umsatz. Obwohl ein 6-facher Überschuss an CP gegenüber ATP eingesetzt wurde, konnte kein vollständiger Umsatz von ATP zu AMP erreicht werden. Jedoch nimmt die Konzentration auch von ADP stetig zu, was auf eine Enzym-katalysierte Hydrolyse von ATP hindeutet. Dahingehend wurde ein Ansatz ohne das Substrat CP analysiert, bei dem ebenfalls ein signifikanter Anstieg der ADP-Konzentration gemessen werden konnte (Abbildung 68 C, S. 104). Da das Enzym in der Lage ist auch in Abwesenheit des Substrates

CP das Substrat ATP zu hydrolysieren, besitzt das Protein im Unterschied zu TobZ möglicherweise eine ATPase-Aktivität (Vgl. Abbildung 25 A, S. 63).

#### 4.3 Kristallisation und Strukturbestimmung von Mj1051

Die Kristallisation wurde im 96-*well* Ansatz angesetzt. Nach 3 Tagen konnten bereits erste Kristalle in zwei unterschiedlichen Pufferbedingungen gefunden werden (Abbildung 69 A, S. 105).

- I 0,1 M MES **pH 6,5**; 0,05 M CsCl; 30 % (v/v) Jeffamine („Jeffamine“-Puffer)
- II 0,1 M HEPES **pH 7,5**; 0,1 M Citrate, 40 % (v/v) MPD („MPD“-Puffer)

Die initialen Kristalle wiesen eine ausreichende Größe auf, um sie direkt *in house* zu vermessen. Die Kristalle streuten bis zu einer Auflösung von ca. 3 Å, konnten jedoch nicht indiziert werden. Nach einem *fine-sceening* im 24-*well* Format konnte eine Vergrößerung der Kristalle durch den Einsatz von 12,6 mg/mL Mj1051 bei einem Protein-Puffer-Verhältnis von 2:1 bei gleicher Pufferbedingung erreicht werden (Abbildung 69 B und C, S. 105). Die Kristalle konnten direkt im *cryo-stream* gefroren werden und lieferten Streudaten bis zu einer Auflösung von 1,75 Å. Die Kristalle, die im „Jeffamine“-Puffer gewachsen waren, konnten der Raumgruppe C2 zugeordnet werden während für die Kristalle im „MPD“-Puffer die Raumgruppe P22<sub>1</sub>2<sub>1</sub> ermittelt wurde (Statistiken, siehe Tabelle 5, S. 106).

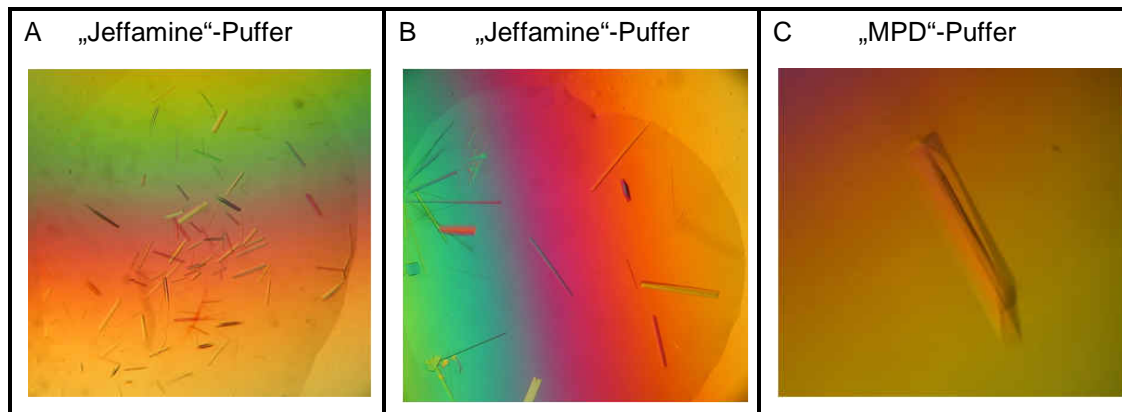


Abbildung 69: Proteinkristalle von Mj1051

A) Kristall im 96-*well* Ansatz; B) C) Kristall im 24-*well* Ansatz

Datensatz	Mj1051- apo I	Mj1051- apo II
Puffer	„Jeffamine“-Puffer	„MPD“-Puffer
Röntgenquelle	Kupferanode	Kupferanode
Wellenlänge in Å	1,5418	1,5418
Auflösung in Å	30 – 1,96	30 – 2,0
Raumgruppe	C2	P2 <sub>2</sub> ,2 <sub>1</sub>
Einheitszelle a; b; c in Å $\alpha$ ; $\beta$ ; $\gamma$ in °	116,7; 79,6; 56,9 90; 97,9; 90	46,4; 96,1; 172,0 90; 90; 90
Moleküle pro AE	1	1
R <sub>meas</sub> in %	8,3 (39,4)	4,4 (28,3)
I / $\sigma$ I	15,7 (4,0)	28,2 (3,6)
Vollständigkeit in %	97,7 (89,6)	98,8 (92,3)
gemessene Reflexe	265277 (35739)	275142 (12199)
einmalige Reflexe	71147 (10674)	52458 (6574)
Multiplizität	3,7 (3,4)	5,2 (1,9)

**Tabelle 5: Statistiken der Mj1051-apo Datensätze**

In Klammern sind die Werte der äußersten Auslösungsschale angegeben. Die Abkürzung AE steht für asymmetrische Einheit. Die Moleküle pro AE wurde mittels des Matthews-Koeffizienten erstellt (Kantardjieff und Rupp, 2003; Matthews, 1968).

Da die Struktur mit Suchmodellen von weder TobZ noch HypF gelöst werden konnte, wurde Mj1051 als Selenomethioninderivat exprimiert (SeMj1051) um dennoch die Phasen der Kristalle durch die Positionsbestimmung der Selen-Atome lösen zu können. Das SeMet-Enzyms wurde unter den gleichen Bedingungen wie das native Protein gereinigt und kristallisiert.

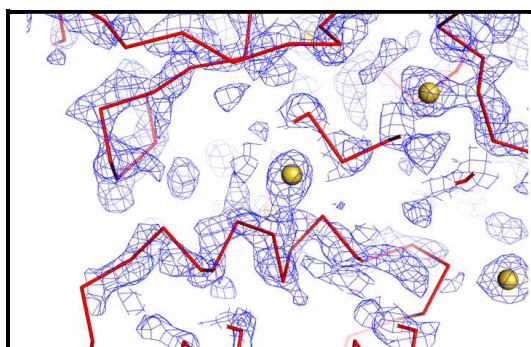
Anschließend kann das Phasenproblem mit der Methode des MAD (*multi-wavelength anomalous dispersion*) gelöst werden (Hendrickson *et al.*, 1988). Die Position der Selenatome wurden mit der ShelX *Suite* aus den gemessenen Datensätzen berechnet, wodurch eine initiale Elektronendichte mit einer Auflösung von 3,0 Å generiert werden konnte (Abbildung 70, S. 107) (Sheldrick, 2010). Anschließend wurde das Modell mittels des Programms ARP/wARP der CCP4 *Suite* automatisch vervollständigt (Langer *et al.*, 2008; The CCP4 Suite, 1994).

Datensatz	SeMj1051 - <i>inflection</i>	SeMj1051 - <i>peak</i>	SeMj1051 - <i>native</i>
Puffer	„Jeffamine“-Puffer	„Jeffamine“-Puffer	„Jeffamine“-Puffer
Röntgenquelle	Synchrotron BESSY II	Synchrotron BESSY II	Synchrotron BESSY II
Wellenlänge in Å	0,98004	0,97989	0,91841
Auflösung in Å	8 – 2,7	8 – 2,7	6 – 2,0
Raumgruppe	C2	C2	C2
Einheitszelle a; b; c in Å $\alpha$ ; $\beta$ ; $\gamma$ in °	116,4; 79,0; 56,4 90; 98,1; 90	116,4; 79,0; 56,4 90; 98,1; 90	116,3; 79,0; 56,5 90; 98,1; 90
Moleküle pro AE	1	1	1
R <sub>meas</sub> in %	3,9 (10,8)	3,9 (9,4)	10,1 (46,7)
I / $\sigma$ I	24,0 (9,7)	23,8 (10,6)	10,0 (2,7)
Vollständigkeit in %	94,9 (80,6)	95,2 (81,7)	98,9 (98,1)
gemessene Reflexe	56795 (7315)	56655 (7335)	95024 (15098)
einmalige Reflexe	25997 (3543)	26076 (3591)	34462 (5497)
Multiplizität	2,2 (2,1)	2,2 (2,1)	2,8 (2,7)
<b>refinement</b> R <sub>work</sub> / R <sub>free</sub>	-	-	<b>0,19 / 0,24</b>

**Tabelle 6: Statistiken der SeMj1051 Datensätze**

In Klammern sind die Werte der äußersten Auslösungsschale angegeben. Die Abkürzung AE steht für asymmetrische Einheit. Die Moleküle pro AE wurde mittels des Matthews-Koeffizienten erstellt (Kantardjiev und Rupp, 2003; Matthews, 1968).

Das erhaltene Modell (auf Grundlage der initialen Elektronendichte erstellt, siehe 4.3, S. 105) wurde weiterführend für den hochaufgelösten (nativen) Datensatz mit einer Auflösung von 2,0 Å genutzt (Statistiken, Anhang 9, S. 171).



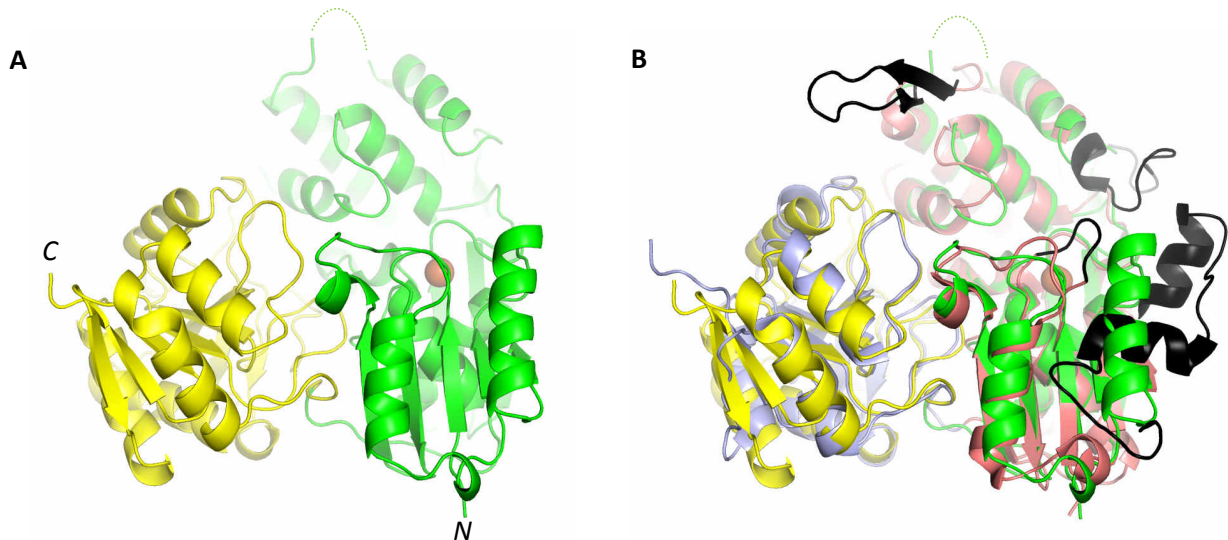
**Abbildung 70: Initiale Elektronendichtekarte von SeMj1051 bei einer Auflösung von 3,0 Å**

Die Elektronendichte ist als blaues Netz mit einer Konturierung von 1,5  $\sigma$  dargestellt. Zur Orientierung ist das Peptidrückgrat als rote Linie eingezeichnet. Die Selen-Atome sind als gelbe Kugeln gezeigt.



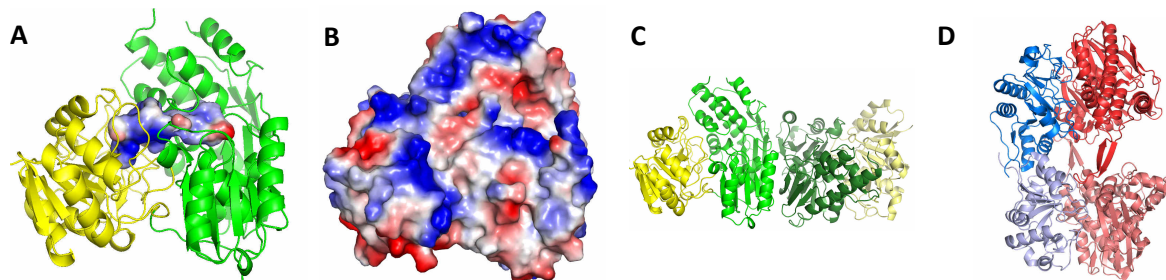
## 4.4 Struktur von Mj1051 und Vergleich mit TobZ

Das Protein Mj1051 besteht aus zwei Domänen, die entsprechend des Sequenz-Vergleiches mit TobZ aus einer *N*-terminalen Kae1-ähnlichen Domäne, welche die Aminosäuren M<sup>1</sup> bis N<sup>303</sup> besteht und C-terminalen YrdC-ähnlichen Domäne, die die Aminosäuren T<sup>304</sup> bis K<sup>513</sup> umfasst (Abbildung 71, S. 108). Der *β*-finger von TobZ ist in der Struktur von Mj1051 nicht vorhanden, wobei für die Aminosäuren S<sup>211</sup> bis Q<sup>215</sup> keine Elektronendichte beobachtet werden konnte. Starke strukturelle Unterschiede zu TobZ sind nur in der Kae1-ähnlichen Domäne zu finden, während die Faltung der YrdC-ähnlichen nahezu identisch ist. Die Unterschiede betreffen hauptsächlich die Bereiche der Akzeptor-Bindung in der Nähe des aktiven Zentrums der Kae1-ähnlichen Domäne (Abbildung 71 B, S. 108). Die Öffnung zum aktiven Zentrum der *N*-terminalen Domäne von Mj1051 ist zugänglicher im Vergleich zu TobZ.



**Abbildung 71: Struktur von SeMj1051 und Vergleich mit TobZ**

A) Cartoondarstellung des Enzyms Mj1051. Die C-terminale YrdC-ähnliche Domäne ist in gelb und die *N*-terminale Kae1-ähnliche Domäne ist in grün dargestellt. Die *N*- und C-Termini sind im Bild markiert. Der mögliche Verlauf der Aminosäuren S<sup>211</sup> bis Q<sup>215</sup> ist als grüne gestrichelte Linie gezeigt. Das gebundene Eisenatom ist als braune Kugel dargestellt. B) *alignment* der Strukturen von SeMj1051 und TobZ. Die strukturellen Unterschiede von TobZ (hellrot und hellblau) (PDB: 3VEN (Parthier *et al.* 2012)) zu Mj1051 sind in schwarz eingefärbt.



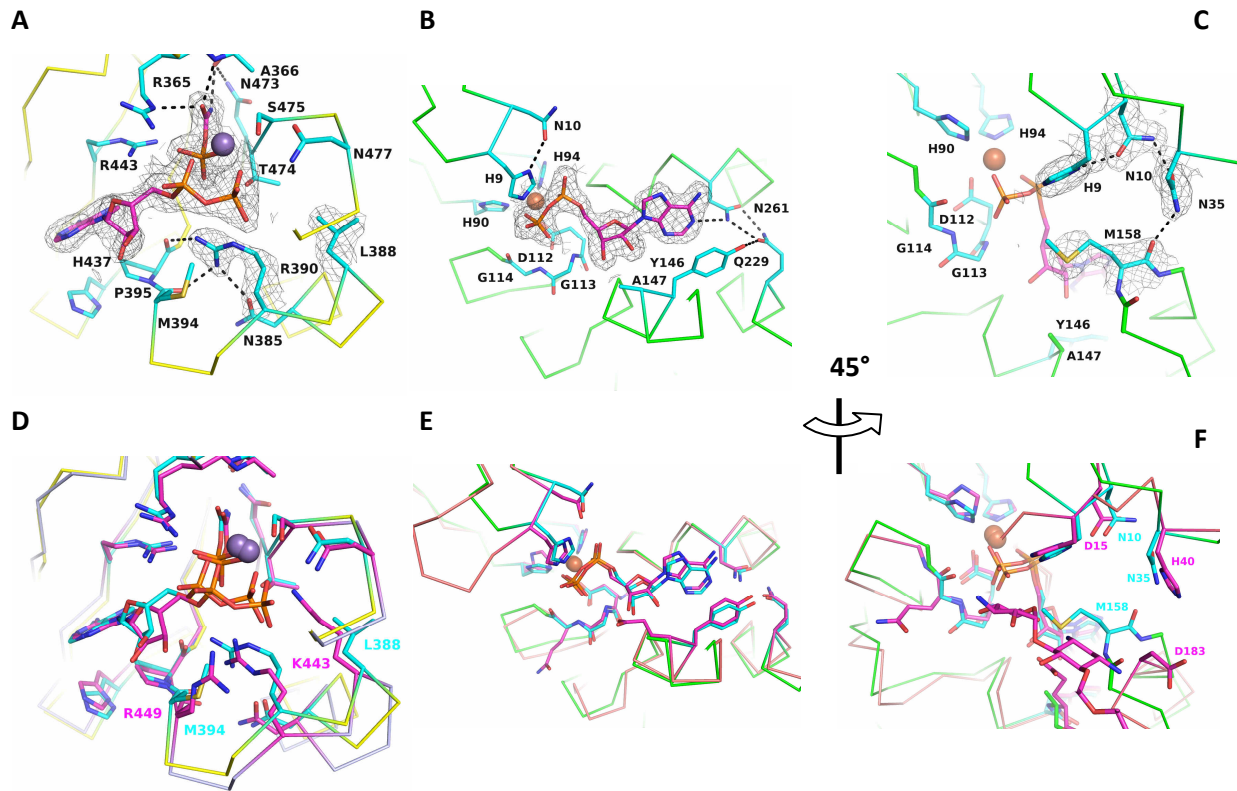
**Abbildung 72: Oberfläche und Dimerisierung von Mj1051 und Vergleich mit TobZ**

A) Cartoondarstellung des Enzyms Mj1051 mit der elektrostatischen Ladungsverteilung der inneren Oberfläche. Die C-terminale YrdC-ähnliche Domäne ist in gelb und die *N*-terminale Kae1-ähnliche Domäne ist in grün dargestellt. B) Elektrostatische Ladungsverteilung der äußeren Oberfläche. C) Mögliche Dimerisierung von Mj1051 auf Grundlage der Kristallstruktur von SeMj1051. D) Mögliche Dimerisierung von TobZ. Die C-terminale YrdC-ähnliche Domäne ist in blau und die *N*-terminale Kae1-ähnliche Domäne ist in rot dargestellt. (PDB: 3VEN (Parthier *et al.*, 2012))

Die Berechnung der elektrostatischen Oberfläche von Mj1051 ergab einen Gradienten auf der inneren Oberfläche des Proteins. Dabei wechselt das Potential vom Basischen in der YrdC-ähnlichen Domäne zu einem schwach sauren Milieu in der Kae1-ähnlichen Domäne (Abbildung 72 A, S. 108). Dies konnte ebenfalls für die O-Carbamoyltransferase TobZ beobachtet werden (Vgl. Abbildung 9, S. 9). Die äußere Oberfläche von Mj1051 weist großflächige basische Bereiche auf, welche ein eher ungeladenes bis schwach saures „Tal“ flankieren. Letztes mündet in einer großen Öffnung zum möglichen aktiven Zentrum der N-terminalen Domäne (Abbildung 72 B, S. 108).

Möglicherweise trägt die basische Oberfläche von Mj1051 zur Co-Reinigung von RNA Molekülen bei. Verstärkt wird diese Eigenschaft vermutlich durch den dimeren Zustand des Enzyms, der mittels analytischer Ultrazentrifugation festgestellt wurde. Die Analyse der Kristallstruktur von Mj1051 ergab ein potentiell symmetrieverwandtes Molekül, welches sich in beiden Raumgruppen (C2 und P22<sub>1</sub>2<sub>1</sub>) an der gleichen Position befindet (nicht gezeigt). Dabei kann eine *side-to-side* Interaktion vermutet werden, bei der die Wechselwirkung ausschließlich durch die Kae1-ähnliche Domäne bewirkt wird (Abbildung 72 C, S. 108). Im Unterschied dazu besteht die Dimerisierung von TobZ möglicherweise aus einer *head-to-head* Interaktion, die durch die Wechselwirkung des  $\beta$ -finger mit der Kae1-ähnlichen Domäne und der benachbarten YrdC-ähnlichen Domänen bewerkstelligt wird (Abbildung 72 D, S. 108).

Zur weiteren Charakterisierung wurde versucht, die Bindung der Liganden an Mj1051 zu untersuchen. Basierend auf der CP-ADP-Tobramycin-gebundenen Struktur von TobZ, wurden *soaking*-Experimente in Gegenwart von CP, ADP und Mn<sup>2+</sup>-Ionen durchgeführt (PDB: 3VET; (Parthier *et al.*, 2012)). Für das *soaking* wurde der „MPD“-Puffer gewählt, da die Statistiken der erhaltenen Datensätze der Kristalle geringfügig besser waren als im „Jeffamine“-Puffer (Vgl. Tabelle 5, S. 106). Es konnte ein Datensatz mit einer Auflösung von 1,75 Å aufgenommen werden (Statistiken, Anhang 9, S. 171).



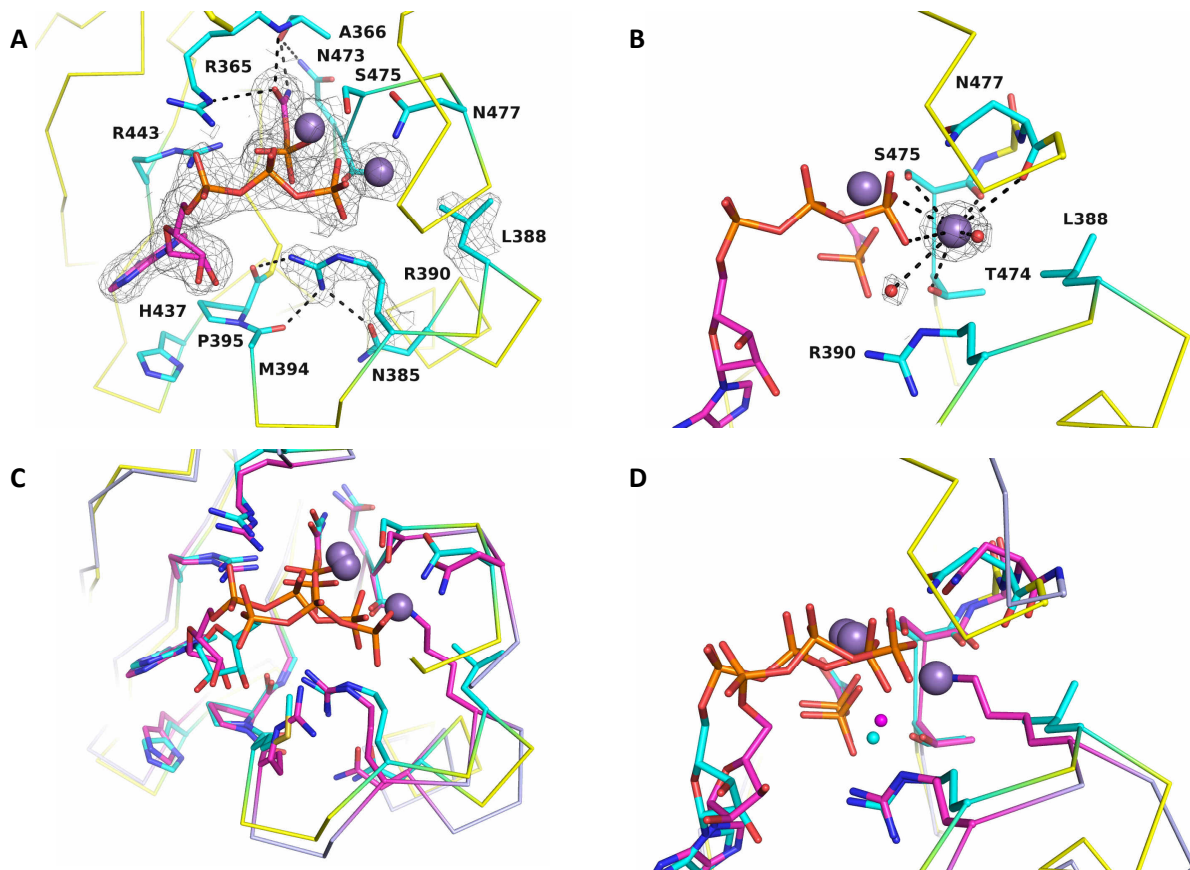
**Abbildung 73: Bindung der Liganden in SeMj1051 und Vergleich mit TobZ**

Ribbondarstellung des Enzyms SeMj1051. Die C-terminale YrdC-ähnliche Domäne ist in gelb (A) und die N-terminale Kae1-ähnliche Domäne ist in grün (B, C) dargestellt. Die abgebildeten Reste sind in *stick*-Darstellung gezeigt. Nicht-C-Atome sind mit den üblichen Farben versehen, wobei die C-Atome der Liganden violett und die C-Atome der Aminosäuren türkis eingefärbt sind. Die *omit-map* der  $F_o - F_c$ -Dichte (Auflösung 1,75 Å, konturiert mit  $3\sigma$ ) ist in grau dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen (Abstand: 2,2 - 3,5 Å) sind in schwarz gefärbt. Das Manganion ist als lila Kugel, während das Eisenatom als braune Kugel gezeigt ist. D, E, F) Vergleich der Domänen von Mj1051 und TobZ. Die C-terminale YrdC-ähnliche Domäne von TobZ ist in blau (D) und die N-terminale Kae1-ähnliche Domäne ist in rot (E, F) dargestellt. Dabei sind die Nicht-C-Atome mit den üblichen Farben versehen, wobei die C-Atome der Mj1051-Struktur türkis und die C-Atome der TobZ-Struktur violett eingefärbt sind. Umgekehrt gilt dies für die entsprechenden Liganden (PDB: 3VET (Parthier *et al.*, 2012)),

Die erhaltene Elektronendichte in der C-terminalen Domäne spiegelt die Bindung von CP und ADP wider und ist nahezu identisch mit der Bindung an TobZ (Abbildung 73 A und D, S. 110). Die beteiligten Aminosäuren sind fast vollständig konserviert, jedoch ist der Lysin-Rest von TobZ (TobZ K<sup>443</sup>) gegen ein Leucin (L<sup>388</sup>) und ein Arginin (TobZ R<sup>449</sup>) gegen ein Methionin (M<sup>394</sup>) in Mj1051 ausgetauscht. Für die Bindung von ADP in der Kae1-ähnlichen Domäne von Mj1051 ist ebenso Elektronendichte vorhanden und dabei sind ebenfalls konservierte Reste beteiligt. Ferner wird die Adeninbase über einem Asparaginrest (N<sup>261</sup>) gebunden, der an einem Wasserstoffbrückennetzwerk mit Q<sup>229</sup> und Y<sup>146</sup> beteiligt ist (Abbildung 73 B und E, S. 110). H<sup>9</sup>, N<sup>10</sup> und N<sup>35</sup> bilden möglicherweise eine erweiterte katalytische Diade aus, welche sich der katalytischen Diade aus H<sup>14</sup> und D<sup>15</sup> von TobZ teilweise ähnelt, wobei sich H<sup>40</sup> von TobZ nicht im *H*-Brückenabstand zu D<sup>15</sup> befindet (Abbildung 73 C und F, S. 110). Eine Gemeinsamkeit besteht in Bezug auf das konservierte HxxxH-Motiv in der Kae1-ähnlichen Domäne, weshalb Mj1051 ebenfalls ein gebundenes

Metallion besitzt, das aufgrund der Elektronendichte als Eisenatom interpretiert wurde (Abbildung 73 B, S. 110).

Da beim Einsatz von CP, ATP und  $Mn^{2+}$  im Kristall von TobZ das Carbamoyl-AMP-Intermediat beobachtet werden konnte, wurden daher ebenfalls die gleichen Substrate für das *soaking*-Experiment im „Jeffamine“-Puffer eingesetzt, da der pH-Wert dem Tartrat-Puffer entspricht. Dabei konnte ein Datensatz mit einer Auflösung von 1,8 Å aufgenommen werden (Statistiken, Anhang 9, S. 171)



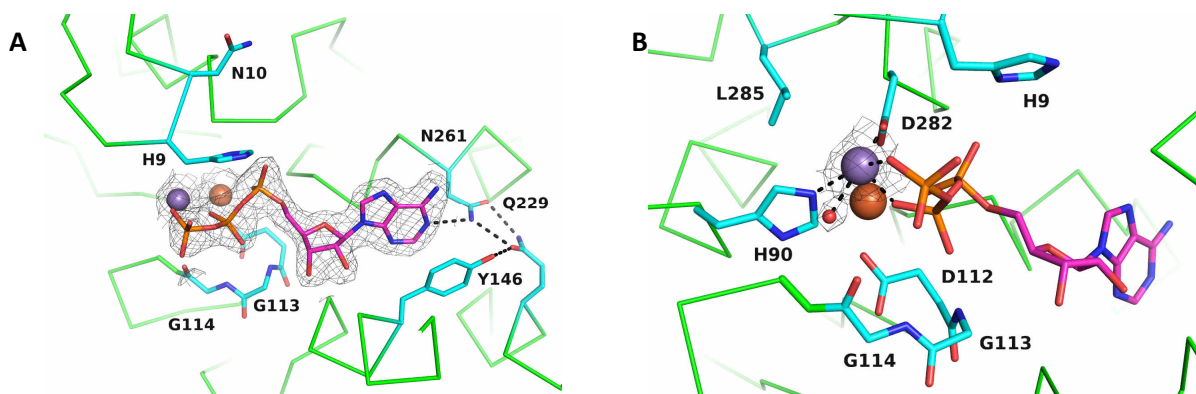
**Abbildung 74: Bindung der Liganden in SeMj1051 im „Jeffamine“-Puffer und Vergleich mit TobZ N<sup>528</sup>A**

Ribbondarstellung des Enzyms SeMj1051, wobei die C-terminale YrdC-ähnliche Domäne in gelb dargestellt ist. A) Bindung von CP, ATP und  $Mn^{2+}$ . B) Fokus auf die Bindung des „zweiten“  $Mn^{2+}$ . Die abgebildeten Reste sind in *stick*-Darstellung gezeigt. Nicht-C-Atome sind mit den üblichen Farben versehen, wobei die C-Atome der Liganden violett und die C-Atome der Aminosäuren türkis eingefärbt sind. Die *omit-map* der  $F_o - F_c$ -Dichte (Auflösung 1,8 Å, konturiert mit 3  $\sigma$  bei A) und 3,5  $\sigma$  bei B), abgeschnitten bei 2 Å Abstand) ist in grau dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen (Abstand: 2,2 - 3,5 Å) sind in schwarz gefärbt. Die Manganionen sind als lila Kugel, während die Wassermoleküle als rote Kugeln dargestellt sind. C,D) Vergleich der YrdC-ähnlichen Domäne von Mj1051 und TobZ N<sup>528</sup>A. Die C-terminale YrdC-ähnliche Domäne von TobZ N<sup>528</sup>A ist in blau dargestellt. Dabei sind die Nicht-C-Atome mit den üblichen Farben versehen, wobei die C-Atome der Mj1051-Struktur türkis und die C-Atome der TobZ-Struktur violett eingefärbt sind. Umgekehrt gilt dies für die entsprechenden Liganden.

Es konnte in der YrdC-ähnlichen Domäne die Bindung von CP und ATP beobachtet werden (Abbildung 74 A, 111). Die Bindung der beiden Substrate ist vergleichbar mit der Bindung im aktiven Zentrum von TobZ (Abbildung 74 C, 111). Eine partielle Elektronendichte, die auf eine Carbamoyl-AMP-Intermediat hindeuten würde, war nicht ersichtlich. Auffällig ist, dass ein zweites Manganion in der YrdC-ähnlichen Domäne von Mj1051 gebunden ist, wobei die Dichte klar von einem Wasser unterschieden werden kann. Das Ion wechselwirkt mit der

Seitenkette von T<sup>474</sup> und S<sup>475</sup>, den Carbonyl-Sauerstoffen von S<sup>475</sup> und N<sup>477</sup>, sowie zwei benachbarten Wassermolekülen und bildet zwei Interaktionen mit dem  $\gamma$ -Phosphat des ATP aus (Abbildung 74 B, 111). Eine achtfache Koordinierung des Manganions ist untypisch für biologische Systeme, konnte aber für gemischte organische Systeme nachgewiesen werden (Louloudi *et al.*, 1999). Durch die Überlagerung mit der Struktur von TobZ N<sup>528</sup>A konnte festgestellt werden, dass sich das Manganion an der gleichen Position wie die  $\epsilon$ -Aminogruppe von TobZ K<sup>443</sup> befindet. Es liegt ein verändertes Wasserstoffbrückennetzwerk ausgehend von Rest R<sup>390</sup> im Vergleich zu TobZ R<sup>445</sup> vor (Vgl. Abbildung 44 C, S. 80). Die Aminogruppe der Seitenkette von N<sup>395</sup> befindet sich nicht im Wasserstoffbrückenbindungsabstand zu dem Carbonyl-Sauerstoff von M<sup>394</sup>, wie es entsprechend für TobZ beobachtet wurde. Jedoch wechselwirkt die Guanidinogruppe von R<sup>390</sup> mit dem Carbonyl-Sauerstoff von M<sup>394</sup>.

Die Analyse der Kae1-ähnlichen Domäne ergab ebenfalls eine ATP-Bindung, die für TobZ bisher nicht beobachtet werden konnte (Abbildung 75 A, S. 112). Dabei entspricht die Bindung des  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphates dem des ADP, jedoch wird das  $\gamma$ -Phosphat über ein zusätzliches Manganion gebunden. Diese interagiert mit der Seitenkette von H<sup>90</sup> und D<sup>282</sup>, sowie über das  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphat des ATP sowie über ein gebundenes Wassermolekül (Abbildung 75 B, S. 112). Demnach besteht eine 5-fache Koordinierung, die womöglich durch eine Drehung des  $\gamma$ -Phosphats des ATP in eine typische 6-fache Koordinierung übergehen kann (nicht gezeigt). Als Folge der Bindung des ATP erfolgt eine Drehung der

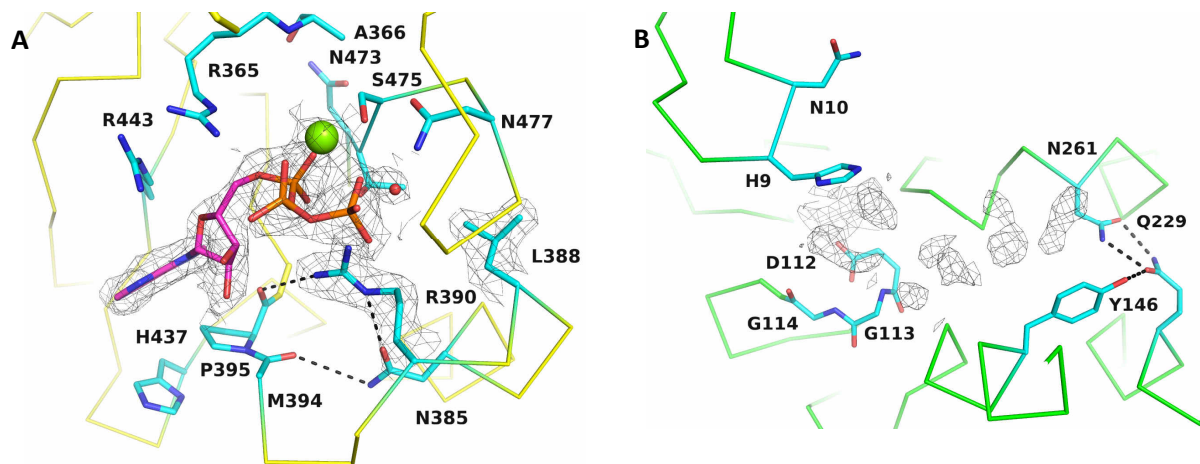


**Abbildung 75: Bindung der Liganden in SeMj1051 im „Jeffamine“-Puffer**

Ribbondarstellung des Enzyms SeMj1051, wobei die N-terminale Kae1-ähnliche Domäne in grün dargestellt ist. A) Bindung von ATP und Mn<sup>2+</sup>. B) Fokus auf die Bindung des Mn<sup>2+</sup>. Die abgebildeten Reste sind in stick-Darstellung gezeigt. Nicht-C-Atome sind mit den üblichen Farben versehen, wobei die C-Atome der Liganden violett und die C-Atome der Aminosäuren türkis eingefärbt sind. Die *omit-map* der F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>-Dichte (Auflösung 1,8 Å, konturiert bei 3  $\sigma$  bei (A) und 3,5  $\sigma$  bei (B)) ist in grau dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen (Abstand: 2,2 - 3,5 Å) sind in schwarz gefärbt. Die Manganionen sind als lila Kugel, während das Wassermolekül als rote Kugel dargestellt ist.

Reste H<sup>9</sup> und N<sup>10</sup> um ihre C <sub>$\alpha$</sub> -C <sub>$\beta$</sub> -Bindung, da anderenfalls eine sterische Abstoßung zwischen dem Histidin-Rest mit dem  $\gamma$ -Phosphat besteht. In Folge der Bewegung von H<sup>9</sup> verschiebt sich der Rest N<sup>10</sup>, um eine weitere sterische Abstoßung zu verhindern. Da im

Gegensatz zu TobZ eine ATP-Bindung in der Kae1-ähnlichen Domäne beobachtet werden konnte, wurde untersucht, ob auch eine ATP-Bindung in der YrdC-ähnlichen Domäne ohne das Substrat CP möglich ist, was für TobZ bisher nicht beobachtet werden konnte. Daher wurde für das *soaking*-Experiment in Abwesenheit von CP durchgeführt. Es konnte ein Datensatz mit einer Auflösung von 2,1 Å erhalten werden (Statistiken, Anhang 9, S. 171). Die Analyse der Elektronendichte in der YrdC-ähnlichen Domäne deutet auf eine Bindung von ATP in Abwesenheit von CP hin (Abbildung 76 A, S. 113). Im Vergleich zur CP-abhängigen Bindung ist das  $\alpha$ -Phosphat des ATP an die Phosphat-Bindestelle des CP verschoben und



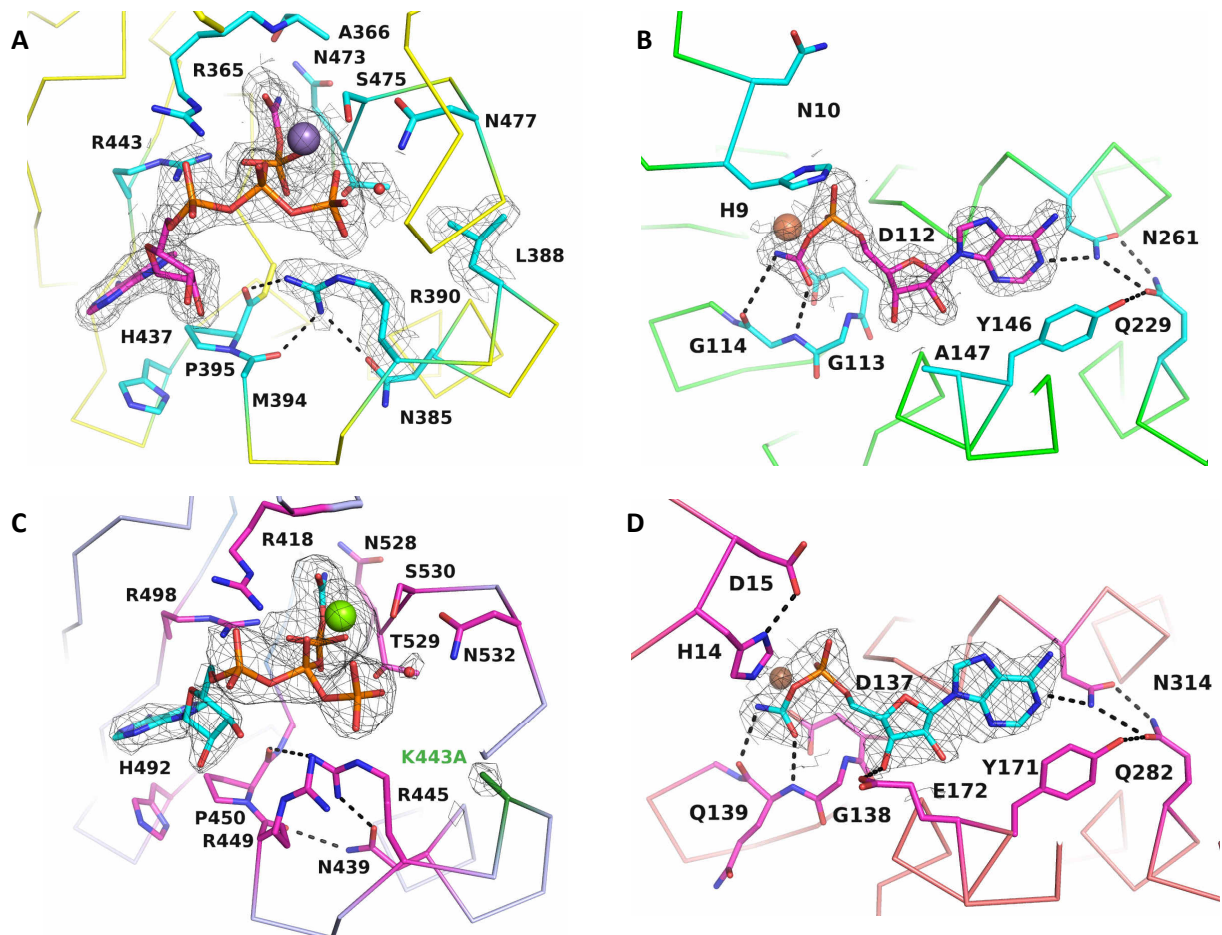
**Abbildung 76: Bindung der Liganden in Mj1051 in Abwesenheit von CP**

Ribbondarstellung des Enzyms Mj1051, wobei die C-terminale YrdC-ähnliche Domäne in gelb und die N-terminale Kae1-ähnliche Domäne in grün dargestellt ist. A) Bindung von ATP und Mg<sup>2+</sup> in der YrdC-ähnlichen Domäne. B) Fokus auf die Kae1-ähnliche Domäne. Die abgebildeten Reste sind in *stick*-Darstellung gezeigt. Nicht-C-Atome sind mit den üblichen Farben versehen, wobei die C-Atome der Liganden violett und die C-Atome der Aminosäuren türkis eingefärbt sind. Die *omit-map* der F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>-Dichte (Auflösung 2,1 Å, konturiert mit 3  $\sigma$ ) ist in grau dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen (Abstand: 2,2 - 3,5 Å) sind in schwarz gefärbt. Das Magnesiumion ist als grüne Kugel, während das Wassermolekül als rote Kugel dargestellt ist.

interagiert dabei mit dem gebundenen Metallion sowie den Seitenketten von S<sup>475</sup> und T<sup>474</sup>. Die Distanz zwischen der Position des  $\alpha$ -Phosphat des ATP in der CP-abhängigen und -unabhängigen Bindung beträgt 6 Å (nicht gezeigt). Weiterhin wechselwirken das  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphat mit dem gebundenen Metallion, wobei die Verschiebung zur CP-abhängigen Bindung mit 1,3 Å für das  $\beta$ - bzw. 0,3 Å in Bezug auf das  $\gamma$ -Phosphat minimal ist (nicht gezeigt). Das Wasserstoffbrückennetzwerk ändert sich um den Rest R<sup>390</sup> (Vgl. Abbildung 74 A, S. 111). Der Rest interagiert mit dem  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Phosphat des ATP. Die Konformation wird vermutlich durch das Wasserstoffbrückennetzwerk mit den Resten P<sup>395</sup> und N<sup>385</sup> stabilisiert, wodurch möglicherweise die Bindung des ATP-Moleküls gestärkt wird.

In der Kae1-ähnlichen Domäne konnte keine Elektronendichte für ein Nucleotid beobachtet werden (Abbildung 76 B, S. 113). Da ebenfalls die Dichte für das Metallion in dieser Domäne fehlt, ist die Bindung eines Nucleotids vermutlich nicht möglich, jedoch befinden sich die Reste H<sup>9</sup> und N<sup>10</sup> in einer Konformation, die bei der ATP-Bindung beobachtet werden konnte (Abbildung 75 A, S. 112).

Da beim *soaking*-Experiment im „Jeffamine“-Puffer mit den Substraten CP, ATP und  $Mn^{2+}$  kein Carbamoyl-AMP beobachtet werden konnte, wurde der Versuch mit den gleichen Substraten im „MPD“-Puffer durchgeführt. Der pH-Wert des Puffers ist mit pH 7,5 leicht basisch, was die Carbamoyl-AMP-Bildung vermutlich begünstigen könnte. Es konnte ein Datensatz mit einer Auflösung von 1,8 Å erhalten werden (Statistiken, Anhang 9, S. 171).



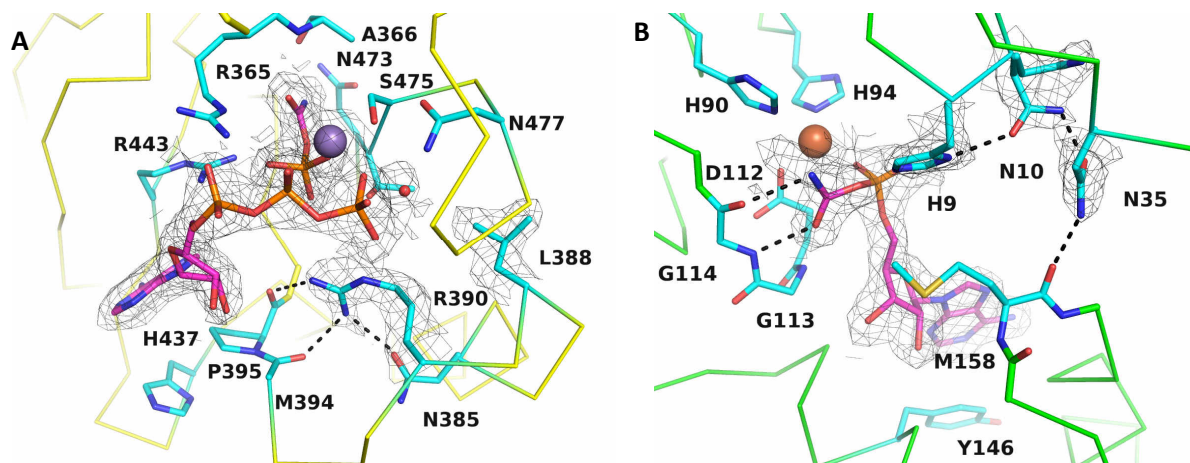
**Abbildung 77: Bindung der Liganden in SeMj1051 im „MPD“-Puffer und Vergleich mit TobZ K<sup>443</sup>A**

Ribbondarstellung des Enzyms SeMj1051. Die C-terminale YrdC-ähnliche Domäne ist in gelb (A) und die N-terminale Kae1-ähnliche Domäne ist in grün (B,) dargestellt. Die abgebildeten Reste sind in *stick*-Darstellung gezeigt. Nicht-C-Atome sind mit den üblichen Farben versehen, wobei die C-Atome der Liganden violett und die C-Atome der Aminosäuren türkis eingefärbt sind. Die *omit-map* der  $F_o - F_c$ -Dichte (Auflösung 1,8 Å, konturiert mit  $3\sigma$ ) ist in grau dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen (Abstand: 2,2 - 3,5 Å) sind in schwarz gefärbt. Das Manganion ist als lila Kugel, während das Eisenatom als braune Kugel gezeigt ist. C, D) Vergleich mit TobZ K<sup>443</sup>A. Die Abbildungen wurden aus Abbildung 43 A und B (S. 79) übernommen.

In der YrdC-ähnliche Domäne von Mj1051 wurde eine Elektronendichte beobachtet, die als CP und ATP interpretiert werden konnte (Abbildung 77 A, S. 114). Die Bindung beider Substrate ist identisch mit der Bindung im „Jeffamine“-Puffer, wobei die Bindung für das zweite Manganion nicht beobachtet werden konnte (Vgl. Abbildung 74 A, S. 111).

Die Analyse der Kae1-ähnlichen Domäne ergab eine Elektronendichte die klar als Carbamoyl-AMP interpretiert werden konnte (Abbildung 77 B, S. 114). Die Bindung der Adeninbase und der Ribose unterscheidet sich nicht von vorherigen Ergebnissen. Die Carbamoylgruppe des CA bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu dem Amid-Stickstoff und

dem Carbonyl-Sauerstoff der Aminosäure G<sup>114</sup> aus. Die Kristallstruktur der TobZ-Variante K<sup>443</sup>A zeigt vergleichbare Ergebnisse (Abbildung 77 C und D, S. 114). Möglicherweise ist durch die Änderung des pH-Wertes von schwach sauer (pH 6,5 im „Jeffamine“-Puffer) zu schwach basisch (pH 7,5 im „MPD“-Puffer) die Carbamoyl-Bildung in der YrdC-ähnlichen Domäne möglich. Auffälligerweise ist im Gegensatz zu TobZ keine potentielle katalytische Diade von H<sup>9</sup> und N<sup>10</sup> zu erkennen (Abbildung 77 B und D, S. 114). Die Konformationen der Reste sind vergleichbar mit der Konformation während der ATP-Bindung (Vgl. Abbildung 75 A, S. 112). Möglicherweise erfolgte zunächst eine ATP-Bindung, welches anschließend durch das gebildete Carbamoyl-AMP verdrängt wurde. Daher könnte vermutlich eine Verlängerung des *soaking*-Experimentes die Konformationsänderung der beiden Reste begünstigen. Zudem wird möglicherweise das CA in der YrdC-ähnlichen Domäne sichtbar, wenn es in dieser Domäne akkumuliert wird. Um die CA-Bildung noch stärker zu begünstigen, wurde der pH-Wert des „MPD“-Puffers auf pH 8 erhöht. Es konnte ein Datensatz mit einer Auflösung von 2,1 Å generiert werden (Statistiken, Anhang 9, S. 171).



**Abbildung 78: Bindung der Liganden in SeMj1051 im „MPD“-Puffer bei pH 8**

Ribbondarstellung des Enzyms SeMj1051. Die C-terminale YrdC-ähnliche Domäne ist in gelb (A) und die N-terminale Kae1-ähnliche Domäne ist in grün (B), dargestellt. Die abgebildeten Reste sind in *stick*-Darstellung gezeigt. Nicht-C-Atome sind mit den üblichen Farben versehen, wobei die C-Atome der Liganden violett und die C-Atome der Aminosäuren türkis eingefärbt sind. Die *omit-map* der  $F_o-F_c$ -Dichte (Auflösung 2,1 Å, konturiert bei 3  $\sigma$ ) ist in grau dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen (Abstand: 2,2 - 3,5 Å) sind in schwarz gefärbt. Das Manganion ist als lila Kugel, während das Eisenatom als braune Kugel gezeigt ist. Das Eisenatom ist als braune Kugel, während die Wassermoleküle als rote Kugeln dargestellt sind. A) Bindung des Carbamoyl-AMP und B) von AMP in der Kae1-ähnlichen Domäne

In der C-terminalen Domäne konnte keine Elektronendichte für ein Carbamoyl-AMP beobachtet werden, jedoch ist eine eindeutige Dichte vorhanden, die den Substraten CP und ATP entspricht (Abbildung 78 A, S. 115). Demnach kann trotz der pH-Erhöhung kein Carbamoyl-AMP in der Domäne nachgewiesen werden. In der Kae1-ähnlichen Domäne kann die vorhandene Dichte dem Carbamoyl-AMP zugewiesen werden (Abbildung 78 B, S. 115). Eine Bindung von ADP kann aufgrund der Elektronendichte ausgeschlossen werden. Die Analyse der Konformation der Reste H<sup>9</sup>, N<sup>10</sup> und N<sup>35</sup> deutet auf die Bildung einer erweiterten katalytischen Diade hin, die möglicherweise zu Hydrolyse des Carbamoyl-AMP in der Kae1-ähnlichen Domäne beiträgt. Die Konformationen der entsprechenden Reste ist



vergleichbar mit der ADP-gebunden Struktur, wobei N<sup>10</sup> zwei alternative Konformation aufweist. (Vgl. Abbildung 73 C, S. 110 und Abbildung 77 B, S. 114).

## 5 Diskussion

### 5.1 Die O-CTase TobZ

#### 5.1.1 Vergleich von TobZ mit den Carbamoyltransferasen

Die Enzymfamilie der O-Carbamoyltransferasen (O-CTasen) katalysieren die Carbamoylierung verschiedenster Akzeptormoleküle. Obwohl allen Enzymen das energiereiche Substrat Carbamoylphosphat gemein ist, benötigen die O-CTasen im Gegensatz zu den N-CTasen zusätzlich ATP um eine entsprechende Reaktion zu katalysieren (Paschos *et al.*, 2002; Freel Meyers *et al.*, 2004). Eine ATP-Abhängigkeit der O-Carbamoyltransferasen konnte bereits für die Enzyme NovN, CmcH und TobZ festgestellt werden (Freel Meyers *et al.*, 2004; Coque *et al.*, 1995; Clausnitzer, 2010).

Die von TobZ-katalysierte Carbamoylierungsreaktion war eindeutig ATP-abhängig, da in Abwesenheit des Substrates keine enzymatische Aktivität detektiert wurde. Weiterhin konnte die Carbamoylierungsreaktion durch die massenspektrometrische Analyse des Produktes Nebramycin 5' bestätigt werden, da die Carbamoylgruppe eindeutig am Ring I identifiziert wurde. Durch die Anwesenheit von ADP kam die Carbamoylierungsreaktion fast vollständig zum Erliegen, wodurch eine mögliche Regulation aufgrund des Verhältnisses von ATP zu ADP vorliegen könnte. Eine Regulation könnte zu Grunde liegen, da auch ohne die Anwesenheit des Akzeptors ein Umsatz von ATP zu AMP mittels *rp*-HPLC festgestellt werden konnte, was in der Summe eine Hydrolyse von 4 Molekülen ATP zur Folge hat. Möglicherweise ist aber die Bedeutung dieser energieverwendenden Reaktion als gering einzuschätzen, da für TobZ eine katalytische Geschwindigkeit von 4,3 Umsätzen pro Minute festgestellt werden konnte, welche im Vergleich zur Geschwindigkeit des ATP-bildenden Enzyms ATP-Synthetase mit ca.  $80 \text{ s}^{-1}$  vernachlässigbar ist (Fischer und Graber, 1999). Eine zu TobZ vergleichbare katalytische Aktivität konnte für die verwandte O-CTase NovN mit 4,1 Umsätzen pro Minute bestimmt werden (Freel Meyers *et al.*, 2004).

Neben dem Nachweis der Enzymaktivität von TobZ wurde zur weiteren Charakterisierung des Enzyms die Bestimmung der Affinität der Substrate CP, ATP und Tobramycin mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie erfolgreich durchgeführt. Die Auswertung der Daten ergab eine Dissoziationskonstante von  $10,6 \mu\text{M}$  bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Für die verwandte O-CTase NovN aus *Streptomyces spheroides* wurde die Bindung von CP nicht direkt, sondern über kinetische Analysen bestimmt. Dabei wurde eine Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) von

5,1  $\mu\text{M}$  für CP bei Raumtemperatur festgestellt, welche sich in der gleichen Größenordnung befindet (Freel Meyers *et al.*, 2004). Der Wert ist jedoch nicht genau vergleichbar mit der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ), da per Definition  $K_m$  und  $K_D$  nur vergleichbar sind, wenn die Reaktionsgeschwindigkeit wesentlich geringer ist als die Dissoziationsgeschwindigkeit des Substrates. Eine Analyse des  $K_m$ -Wertes für CP konnte für TobZ nicht durchgeführt werden, da die dünnenschichtchromatographische Trennung des terminalen Akzeptors Tobramycin vom Produkt Nebramycin 5' nur unzureichend für genaue kinetische Analysen war. Die Affinität der verwandten S-CTase HypF aus *E. coli* für das Substrat Carbamoylphosphat wurde ebenfalls kinetisch bestimmt und beträgt 5,8  $\mu\text{M}$  bei 37 °C, wobei die Bindung nicht in der YrdC-ähnlichen Domäne von HypF erfolgt, sondern in der N-terminalen Acylphosphatase Domäne vorhergesagt wird (Paschos *et al.*, 2002). Für die N-CTase Aspartat-Transcarbamoylase aus *E. coli* konnte eine Affinität von CP zum Enzym von 14,3  $\mu\text{M}$  bei 26 °C bestimmt werden, die in späteren Arbeiten methodenbedingt auf 2,4  $\mu\text{M}$  präzisiert wurde (Rosenbusch und Griffin, 1973; Suter und Rosenbusch, 1976). Des Weiteren wurde für die N-CTase Ornithin-Transcarbamoylase aus *E. coli* ein  $K_D$ -Wert von 15  $\mu\text{M}$  bei 37 °C für das Substrat CP ermittelt (Legrain und Stalon, 1976). Obwohl verschiedene Faltungstypen von O-CTasen, S-CTasen und den N-CTasen für die Bindung von CP zugrunde liegen, ergeben sich Affinitäten der Bindung des Substrates in ähnlicher Größenordnung. Für die ATP-Bindung an TobZ scheint die Anwesenheit von CP Voraussetzung zu sein (Parthier *et al.*, 2012). Für die ATCase aus *E. coli* konnte ebenfalls eine vorherige Anwesenheit von CP für die Aspartat-Bindung gezeigt werden (Hsuanyu und Wedler, 1987). Wenn die beiden Substrate CP und ATP im aktiven Zentrum der YrdC-ähnlichen Domäne von TobZ binden, ist eine chemische Reaktion zu vermuten, die Reaktionswärme freisetzt und somit das ITC-Bindungsexperiment beeinflusst. Der Einsatz von nicht-hydrolysierbaren ATP-Analoga war nicht möglich, da diese bereits in gelöster Form vorlagen und somit ungeeignet für die ITC waren. Daher wurde versucht, durch den Einsatz der Variante T<sup>529</sup>A eine chemische Reaktion zu unterdrücken, da die Mutante bei der Analyse der Enzymaktivität mittels DC kaum detektierbaren Umsatz zeigte. Es konnte eine Bindungskurve für ATP an TobZ aufgenommen werden, jedoch kann das Auftreten von Reaktionswärme während der Messung nicht ausgeschlossen werden, da nach der vermeintlichen Sättigung des Enzyms durch das Nukleotid immer noch Wärmefreisetzung detektiert wurde. Die Auswertung der Daten ergab eine Dissoziationskonstante von 16,2  $\mu\text{M}$  bei 20 °C. Für die S-CTase HypF aus *E. coli* konnte die ATP-Affinität kinetisch mit einem  $K_m$ -Wert von 15  $\mu\text{M}$  bei 37 °C bestimmt werden (Paschos *et al.*, 2002). In späteren Arbeiten zu HypF aus *E. coli* konnte eine Affinität für die ATP-Bindung mit dem Analogon AMPPNP in der YrdC-ähnlichen Domäne von 6  $\mu\text{M}$  bei 20 °C festgestellt werden (Petkun *et al.*, 2011). Interessanterweise wurde die Bindungsmessung ebenfalls mittels ITC, aber in Abwesenheit eines divalenten Metallions

(Mg<sup>2+</sup> oder Mn<sup>2+</sup>) durchgeführt. Im Unterschied zu TobZ erfolgt die ATP-Bindung von HypF in der YrdC-ähnlichen Domäne auch in Abwesenheit von CP (Petkun *et al.*, 2011; Shomura und Higuchi, 2012). Der Zusatz eines divalenten Metallions könnte die Bindungsaffinität von HypF für ATP möglicherweise noch erhöhen. Andererseits erfolgt eine Hydrolyse von ATP zu AMP und Pyrophosphat auch in Abwesenheit von CP, welche durch den Einsatz von AMPPNP nicht vermeidbar ist (Shomura und Higuchi, 2012). Nichtsdestotrotz ist die ATP-Bindung in der YrdC-ähnlichen Domäne von TobZ vergleichbar mit der von HypF, da Werte in ähnlicher Größenordnung festgestellt wurden.

Die Bindung des terminalen Akzeptors Tobramycin an TobZ konnte ebenfalls mittels ITC realisiert werden, wobei dafür die Anwesenheit eines Nukleotids in der Kae1-ähnlichen Domäne nötig schien. Im nukleotidgebundenen Zustand kommt es zur Ausbildung eines Wasserstoffbrückennetzwerkes zwischen der 3'-OH-Gruppe des Nukleotids, der Seitenkette von E<sup>172</sup> und der Hydroxygruppe von Y<sup>230</sup> (Vgl. Abbildung 46 A und B, S. 83). Dadurch wird der Rest E<sup>172</sup> vermutlich in *H*-Brückenabstand zum terminalen Akzeptor gebracht. Die Auswertung des Bindungsexperimentes ergab eine Dissoziationskonstante für Tobramycin an TobZ im AMP-gebundenen Zustand von 13,8 µM bei 20 °C. Für die verwandte O-CTase NovN konnte eine Affinität des terminalen Akzeptors Novobiocin von 4,6 µM bei Raumtemperatur kinetisch bestimmt werden. Die Affinität des terminalen Akzeptor der S-CTase HypF, das Protein HypE, wurde mit einer Dissoziationskonstante für die Interaktion von HypF zu HypE mittels ITC mit 220 nM bei 15 °C bestimmt (Rangarajan *et al.*, 2008). Die HypF-HypE-Bindung wird als enthalpisch und entropisch favorisiert beschrieben, wobei die Tobramycin-Bindung an TobZ vorrangig entropisch getrieben scheint (Tabelle 1, S. 61).

Für die Auswertung der durchgeführten ITC-Messungen wurde das Modell für 2 Bindungsstellen genutzt, obwohl auf Grundlage der Kristallstruktur nur eine Bindungsstelle pro Molekül vorhergesagt werden konnte. Da in allen Messungen ein Übergang bei einem stöchiometrischen Verhältnis von 0,5 auftrat, erschien eine mögliche Dimerisierung, welche durch die Substratbindung ausgelöst wird, als Ursache für den auftretenden Effekt. Die Methode der analytischen Ultrazentrifugation zeigte unabhängig der zugesetzten Liganden, dass TobZ in Lösung als Dimer vorliegt. Für die O-CTase NovN wurde ebenfalls ein mögliches Dimer mittels DLS festgestellt (Gomez, I *et al.*, 2008). Daher kann eine substrat-induzierte Oligomerisierung als Ursache ausgeschlossen werden. Möglicherweise könnten weitere Messungen mit geringerer Substratkonzentration dazu beitragen, den ersten Übergang bis zu einer Stöchiometrie von 0,5 stärker aufzulösen, um eventuell durch die ermittelten thermodynamischen Konstanten Rückschlüsse auf die Ursache des beobachteten Effekts ziehen zu können.

### 5.1.2 TobZ-katalysierte Carbamoylierungsreaktion

Neben der biophysikalischen Charakterisierung von TobZ lag der Schwerpunkt in der detaillierten Analyse der ATP-abhängigen Carbamoylierungsreaktion, die auch bei den Enzymen CmCH und NovN beobachtet wurde (Brewer *et al.*, 1980; Freil Meyers *et al.*, 2004). Die Struktur von TobZ ergab einen modularen Aufbau des Enzyms aus einer N-terminalen Kae1-ähnlichen Domäne, in welcher der Akzeptor Tobramycin gebunden werden kann und eine YrdC-ähnliche Domäne, in die CP bindet (PDB: 3VET; (Parthier *et al.*, 2012)). Durch *soaking*-Experimente in Anwesenheit der beiden Substrate CP sowie ATP und anschließende röntgenkristallographische Untersuchung konnte die Bildung eines Carbamoyl-AMP (CA) während der TobZ-katalysierten Carbamoylierungsreaktion offenbart werden. Zudem wurde das Zwischenprodukt in beiden aktiven Zentren von TobZ beobachtet. Damit konnte zum zweiten Mal die Existenz eines CA-Intermediates gezeigt werden (Petkun *et al.*, 2011). Als Ursprung des Phosphates im CA könnte sowohl ATP als auch CP in Betracht kommen. Zum Nachweis des Ursprungs eignen sich radioaktiv-markierte Substrate in Form von  $\alpha^{32}\text{P-ATP}$  und  $^{32}\text{P-CP}$ . Nur durch den Einsatz von  $\alpha^{32}\text{P-ATP}$  konnte radioaktives AMP als Produkt der Carbamoylierungsreaktion festgestellt werden. Zur weiteren Charakterisierung der Reaktion wurde radioaktiv-markiertes  $\gamma^{32}\text{P-ATP}$  eingesetzt, welches zur CP-abhängigen Bildung von radioaktiv-markiertem  $^{32}\text{P-PP}_i$  führte. Letzteres mündete durch den Einsatz einer Pyrophosphatase in radioaktiv-markiertem Phosphat. Die CP-abhängige Bildung von  $^{32}\text{P-ATP}$  unter Einsatz von  $^{32}\text{P-PP}_i$  untermauerte die Annahme einer TobZ-katalysierten Adenylierungsreaktion. Aufgrund dieser Rückreaktion wirkt sich wahrscheinlich  $\text{PP}_i$  inhibierend auf die Carbamoylierungsreaktion aus, während der Einsatz einer  $\text{PP}_i$ -ase zu einer stärkeren Produktakkumulation führte.

Aus chemischen Gesichtspunkten können für die Bildung eines Carbamoyl-AMP zwei unterschiedliche Reaktionen postuliert werden. A) Angriff des Phosphates des CP auf den 5'-Kohlenstoff des AMP zur Bildung eines CA und anschließende Hydrolyse des freien Triphosphates zu  $\text{P}_i$  und  $\text{PP}_i$ ; B) CP-Hydrolyse zu Carbamat und Phosphat und anschließender Angriff des Carbamates auf das  $\alpha$ -Phosphat des ATP zur Bildung des CA und Freisetzung von  $\text{PP}_i$ . Um zwischen beiden Mechanismen A) und B) unterscheiden zu können, eignet sich der Einsatz von teilweise  $^{18}\text{O}$ -markiertem CP ( $^{18}\text{O-CP}$ ), bei dem die Sauerstoffe des Phosphates  $^{18}\text{O}$ -markiert sind, während der Carbonyl-Sauerstoff unmarkiert vorliegt. Bei Mechanismus A) sollte das entstehende AMP nicht markiert vorliegen, während es bei B) zu einer  $^{18}\text{O}$ -Markierung von AMP kommt. Der Einsatz von  $^{18}\text{O-CP}$  zur Carbamoylierungsreaktion von TobZ und die anschließende massenspektrometrische Analyse ergab eine 1:1-Verteilung markierter und unmarkierter AMP-Spezies, was auf beide

Mechanismen hindeuten würde. Deshalb wurde das zweite Produkt Nebramycin 5' ebenfalls massenspektrometrisch untersucht. Dabei zeigte sich auch eine nahezu gleiche Verteilung von markierter und unmarkierter Spezies, was nur im Mechanismus B) möglich ist. Durch den Einsatz von teilweise  $^{18}\text{O}$ -markiertem CP konnte eine initiale Hydrolyse von Carbamoylphosphat indirekt gezeigt werden, was ein bisher nicht beschriebenes Carbamat-Intermediat voraussetzt. Da ein 1:1-Verhältnis zwischen markierter und unmarkierter Spezies von AMP und Nebramycin 5' vorlag, konnte die Vermutung zur Bildung eines Carbamat-Anions untermauert werden. Zudem deuten die Ergebnisse auf ein freies Rotieren des Carbamat-Anions im aktiven Zentrum der YrdC-ähnlichen Domäne hin, da anderenfalls nur die Bildung von  $^{18}\text{O}$ -AMP möglich ist. Durch das freie Rotieren besteht eine jeweils 50 %-ige Wahrscheinlichkeit des Angriff eines der beiden Carbonyl-Sauerstoffatome zur Bildung eines CA, welches dann in der nachfolgenden Reaktion zu  $^{18}\text{O}$ -AMP bzw.  $^{18}\text{O}$ -Nebramycin 5' weiter umgesetzt wird. Aus den Ergebnissen kann ein Reaktionsmechanismus unter der Verwendung von  $^{18}\text{O}$ -CP postuliert werden (Abbildung 79, S. 121).

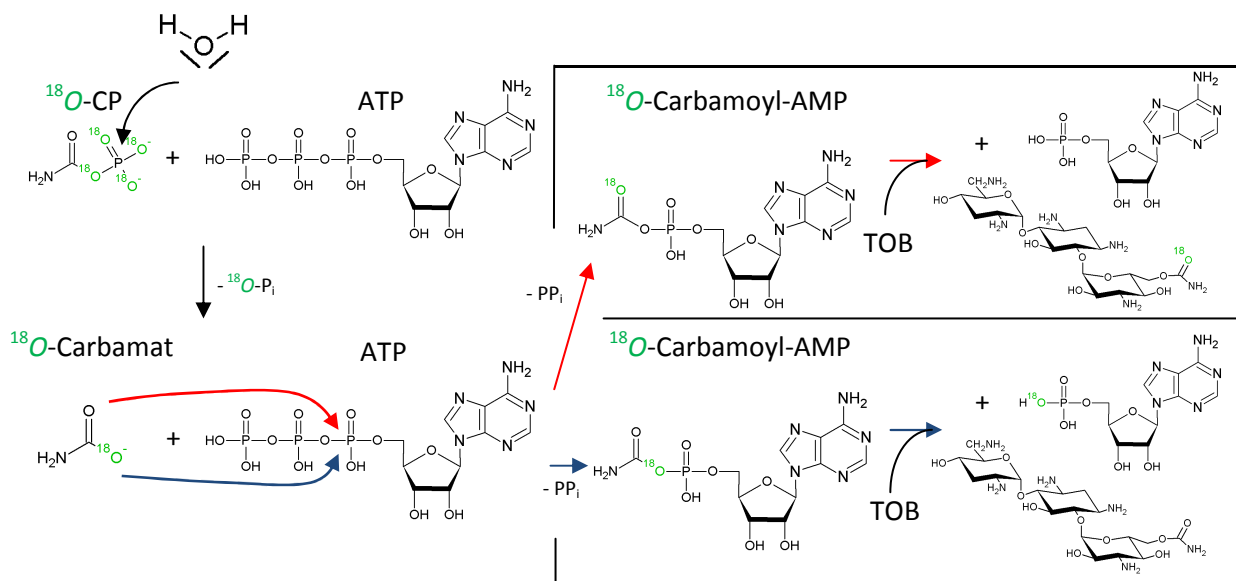


Abbildung 79: Postulierter Mechanismus für TobZ unter Verwendung von  $^{18}\text{O}$ -CP

Nach der Bindung beider Substrate im aktiven Zentrum erfolgt eine  $^{18}\text{O}$ -CP-Hydrolyse, wodurch das erste Produkt  $^{18}\text{O}$ -P<sub>i</sub> und das erste Intermediat  $^{18}\text{O}$ -Carbamat gebildet werden. Entweder der markierte Sauerstoff der Intermediates (blauer Pfeil) oder der nicht-markierte Sauerstoff (roter Pfeil) greift den  $\alpha$ -Phosphor des ATP an, wodurch das zweite Produkt PP<sub>i</sub> und das zweite Intermediat  $^{18}\text{O}$ -Carbamoyl-AMP entstehen. Für das zweite Intermediat können mehrere Spezies postuliert werden, wobei eines in  $^{18}\text{O}$ -Nebramycin 5' mündet (roter Pfeil) und das andere zu  $^{18}\text{O}$ -AMP umgesetzt wird (blauer Pfeil).

Aus diesem postulierten Mechanismus ergibt sich die 1:1-Verteilung von unmarkiertem zu markiertem  $^{18}\text{O}$ -AMP bzw.  $^{18}\text{O}$ -Nebramycin 5', jedoch setzt diese Reaktion eine CP-Hydrolyse-Reaktion voraus. Im Anschluss sollte ein Carbamat-Anion entstehen, welches mit ATP zum Carbamoyl-AMP reagieren könnte. Das carbamoylierte AMP kann danach von der 6''-OH-Gruppe des Tobramycins angegriffen werden, was zur Bildung des Produktes Nebramycin 5' sowie AMP führt. Die 1:1-Verteilung der  $^{18}\text{O}$ -markierten Produkte AMP und

Nebramycin 5' zur ihren unmarkierten Pendant deutet darauf hin, das keine strukturelle Selektion der beiden Sauerstoffe des vermutlichen  $^{18}\text{O}$ -Carbammat-Intermediates vorliegt.

Die Bildung von reaktiven Zwischenprodukten und das Transportieren innerhalb eines Enzyms zwischen verschiedenen aktiven Zentren konnte interessanterweise bei der Carbamoylphosphat-Synthetase beobachtet werden. Bei der Synthese von CP werden die reaktiven Intermediate Carboxyphosphat und Carbamat gebildet, die in einem ca. 96 Å langen Kanal innerhalb des Enzyms zwischen den reaktiven Zentren transportiert werden (Thoden *et al.*, 1997; Thoden *et al.*, 1999). Auch in den O-CTasen kommt es zu einem Transfer, indem die Carbamoylgruppe ca. 20 Å von der YrdC-ähnlichen zur Kae1-ähnlichen Domäne übertragen wird.

Da in beiden aktiven Zentren von TobZ das Carbamoyl-AMP gefunden wurde, deutet der Transfer des Intermediates auf den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der gesamten Katalyse hin. Falls die CP-Hydrolyse oder die CA-Bildung selbst geschwindigkeitsbestimmend sein sollten, müsste in der Struktur von TobZ in der YrdC-ähnlichen Domäne CP und ATP gefunden werden, während in der Kae1-ähnlichen Domäne das Carbamoyl-AMP festgestellt werden sollte. Theoretisch könnte auch die Übertragung der Carbamoylgruppe auf den terminalen Akzeptor in der N-terminalen Domäne geschwindigkeitsbestimmend sein, was ebenfalls auf das Vorhandensein des CA in beiden aktiven Zentren zur Folge haben sollte. Da die Aktivität der TobZ-katalysierten Carbamoylierungsreaktion in Abwesenheit des terminalen Akzeptors nur halb so groß ist wie in Anwesenheit, beschleunigt die Zugabe von Tobramycin die Reaktion. Dies deutet auf den terminalen Carbamoyltransfer als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt hin.

Um den Mechanismus der TobZ-katalysierten Carbamoylierungsreaktion weiter zu untersuchen, wurden eine Reihe von Punktmutationen in der YrdC-ähnlichen Domäne eingeführt, um eine eventuelle Beteiligung von Aminosäuren an der Bildung des CA zu offenbaren. Dazu wurden aus der Struktur von TobZ im CP und AMPCPP gebundenen Zustand und im Komplex mit dem Carbamoyl-AMP sowie unter Einbezug des Sequenzvergleiches mit anderen O-CTasen geeignete Aminosäuren ausgewählt. Durch die eingeführten Mutationen mit anschließender Analyse der Aktivität mittels DC und röntgenkristallographischer Untersuchung der generierten Proteinkristalle im Komplex mit den Substraten CP und ATP konnte eine vermutliche Beteiligung der Aminosäuren  $\text{N}^{528}$ ,  $\text{T}^{529}$ ,  $\text{K}^{443}$ ,  $\text{R}^{445}$  und  $\text{N}^{439}$  an der CP-Hydrolyse festgestellt werden (Abbildung 80, S. 124). Es wurde ein Wasserstoffbrückennetzwerk beobachtet, welches von den konservierten Aminosäuren  $\text{N}^{439}$ ,  $\text{R}^{445}$ ,  $\text{R}^{449}$  und  $\text{P}^{450}$  gebildet wird. Die Störung des H-Brückennetzwerkes durch Mutation der beteiligten Aminosäuren  $\text{R}^{445}$  und  $\text{N}^{439}$  zu Lysin bzw. Serin führte zum Aktivitätsverlust des Enzyms. Um eine CP-Hydrolyse zu katalysieren, muss ein entsprechendes

Wassermolekül in der Nähe des CP deprotoniert werden, um an den Phosphor des CP angreifen zu können. Als mögliche Base kam dabei der Rest K<sup>443</sup> in Betracht, da sich dieser in der Nähe der beiden bereits erwähnten Aminosäuren befindet und Lysinreste in vielen Enzymen als Base wirken (Paetzel *et al.*, 2002; Van Vleet *et al.*, 2008). Die Variante K<sup>443</sup>A zeigt kaum detektierbaren Umsatz von Tobramycin. Die Analyse der Kristallstruktur ergab eine Bindung von CP und ATP in der YrdC-ähnlichen Domäne von TobZ, jedoch konnte in der Kae1-ähnlichen Domäne eine Elektronendichte erhalten werden, die auf ein Carbamoyl-AMP hindeutet. Möglicherweise ist auch das Lösungsmittel in der Lage als Base zu wirken (Abbildung 80 D, S. 124). Unterstützt wird diese These durch das Besetzen der Stelle der  $\epsilon$ -Aminogruppe des K<sup>443</sup> durch ein Wassermolekül. Aufgrund des thermischen CP-Zerfalls kann diese Annahme nur schwer mittels DC-Analyse überprüft werden (Legrain *et al.*, 1995).

Eine weitere Erklärung wäre, dass es durch die Variante K<sup>443</sup>A zu einem Wechsel im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt von dem terminalen Carbamoyltransfer zur initialen CP-Hydrolyse kommt, wodurch die Anwesenheit von CP und ATP in der YrdC-ähnlichen Domäne und des Carbamoyl-AMP in der Kae1-ähnlichen Domäne begründet werden kann. Die gleiche Verteilung der eben beschriebenen Liganden konnte für die Variante N<sup>528</sup>A beobachtet werden, obwohl der Rest N<sup>528</sup> vermutlich nicht direkt an der CP-Hydrolyse involviert ist, da er mit Hilfe der Asparagin-Seitenkette an der Bindung der A<sup>419</sup>-beinhaltenden Schleife beteiligt ist. Trotzdem könnte eine verminderte Stabilisierung des Übergangszustandes der CP-Hydrolyse durch die Mutation N<sup>528</sup>A als Erklärung dienen, wodurch ebenfalls der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zur CP-Hydrolyse verschoben sein könnte (Abbildung 80 F, S. 124). Weiterhin wurde eine Elektronendichte in *H*-Brückenabstand des Restes R<sup>445</sup> detektiert, die als Wassermolekül interpretiert worden ist. Dabei befindet sich das Wassermolekül in Wasserstoffbrückenbindungsabstand zu den Resten R<sup>445</sup>, T<sup>529</sup> und K<sup>443</sup>, wobei der Austausch der beiden letztgenannten jeweils zu Alanin zur Inaktivität des Enzyms führte. Es bestehen Wechselwirkungen zum  $\gamma$ -Phosphat des ATP und zum Phosphat des CP. Demnach könnte es sich um das zur CP-Hydrolyse vermutete Wassermolekül handeln. Dies wird durch die Seitenkette von R<sup>445</sup> im Zusammenspiel mit der Seitenkette von T<sup>529</sup> in eine Position gebracht, wodurch K<sup>443</sup> die Deprotonierung begünstigt um anschließend CP zu hydrolysieren (Abbildung 80 D, S. 124). Abschließend kann festgestellt werden, dass die eingeführten Mutationen den postulierten Mechanismus in der YrdC-ähnlichen Domäne untermauern, da zum einen die Beteiligung einiger Aminosäuren zur Hydrolyse indirekt gezeigt werden konnte. Zum anderen wurde vermutlich das postulierte Wassermolekül zur Hydrolyse von CP in einer Kristallstruktur aufgedeckt.



Um weitere Informationen über den Reaktionsmechanismus zu erhalten, wurden ATP-Analoga in Betracht gezogen, die nicht bzw. verlangsamt zur Pyrophosphat-Abspaltung fähig sind, wie z.B. AMPCPP, AMPNPP und ATP $\alpha$ S (Myers *et al.*, 1963; Ma *et al.*, 1989; Eckstein, 1985). Es wurde auf das Analogon ATP $\alpha$ S zurückgegriffen, da sich die Schwefelmodifikation nur am  $\alpha$ -Phosphat befindet, wodurch das Brücken-Sauerstoffatom

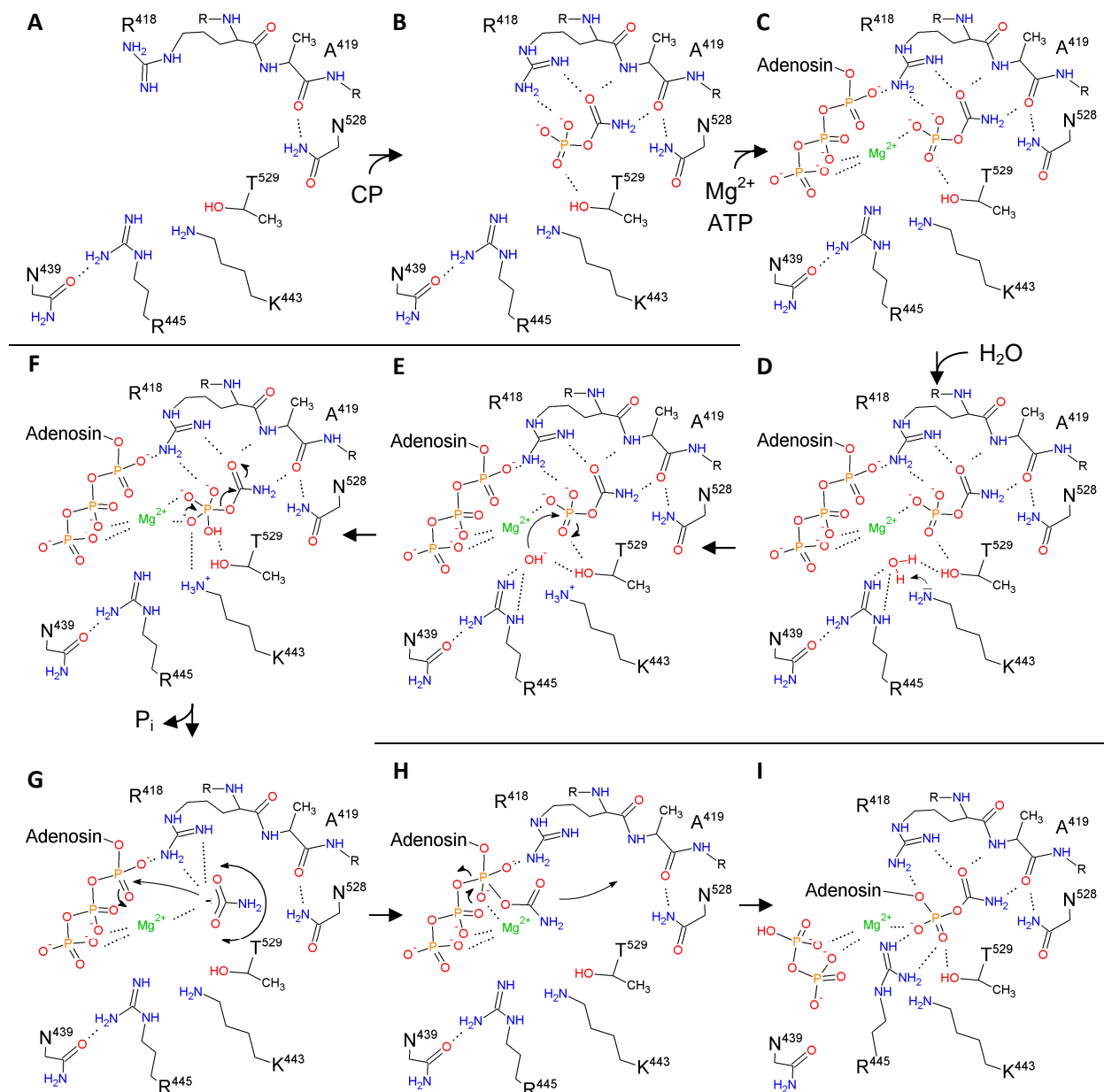


Abbildung 80: Vorgeschlagerener detaillierter Reaktionsmechanismus für die YrdC-ähnliche Domäne von TobZ

A) Das aktive Zentrum der YrdC-ähnlichen Domäne von TobZ in Abwesenheit der Substrate B) Bei der CP-Bindung bewegt sich die Seitenkette von R<sup>418</sup> zum CP. C) Bindung von Mg<sup>2+</sup>•ATP nach vorheriger CP-Bindung. D) Nach der Bindung beider Substrate wird das gebundene Wassermolekül durch K<sup>443</sup> deprotoniert. E) Angriff des Hydroxidions auf den Phosphor des CP. F) Postulierter Übergangszustand der CP-Hydrolyse. G) Nach Hydrolyse wird das Phosphat vermutlich über R<sup>443</sup> → R<sup>534</sup> aus dem Zentrum entlassen (nicht gezeigt). Dabei gibt K<sup>443</sup> wahrscheinlich sein aufgenommenes Proton an das Phosphat ab. Das verbliebene Carbat-Anion rotiert frei in der CP-Bindetasche und greift den  $\alpha$ -Phosphat des ATP an, da das  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphat durch die Mg<sup>2+</sup>-Bindung unzugänglicher sind. Des Weiteren besteht wahrscheinlich eine Wechselwirkung mit der Seitenkette von R<sup>418</sup>, wodurch das Carbat-Anion in die Nähe des  $\alpha$ -Phosphates des ATP geleitet wird. H) Postulierter Übergangszustand der CA-Bildung und PP<sub>i</sub>-Abspaltung. G) Bindung des CA in der CP-Bindetasche aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu CP.

und damit der korrekte Bindungswinkel zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphat erhalten bleibt. Zu beachten ist, dass durch die Einführung eines Schwefelatoms ein Stereozentrum am  $\alpha$ -Phosphat mit *R*- und *S*-Enantiomer vorhanden ist. Durch den Einsatz von ATP $\alpha$ S konnte kein Umsatz von Tobramycin detektiert werden. Durch die Schwefelmodifikation am  $\alpha$ -Phosphat (*P*-*S*-Bindung) kann eine negative Ladung am Schwefel nur energetisch ungünstig auf die benachbarten Sauerstoffatome (*P*-*O*-Bindung) delokalisiert werden kann, da der Schwefel mit den *d*-Orbitalen ist und die Sauerstoffatome über die *p*-Orbitale an den Phosphor gebunden sind. Möglicherweise kann der vermutete Übergangszustand nach Angriff des Carbamat-Anions nicht durch *H*-Brücken stabilisiert werden, da der Schwefel weniger elektronegativer als der Sauerstoff ist und dadurch die Bindungsenthalpie einer *S*-*H*-Brücke geringer ist (Steger und Martin, 1963; Frey und Sammons, 1985; Stivers und Nagarajan, 2006). Dieses Phänomen wird als sog. „Thio Effekt“ bezeichnet und beruht zusätzlich auf einer erhöhten enthalpischen Barriere der Spaltungsreaktion (Herschlag *et al.*, 1991; Purcell und Hengge, 2005). Der simultane Einsatz von CP und ATP $\alpha$ S für das *soaking*-Experiment mit dem TobZ Wildtyp und die anschließende röntgenkristallographische Untersuchung der Proteinkristalle ergab eine Elektronendichte in der YrdC-ähnlichen Domäne, die widererwartend dem Carbamoyl-AMP entspricht. Der Besetzungsgrad des Intermediates war sehr hoch, sodass die Stereochemie am Phosphat des CA aufgeklärt werden konnte. Aufgrund der Elektronendichte wurde das Carbamoyl-AMPS (CAS) als *R*-Enantiomer interpretiert. Möglicherweise ist eine stereoselektive Bindung des Intermediates zu beobachten, da der freie Sauerstoff stärker mit dem gebundenen Magnesiumion wechselwirken kann. Zusätzlich konnte eine weitere Elektronendichte aufgedeckt werden, die als das abgespaltene Pyrophosphat interpretiert wurde, jedoch ist die Elektronendichte sehr schwach. Das Auftreten einer Pyrophosphat-Bindestelle könnte durch eine energetisch ungünstige Rückreaktion von *R<sub>p</sub>*-CAS und PP<sub>i</sub> begründet sein.

Die Elektronendichte in der Kae1-ähnlichen Domäne wurde als CAS interpretiert, jedoch war die Dichte deutlich schwächer ausgeprägt. Eine Zuordnung der Stereochemie konnte daher nicht eindeutig erfolgen. Unter Einhaltung der Stereochemie des CAS aus der YrdC-ähnlichen Domäne zeigt der Schwefel des *R<sub>p</sub>*-CAS zum gebundenen Eisen. Diese Wechselwirkung ist aber ausgeschlossen, da Eisenionen nur mit Phosphat-gebundenen Sauerstoffen interagieren (Richter und Fischer, 2003). Jedoch konnte die Dichte in der YrdC-ähnlichen Domäne eindeutig dem *R<sub>p</sub>*-CAS zugeordnet werden, woraufhin TobZ möglicherweise nur das *R<sub>p</sub>*-CAS bilden kann. Dies würde die Bindung eines *S<sub>p</sub>*-CAS in der Kae1-ähnlichen Domäne ausschließen und nur das *R<sub>p</sub>*-CAS zulassen. Andererseits war TobZ in Gegenwart von ATP $\alpha$ S inaktiv, was durch eine ausschließliche Bildung und Bindung von *R<sub>p</sub>*-CAS in beiden Domänen nicht erklärbar wäre. Eine Inhibierung des terminalen Carbamoyltransfers durch die Schwefelmodifikation des CAS kann ebenfalls vernachlässigt

werden, da die Übertragung des reaktiven Teils eines Adenylates in chemisch ähnlichen Reaktionen unabhängig vom AMP-Teil erfolgt (Fischbach und Walsh, 2006; Minajigi und Francklyn, 2008; Shomura und Higuchi, 2012). Vielmehr ist vorstellbar, dass beide Enantiomere des CAS in der YrdC-ähnlichen Domäne gebildet werden können und nur das  $S_p$ -CAS aufgrund der Stereochemie übertragen werden kann. Dadurch würde sich das  $R_p$ -CAS in der YrdC-ähnlichen Domäne akkumulieren, während durch die Blockierung nur eine 50 %-ige Besetzung der Bindestelle der Kae1-ähnlichen Domäne mit  $S_p$ -CAS erfolgen kann. Dies könnte auch die deutlich schwächere Elektronendichte in der Kae1-ähnlichen Domäne für das CAS erklären. Demnach würde eine entgegengesetzte stereoselektive Bindung des CAS in beiden Domänen vorliegen, wodurch die Bildung eines CAS chemisch möglich ist, jedoch zur Arretierung des Enzyms führt, woraufhin mittels DC-Analyse kein Umsatz von Tobramycin zum Produkt Nebramycin 5' detektiert werden kann.

Eine stereoselektive Bindung von ATP $\alpha$ S konnte unter anderem für die Adenylylcyclusase aus *Arthrospira platensis* gezeigt werden (Steebhorn *et al.*, 2005). Dabei ist das Enzym in Gegenwart des  $S_p$ -Enantiomer katalytisch aktiv, während es in Anwesenheit von  $R_p$ -ATP $\alpha$ S inaktiv ist. Zur weiteren Überprüfung der Bindungseigenschaften des ATP $\alpha$ S diente die Variante T<sup>529</sup>A. Diese zeigte keinen detektierbaren Umsatz von Tobramycin, weshalb vermutlich die initiale CP-Hydrolyse blockiert wurde. In der Kristallstruktur der Variante T<sup>529</sup>A im Komplex mit CP und ATP $\alpha$ S konnte die Bindung von ATP $\alpha$ S festgestellt werden. Die Analyse der Stereochemie deutet wahrscheinlich auf eine bevorzugte Bindung des  $R_p$ -ATP $\alpha$ S hin. Als Ursache konnte die Wechselwirkung des  $\alpha$ -Phosphates mit dem Rest R<sup>418</sup> gesehen werden, da dieser wahrscheinlich eine Wasserstoffbrücke zum freien Sauerstoff am  $\alpha$ -Phosphat ausbildet. Dies würde die Annahme verstärken, dass TobZ nur das  $R_p$ -CAS in der YrdC-ähnlichen Domäne bilden kann, da Enzyme Reaktionen meist unter Einhaltung der Stereochemie katalysieren. Jedoch fehlt nach erfolgreicher Hydrolyse des CP eine feste Koordinierungsstelle für das Metallion woraufhin wahrscheinlich die Position des ATP nicht mehr fixiert ist. Zum anderen kann auf Grundlage der Ergebnisse mittels <sup>18</sup>O-CP auf ein freies Rotieren des Carbamates in der Domäne geschlossen werden, wodurch möglicherweise auch in Folge einer bevorzugten Bindung eines Stereoisomeres ein racemisches Intermediat gebildet werden kann (Abbildung 81, S. 127). Diese Annahme könnte analog für  $S_p$ -ATP $\alpha$ S zutreffen, wodurch TobZ mit keinem der beiden Enantiomere von ATP $\alpha$ S eine Carbamoylierung von Tobramycin katalysieren sollte.

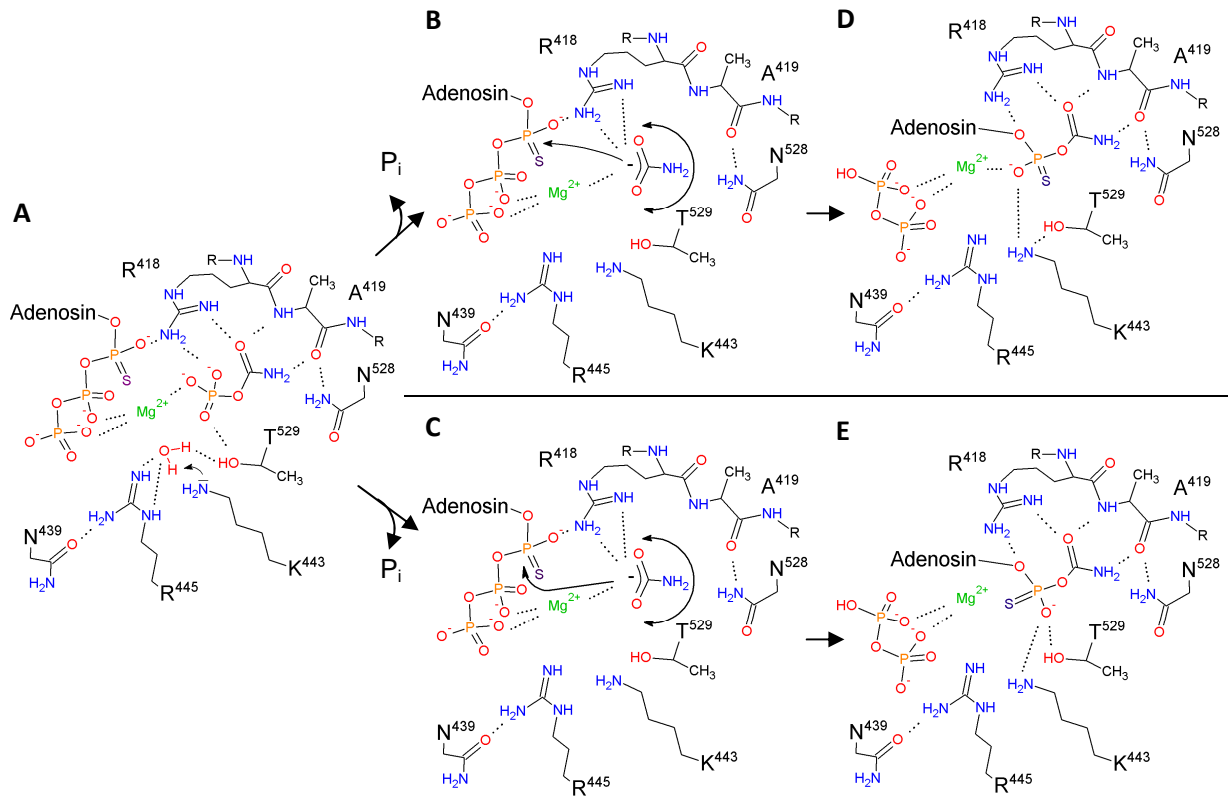


Abbildung 81: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus für die CAS-Bildung in der YrdC-ähnlichen Domäne von TobZ

A) Das aktive Zentrum der YrdC-ähnlichen Domäne von TobZ in Anwesenheit der Substrate CP und  $R_p$ -ATPαS B,C) Das verbliebene Carbamat-Anion rotiert frei in der CP-Bindetasche und greift den α-Phosphor des ATPαS von unterschiedlichen Seiten an D,E) Daraus ergibt sich möglicherweise ein racemisches Gemisch von  $R_p$ -CAS (D) und  $S_p$ -CAS (E).

Zur vollständigen Beschreibung des gesamten Mechanismus zählt auch die Übertragung der Carbamoylgruppe des CA auf die 6''-OH-Gruppe des Akzeptors. Die Aminosäuren H<sup>14</sup> und D<sup>15</sup> ändern ihre Konformation in Abhängigkeit der Nukleotidbindung in der N-terminalen Domäne und sind hochkonserviert (Anhang 1, S. 160). Daher wurde die Variante H<sup>14</sup>N generiert, um die Übertragung der Carbamoylgruppe zu blockieren. Die Analyse der Aktivität mittels DC zeigte vernachlässigbaren Tobramycin-Umsatz. Vermutlich abstrahiert die Seitenkette von H<sup>14</sup> ein Proton von der 6''-OH-Gruppe, woraufhin diese den Carbonyl-Kohlenstoff des CA nukleophil angreifen kann (Abbildung 82 C, S. 128). Die Variante H<sup>14</sup>N ist vermutlich nicht in der Lage, die Deprotonierung der 6''-OH-Gruppe zu katalysieren, woraufhin die Reaktion stark verlangsamt abläuft. Möglicherweise eignet sich die Variante, um den Zustand vor dem Carbamoyltransfer auf den Akzeptor darzustellen, um den vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus zu überprüfen (Abbildung 82 C, S. 128).

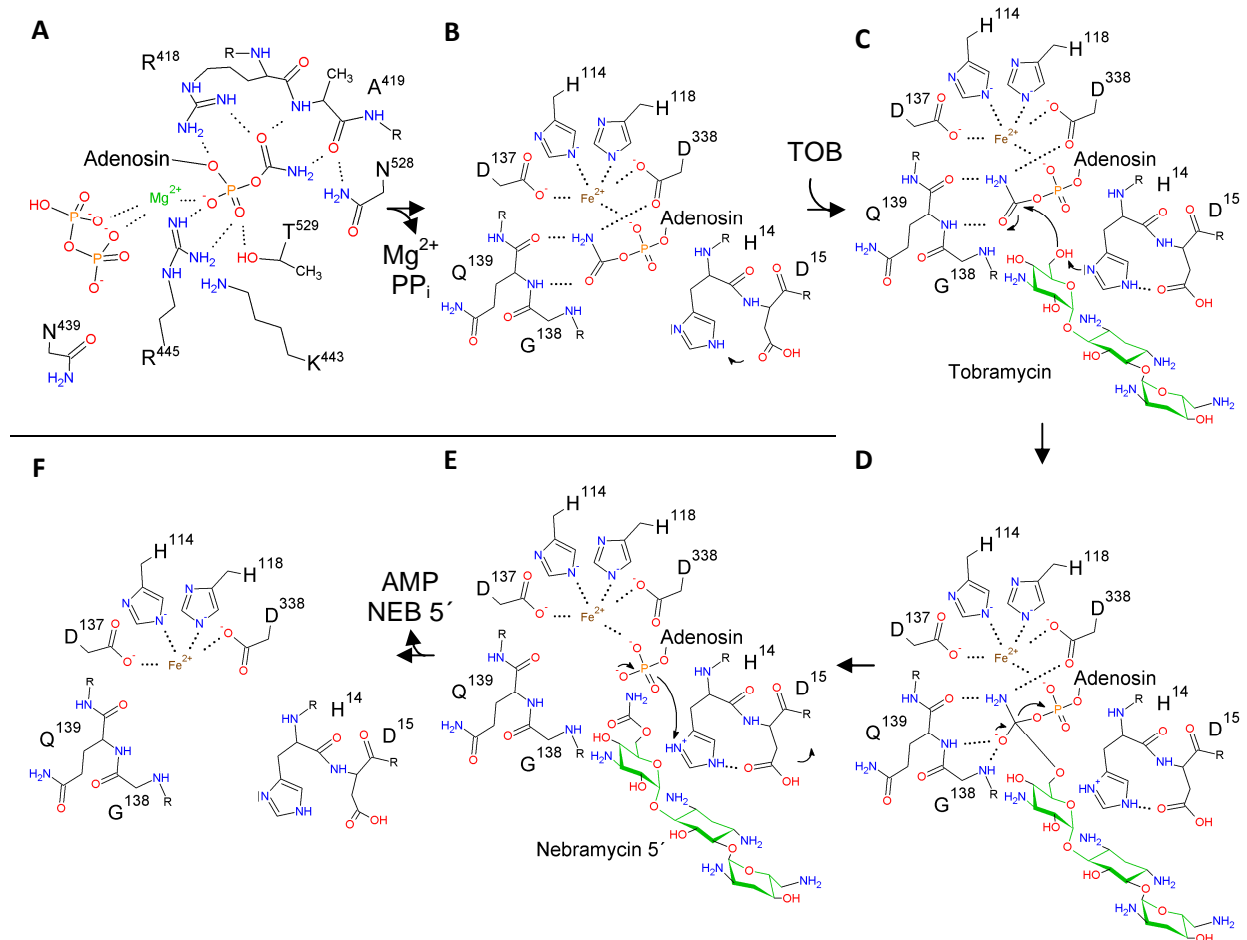


Abbildung 82: Vorgeschlagerener detaillierter Reaktionsmechanismus zum Carbamoyltransfer in der Kae1-ähnlichen Domäne von TobZ

A) Bindung des CA in der YrdC-ähnlichen Domäne von TobZ. B) Entlassung von Mg•PPi aus dem aktiven Zentrum und (passiver) Transfer des CA in das aktive Zentrum der Kae1-ähnlichen Domäne von TobZ. Ausbildung der katalytischen Diade H<sup>14</sup>-D<sup>15</sup>. C) Anschließend kann Tobramycin binden, wobei die 6'-OH-Gruppe durch H<sup>14</sup> deprotoniert wird, wodurch anschließend der nukleophile Angriff auf das Carbonyl-C-Atom des CA erfolgt. D) Postulierter Übergangszustand des Carbamoyltransfers auf das Tobramycin. E) Rückbildung der katalytischen Diade und Entlassung von Nebramycin 5' und AMP aus dem aktiven Zentrum. F) Ligandenfreie Kae1-ähnliche Domäne von TobZ.

Um eine stetige CA-Bildung zu vermeiden, die womöglich die Tobramycin-Bindung negativ beeinflusst, wurde ATPaS eingesetzt, wodurch vermutlich eine Arretierung der Übertragung des R<sub>p</sub>-Carbamoyl-AMPS zwischen den Domänen bewirkt wird und dadurch zum Aktivitätsverlust des Enzyms führt. Die Elektronendichte in der Kristallstruktur in Anwesenheit von CP, ATPaS und Tobramycin deutet auf das Vorhandensein des Produktes AMPS in der Kae1-ähnlichen Domäne hin, was auf eine Übertragung der Carbamoylgruppe zur Produktbildung von Nebramycin 5' schließen lässt. Die Anwesenheit katalytischer Reste zur Übertragung des reaktiven Teils des Adenylates auf einen Akzeptor ist zum Beispiel für die Familie der Acyl-CoA Synthetasen sowie für die S-CTase HypF nicht beschrieben (Gulick, 2009; Shomura und Higuchi, 2012). Neben dem Produkt AMPS konnte ebenfalls die Bindung von Tobramycin beobachtet werden, welches wahrscheinlich das Produkt Nebramycin 5' aus dem aktiven Zentrum verdrängte. Somit konnte lediglich ein gemischter Zustand aus dem Produkt AMPS und dem Substrat Tobramycin festgestellt werden.

In der Kristallstruktur von TobZ im Komplex mit CAS konnte in der YrdC-ähnlichen Domäne eine weitere Elektronendichte beobachtet werden, die sich außerhalb des aktiven Zentrums befindet. Diese wurde als ATP $\alpha$ S interpretiert, obwohl keine durchgängige Dichte vorhanden war. Dabei wird ein komplexes Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen ersichtlich. Die Analyse der Stereochemie deutet auf das  $R_p$ -ATP $\alpha$ S hin, da eine ionische Wechselwirkung des nicht-Brücken-Sauerstoffes am  $\alpha$ -Phosphat mit der Seitenkette von K<sup>320</sup> energetisch bevorzugt sein sollte. Eine Konservierung der Reste K<sup>320</sup> und K<sup>478</sup> liegt in Form des basischen Charakters der endständigen funktionellen Gruppe, sowie der hydrophoben Eigenschaft der Methylengruppen vor (Austausch gegen R bzw. Q, Vgl. Anhang 1, S. 160). Die YrdC-ähnliche Domäne besitzt somit eine starke Präferenz für die  $R$ -Konfiguration am Thiophosphat, während die Kae1-ähnliche Domäne vermutlich das  $S$ -Enantiomer des CAS bevorzugt bindet.

### 5.1.3 Verwandtschaft von TobZ zur $S$ -CTase HypF und t<sup>6</sup>A<sub>37</sub>-tRNA-Modifizierung

Neben der Verwandtschaft von TobZ zu den Enzymen der CmcH/NodU-Proteinfamilie besteht durch den modularen Domänenaufbau auch eine Verwandtschaft zur  $S$ -CTase HypF. Die Struktur für das Enzym konnte zum einen für eine verkürzte Variante aus *E. coli* sowie das volllängen Enzym aus *Caldanaerobacter subterraneus* gelöst werden (*E. coli* HypF PDB: 3TSP (Petkun *et al.*, 2011); *C. subterraneus* HypF PDB: 3VTH (Shomura und Higuchi, 2012)). Zusätzlich zum umgekehrten modularen Aufbau der YrdC- und Kae1-ähnlichen Domäne, besitzt HypF  $N$ -terminal eine Acyl-Phosphatase Domäne, die über eine Zink-Finger-ähnliche Domäne an die YrdC-ähnliche Domäne angeschlossen ist.  $C$ -Terminal zur Letzteren befindet sich die Kae1-ähnliche Domäne, wobei durch die Komplexstruktur aus HypF-HypE gezeigt werden konnte, dass der terminale Akzeptor HypE an die Kae1-ähnliche Domäne bindet (PDB: 3VTI; (Shomura und Higuchi, 2012)). Zudem ist das HxxxH-Motiv, welches für die Metallbindung in der Kae1-ähnliche verantwortlich ist, ebenso konserviert, wie das KxR-Motiv der YrdC-ähnlichen Domäne (Anhang 1, S. 160). Demnach scheint in beiden Enzymklassen die Kae1-ähnliche Domäne für die Bindung des terminalen Akzeptors verantwortlich zu sein, während in der YrdC-ähnlichen Domäne das Carbamoyl-Adenylat gebildet wird.

HypF katalysiert ebenfalls eine ATP-abhängige Carbamoylierung (Paschos *et al.*, 2002). Die Analyse der Carbamoylierungsreaktion mit dem terminalen Akzeptor HypE unter Nutzung von radioaktiv markiertem <sup>14</sup>C-CP deutet auf die Bildung eines carbamoylierten AMP-

Moleküls (CA) hin, wie es für TobZ röntgenkristallographisch gezeigt werden konnte (Reissmann *et al.*, 2003). Zudem ist die S-CTase ebenfalls in der Lage, radioaktiv-markiertes  $^{32}\text{P}\text{-PP}_i$  zur Bildung von  $^{32}\text{P}\text{-ATP}$  zu nutzen (Paschos *et al.*, 2002). Für das Enzym wurde ein ähnlicher Mechanismus diskutiert, wobei eine CP-Hydrolyse zu Phosphat und Carbamat gezeigt werden konnte (Paschos *et al.*, 2002; Reissmann *et al.*, 2003). Jedoch wird diese Aktivität der Acylphosphatase-Domäne von HypF zugesprochen, da Sequenzvergleiche mit verwandten Enzymen und strukturelle Vergleiche aufgrund der gelösten Kristallstruktur der isolierten Acylphosphatase Domäne von HypF aus *E. coli* auf eine derartige Aktivität hindeuten (Rosano *et al.*, 2002). Die Mutation eines konservierten Restes (R<sup>23</sup>) in dieser Domäne führte zum nahezu vollständigen Verlust der Acylphosphatase-Aktivität (Blokesch *et al.*, 2004).

In der gelösten Kristallstruktur von HypF aus *Caldanaerobacter subterraneus* sowie der gelösten Kristallstruktur eines verkürzten HypF Enzyms aus *E. coli* ist ein molekularer Tunnel in der YrdC-ähnlichen Domäne von HypF zu erkennen, in dem möglicherweise das Carbamat-Anion von der Acylphosphatase Domäne zum aktiven Zentrum in der YrdC-ähnlichen Domäne transportiert wird, wo wahrscheinlich ebenfalls eine CA-Bildung und Pyrophosphat-Abspaltung mit dem zweiten Substrat ATP erfolgt (Petkun *et al.*, 2011; Shomura und Higuchi, 2012). Von Petkun *et al.* (2011) wurde eine Struktur eines verkürzten HypF-Enzyms ohne die N-terminale Acylphosphatase-Domäne aus *E. coli* publiziert, in der eine vorhandene Elektronendichte als eine Carbamoyl-AMP interpretiert wurde. Die Reevaluation der Elektronendichte deutet jedoch auf eine Bindung von AMP und zwei Wassermolekülen hin. Zudem konnte gezeigt werden, dass ohne die Acylphosphatase Domäne eine *in vivo*-Reifung der Hydrogenasen nicht erfolgen kann (Paschos *et al.*, 2002). Des Weiteren wurde als Ergebnis des *soaking*-Experimentes von CP und dem ATP-Analogon AMPPNP keine entsprechende Dichte für ein CA beobachtet, obwohl eine CA-Bildung mit diesem Analogon theoretisch möglich wäre (Petkun *et al.*, 2011; Reissmann *et al.*, 2003). Obwohl der modulare Domänenaufbau der O- und S-CTasen umgekehrt ist, entwickelten sich möglicherweise beiden Enzym-Familien aus gemeinsamen evolutiven Vorläufern, wobei die O-CTase vermutlich die evolutiv jüngere Enzym-Familie darstellt, da anscheinend die Aktivität der Acylphosphatase-Domäne in die YrdC-ähnliche Domäne der O-CTasen integriert wurde.

Als Vorläuferproteine könnten die individuellen Proteine YrdC/Sua5 und Kae1 gesehen werden, die in allen drei Domänen des Lebens vorkommen und daher hochkonserviert sind. Strukturelle Vergleiche zeigen ebenfalls eine Konservierung des HxxxH-Motives im Kae1-Protein, welches an der Metallbindung beteiligt ist. Zudem existiert auch das

KxR-Motiv im YrdC-Protein (Anhang 1, S. 160). In *E. coli* wird zum Beispiel unter Beteiligung der Enzyme YrdC, YgjD (Kae1), YeaZ und YjeE das  $N^6$  der Adeninbase 37 einer tRNA mit der spezifischen Anticodonsequenz NNU mit einer Threonylcarbonyl-Gruppe modifiziert, welche essentiell für die korrekte Basenpaarung zwischen ANN-Codon und NNU-Anticodon ist (Deutsch *et al.*, 2012; Murphy *et al.*, 2004; Urbonavicius *et al.*, 2001). Im ersten Schritt der Biosynthese katalysiert die Enzymfamilie Sua5/YrdC aus den Substraten Threonin,  $\text{CO}_2$  und ATP die Herstellung eines Threonylcarbamoyl-AMP (TCA)-Intermediates, welches dann auf das Kae1-Protein übertragen wird. Im Zusammenspiel mit weiteren Proteinen, die sich zwischen den drei Domänen des Lebens unterscheiden, wird die Threonylcarbamoyl-Gruppe auf das  $N^6$  der Adeninbase 37 einer tRNA mit dem spezifischen Anticodon NNU übertragen (Deutsch *et al.*, 2012; Lauhon, 2012; Perrochia *et al.*, 2013). Ungeachtet der Threonylgruppe besteht eine starke strukturelle Ähnlichkeit der Intermediate zwischen O- und S-CTasen und der  $t^6A_{37}$ -tRNA-Biosynthese. Unerwarteterweise konnte das postulierte TCA-Zwischenprodukt in einer bereits publizierten Kristallstruktur des Proteins Sua5 aus *Sulfolobus tokodaii* aufgedeckt werden (PDB: 4E1B (Parthier *et al.*, 2012)). Möglicherweise liegt der  $t^6A_{37}$ -tRNA-Biosynthese eine ähnliche Adenylierungsreaktion entsprechend dem TobZ zu Grunde, da unter Einbezug der konservierten Faltung eine evolutive Verwandtschaft zwischen den Enzymen der O- und S-CTasen und der  $t^6A_{37}$ -tRNA-Modifizierung vermutet werden kann.

#### 5.1.4 Substratspezifität von TobZ in Bezug auf den terminalen Akzeptor

Neben der detaillierten Analyse des Reaktionsmechanismus wurde die Substratspezifität von TobZ in Bezug auf die Bindung und Umsetzung terminaler Akzeptoren untersucht. Durch die intensive medizinische Anwendung von Aminoglykosid-Antibiotika entwickelten sich Resistenzen vorher sensibler Stämme (Sharp *et al.*, 1974; Umezawa, 1974). Die Vermittlung der Resistenz beruht hauptsächlich auf der Expression von AGA-modifizierenden Enzymen (AME) der pathogenen Organismen, welche Acetyl-CoA bzw. ATP-abhängig sind (Becker und Cooper, 2013; Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999). Die Entwicklung geeigneter Inhibitoren gestaltet sich aufgrund der Vielzahl von AME als schwierig, weshalb nur wenige relevante Wirkstoffe erforscht wurden (Fong und Berghuis, 2002; Shakya *et al.*, 2011; Stogios *et al.*, 2013). Daher wurde seit Mitte des vergangenen Jahrhunderts verstärkt an der Modifizierung der bereits bekannten AGA geforscht, wodurch eine Reihe von halbsynthetischen AGA entwickelt wurden, die bis heute medizinische Anwendung finden (Matsumoto, 2014). Dazu



gehören AGA, wie z. B. das Dibekacin oder das Gentamicin-Derivat Isepamicin (Miyake *et al.*, 1976; Neu und Fu, 1978). Des Weiteren wurden die halbsynthetischen AGA weiter modifiziert, voraus z. B. das Dibekacin-Derivat Arbekacin hergestellt wurde (KONDO *et al.*, 1973a). Die halbsynthetischen AGA zeichnen sich durch eine höhere Wirksamkeit, bei geringer Dosis aus (Matsumoto, 2014).

Zur Untersuchung der Substratspezifität von TobZ wurden neben den bereits bekannten Akzeptoren Tobramycin und Kanamycin B weitere verwandte AGA analysiert. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass TobZ in der Lage ist, das Antibiotikum Kanamycin A zu carbamoylieren, welche von dem Produzenten *S. kanamyceticus* gebildet wird (Clausnitzer, 2010). In dieser Arbeit wurden das semisynthetische AGA Dibekacin sowie das strukturell weiter entfernte Geneticin (G418) als mögliche Akzeptoren untersucht. Für G418 konnte kein Umsatz festgestellt werden, da eine entsprechende 6''-OH-Gruppe nicht vorhanden ist. Nichtsdestotrotz stellen Kanamycin A und Dibekacin nicht-natürliche terminale Akzeptoren für TobZ dar, woraus das bereits beschriebene AGA 6''-O-carbamoyl-Kanamycin A und das neue AGA 6''-O-carbamoyl-Dibekacin hervorgehen (Clausnitzer, 2010). Da nur ein 50 %-iger Umsatz detektiert werden konnte, wurde der zusätzliche Einsatz einer Pyrophosphatase auf den Umsatz untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Zusatz einer  $PP_i$ -ase zu einer verstärkten Produktbildung führt, die für das halbsynthetische Dibekacin in einen vollständigen Umsatz zum Produkt mündete. Der Effekt ist wahrscheinlich auf die Spaltung von  $PP_i$  zurückzuführen, wodurch das Gleichgewicht in Richtung CA-Intermediat verschoben wird. Zur weiteren Charakterisierung der Akzeptoren wurden ITC-Messungen zur Bestimmung der Affinität zum Enzym TobZ durchgeführt. Dabei konnte für die Bindung von Dibekacin eine zum natürlichen Akzeptor Tobramycin vergleichbare Bindungskonstante erhalten werden. Interessanterweise wies dagegen das nicht-umgesetzte G418 eine um das dreifach stärkere Affinität ( $K_D \approx 4,5 \mu\text{M}$ ) zu TobZ auf. Um die chemische Ursache dieser Gegebenheit aufzudecken, wurden Kristallstrukturen von TobZ im Komplex mit den Antibiotika Dibekacin bzw. G418 gelöst. Die Analyse der Bindungseigenschaften der AGA offenbarte vergleichbare Interaktionen. G418 besetzt mit der Methylaminogruppe am C3'' eine hydrophobe Tasche im aktiven Zentrum von TobZ. Hingegen weisen Dibekacin, als auch Tobramycin, eine (geladene) Aminogruppe an der entsprechenden Position auf, weshalb die Bindung in der hydrophoben Tasche energetisch ungünstig ist. Des Weiteren bildet G418 mit der 4'-OH-Gruppe und der 6'-OH-Gruppe Wasserstoffbrückenbindungen zu den Resten Y<sup>230</sup> bzw. E<sup>234</sup> aus, welche für die Tobramycin/Dibekacin-Bindung nicht beobachtet werden konnten. Beide Besonderheiten könnten zur erhöhten Affinität gegenüber den strukturell verwandten AGA beitragen. Dafür spricht ebenfalls die Tatsache, dass die Bindung von G418 nur minimale Veränderungen in Bezug auf die Bindungsentropie aufweist, währenddessen eine fast 2,5-fach höhere Bindungsenthalpie ermittelt wurde. Die chemische

Einführung einer 6''-OH-Gruppe könnte eine Carbamoylierungsreaktion von TobZ ermöglichen, wodurch das Substratspektrum von TobZ stark erweitert werden könnte. Die Herstellung sowie die weiterführende Carbamoylierung könnten sich zum Beispiel positiv auf die Bindung von G418 zur bakteriellen 16S rRNA auswirken, da zum einen der erforderliche Raum für die Gruppe vorhanden ist und weiterhin eine mögliche Interaktion der Carbamoylgruppe mit dem Phosphatrückgrat der rRNA ausgebildet werden kann, die ähnlich der 1-*n*-(S)-HABA-Modifizierung von Amikacin zu einer verstärkten Bindung an die bakterielle 16S rRNA führen kann (Abbildung 83, S. 133) (Kondo *et al.*, 2006).

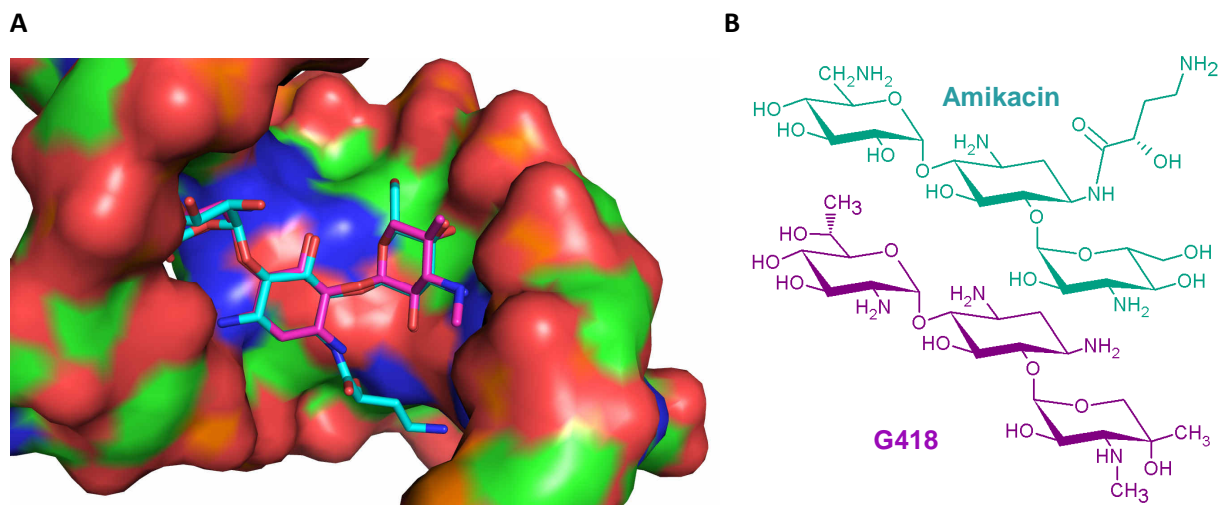
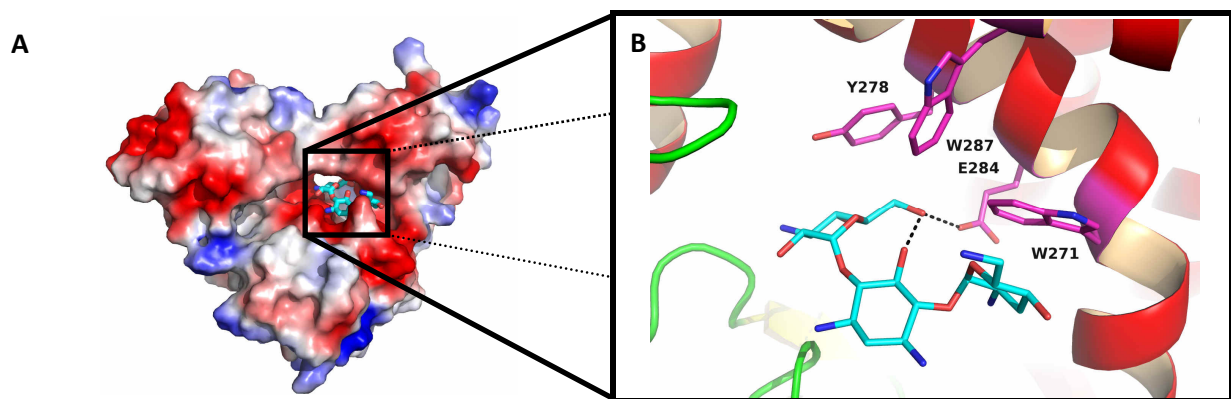


Abbildung 83: Bindung von G418 und Amikacin im Decodierungszentrum der bakteriellen 16S-rRNA

A) Oberflächendarstellung des Decodierungszentrums der bakteriellen 16S-rRNA. Die Farben der Oberfläche repräsentieren das in der Nähe befindliche Atom, wobei Sauerstoff rot, Stickstoff blau, Kohlenstoff grün und Phosphor orange dargestellt ist. Zusätzlich sind die Liganden G418 und Amikacin gezeigt. Nicht-C-Atome sind mit den üblichen Farben versehen, wobei die C-Atome von G418 violett und die C-Atome des Amikacins türkis eingefärbt sind. B) Chemische Strukturen der AGA Amikacin und G418. Die Abbildung wurde aus einer Überlagerung der zweier Strukturen erzeugt: PDB G418: 1MWL (Vicens und Westhof, 2003); PDB Amikacin: 4P20 (Kondo *et al.*, 2006).

Neben der Analyse der *in vitro* Aktivität von TobZ in Bezug auf die verwendeten AGA, wurde untersucht, ob die carbamoylierten Produkte *in vivo* antibiotisch aktiv sind. Obwohl der biologische Effekt der Carbamoylierung nicht hinreichend bekannt ist, deuten bisherige veröffentlichte Ergebnisse auf einen geringen Beitrag in Bezug auf die MIC (*minimal inhibitory concentration*) hin (Kondo *et al.*, 1977; Yu *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2011; Fair *et al.*, 2014). Es konnte mittels Bioautographie gezeigt werden, dass sowohl die unmodifizierten, als auch die carbamoylierten Antibiotika auf den gramnegativen Stamm *E. coli* antibiotisch aktiv sind (Reusser, 1967). Ein zusätzlicher Effekt der Carbamoylierung in Bezug auf die Größe der Hemmhöfe und damit auf die antibiotische Wirkung konnte nicht gesehen werden. Ein weiterer Ansatz könnte die Blockierung von AGA-modifizierenden Enzymen darstellen, wodurch, wie am Beispiel von Amikacin gezeigt, eine theoretisch mögliche Inaktivierung aufgrund einer Modifikation nicht erfolgt und somit die antibiotische Wirkung erhalten bleibt (KONDO *et al.*, 1973b). Um diesen Ansatz zu überprüfen, wurde der Stamm *E. coli* mit einem Plasmid transformiert, welcher das Gen für eine APH(3') trägt. Dadurch kann eine

Resistenz gegenüber Kanamycin A und B, jedoch nicht gegenüber Tobramycin und Dibekacin (aufgrund der Abwesenheit der 3'-OH-Gruppe) vermittelt werden kann (Hashimoto-Gotoh *et al.*, 1995). Die Hemmhöfe des Bioautogramms waren deutlich schwächer ausgeprägt, jedoch kann eine Inhibierung der Inaktivierungsreaktion aufgrund der Carbamoylierung ausgeschlossen werden (Abbildung 58, S. 95). Die deutlich schwächeren Hemmhöfe könnten vermutlich in einer Nebenaktivität der APH(3') begründet sein, wodurch alle AGA schwach modifiziert werden und deshalb schwächere Hemmhöfe sichtbar sind. Jedoch wurde eine Nebenaktivität bisher nur im Fall vom 4,5-disubstituierten AGA Lividomycin A festgestellt, bei der die APH(3') auch als APH(5'') wirken kann (Kondo *et al.*, 1972). Möglicherweise wirkt die Carbamoylierung nicht gegen Enzyme der APH(3')-Familie, sondern kann eine Resistenz gegen APH(2'')-Enzyme vermitteln. Die Kristallstruktur einer APH(2'') aus *Enterococcus casseliflavus* im Komplex mit Tobramycin deckte dabei ein *H*-Brückennetzwerk ausgehend von der Hydroxygruppe am C5 des 2-DOS, über die freie 6''-OH-Gruppe zur Seitenkette von E<sup>284</sup> auf (Abbildung 84, S. 134) (Shi *et al.*, 2011). Eine Carbamoylierung der 6''-OH-Gruppe sollte demnach nicht nur das *H*-Brückennetzwerk stören, sondern ferner durch sterische Abstoßungsreaktionen die Bindung der carbamoylierten Antibiotika an die APH(2'') blockieren. Die Überprüfung dieses Ansatzes ist in weiterführenden Arbeiten aufgrund der bereits gezeigten löslichen Expression der APH(2'') in *E. coli* durchführbar (Shi *et al.*, 2011).



**Abbildung 84: Bindung von Tobramycin im aktiven Zentrum einer APH(2'')**

A) Elektrostatische Ladungsverteilung auf der Oberfläche einer APH(2''). Tobramycin ist in *stick*-Darstellung gezeigt, wobei Nicht-C-Atome mit den üblichen Farben versehen und die C-Atome türkis eingefärbt sind. B) Zoom in das aktive Zentrum der APH(2'') und Cartoondarstellung des Enzyms. Dabei sind die  $\alpha$ -Helices rot, die Schleifen grün und die C-Atome der Aminosäuren violett dargestellt. Wasserstoffbrückenbindungen (Abstand: 2,2 - 3,5 Å) sind in schwarz gefärbt. PDB: 3SG8 (Shi *et al.*, 2011)

## 5.2 Das Enzym Mj1051 aus *M. jannaschii*

Von den drei Klassen der Carbamoyltransferasen scheint eine Verwandtschaft der O- und S-CTase aufgrund des modularen Domänenaufbaus mit der YrdC-ähnlichen und der Kae1-ähnlichen Domäne zu bestehen, jedoch besteht ein Unterschied in der umkehrten Reihenfolge des Domänenaufbaus. Vermutlich aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit katalysieren die O- und S-CTasen ähnlichen Reaktionen, die, wie im vorherigen Abschnitt erläutert, eine Carbamoylphosphat-Hydrolyse, gefolgt von einer Adenylierungsreaktion beinhalten. Abgeschlossen wird die Katalyse durch den Transfer der Carbamoylgruppe auf den jeweiligen Akzeptor. Zudem sind die beiden Klassen hauptsächlich in Prokaryoten vertreten, währenddessen in Eukaryoten nur wenige Vertreter beider Familien gefunden wurden. Um eine evolutive Verwandtschaft zwischen den O- und S-CTasen sowie der t<sup>6</sup>A<sub>37</sub>-tRNA-Biosynthese zu untermauern, eignen sich Genomanalysen von Organismen, die in der Gruppe der Archaeen zusammengefasst sind. Diese besitzen im Hinblick auf den polycistronischen Transkriptionsapparat gemeinsame Eigenschaften zu den Prokaryoten als auch mit Blick auf die DNA-Replikationsapparat Homologien zu den Eukaryoten (Gribaldo und Brochier-Armanet, 2006).

Der hyperthermophile Organismus *M. jannaschii* ist dabei das am besten charakterisierte Archaeon, da die Proteine, die von diesem Lebewesen stammen, aufgrund der hohen natürlichen Umgebungstemperatur bessere Eigenschaften in Bezug auf die lösliche Expression und die Proteinestabilität im Vergleich zu ihren mesophilen Verwandten besitzen (Yokota *et al.*, 2006). Die Analyse des Genoms des methanogenen Archaeon *M. jannaschii* deutet auf das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen O-CTasen hin (Bult *et al.*, 1996). Die Gene der Proteine Mj1051 und Mj1058 befinden sich in Nachbarschaft, wobei möglicherweise keine Co-Expression zugrunde liegt (Taboada *et al.*, 2012). Bisher sind keine Hinweise oder Informationen über die biologische Funktion beider Proteine vorhanden, woraufhin eine O-Carbamoylierung nur vermutet werden kann, weshalb Mj1051 als putative O-CTasen beschrieben wird. In der Aminosäuresequenz von Mj1051 sind zwei konservierte Motive abwesend, die höchstwahrscheinlich an der CP-Hydrolyse in der C-terminalen Domäne und an der Übertragung der Carbamoylgruppe in der Kae1-ähnlichen Domäne beteiligt sind. Auffälligerweise sind für Mj1058 alle konservierten Motive der O-CTasen präsent. Die Expression von Mj1051 in *E. coli* konnte erfolgreich bei 37 °C durchgeführt werden, wobei lösliches Protein erhalten wurde. Bei der Reinigung mittels IMAC wurden Nukleinsäuren Co-gereinigt, die anschließend als RNA identifiziert werden konnten. Eine Co-Reinigung von RNA wurde für RNA-modifizierende Enzyme beobachtet (Auxilien *et al.*, 2007; Goto-Ito *et al.*, 2008). Die nahezu vollständige Abtrennung der RNA gelang durch die

Verdünnung der Probe und anschließender wiederholter immobilisierter Metallchelate-Affinitätschromatographie, was eine Vereinfachung der Reinigungsbedingung zu den bisher publizierten Methoden darstellt.

Die Aktivität des Enzyms wurde mittels *rp*-HPLC nachgewiesen, wobei ein Umsatz von ATP und zu AMP festgestellt werden konnte, der in einem ähnlichen Zeitfenster verglichen mit TobZ stattgefunden hat. Es wurde eine katalytische Geschwindigkeit von  $3,8 \text{ min}^{-1}$  berechnet. Der Wert ist vergleichbar mit der Aktivität von TobZ, die in Abwesenheit von Tobramycin bestimmt wurde. Dabei weist TobZ einen um ca. die Hälfte geringeren  $k_{cat}$ -Wert von  $1,8 \text{ min}^{-1}$  im Vergleich zu Mj1051 auf. Ein möglicher Grund könnte in den deutlich verschiedenen Temperaturen während der Aktivitätsmessungen liegen. Mj1051 besitzt eine CP-abhängige Enzymaktivität ähnlich dem TobZ, jedoch konnte eine vollständige Charakterisierung nicht durchgeführt werden, da der terminale Akzeptor von Mj1051 unbekannt ist. Durch Zugabe des natürlichen Akzeptors könnte die Aktivität wahrscheinlich noch gesteigert werden, vorausgesetzt, der letzte Schritt ist ebenfalls geschwindigkeitsbestimmend. Im Unterschied zu TobZ wurde für Mj1051 eine ATPase-Aktivität nachgewiesen, da das Enzym auch in Abwesenheit von CP eine ATP-Hydrolyse katalysieren kann, wobei als Produkt ADP entsteht. Eine ATPase-Aktivität konnte ebenfalls für die S-CTase HypF, sowie bei den Kae1-Proteinen der  $t^6A_{37}$ -Biosynthese beobachtet werden (Vgl. Abbildung 25 A, S. 63 und Abbildung 68 C, S. 104) (Deutsch *et al.*, 2012; Paschos *et al.*, 2002).

Zur Strukturbestimmung von Mj1051 konnten zwei unterschiedliche Kristallisationsbedingungen gefunden werden, welche streuende Kristalle enthielten. Wie auch für TobZ wurden die Phasen mittels Schweratom-Phasierung gelöst. Dazu wurde Selenomethionin markiertes Mj1051 hergestellt, wodurch die Methode des MAD angewendet werden konnte (Hendrickson *et al.*, 1988). Die gelöste Struktur von Mj1051 offenbarte eine identische Faltung der YrdC-ähnlichen Domäne, wobei die Position des konservierten Lysinrestes (TobZ K<sup>443</sup>) durch ein Leucin ersetzt ist (Vgl. Abbildung 74 C, S. 111). Die elektrostatische Oberfläche von Mj1051 enthält positiv geladene Bereiche, welche ein saures "Tal" flankieren. Da für TobZ und Mj1051 mittels analytischer Ultrazentrifugation ein Dimer als oligomerer Zustand festgestellt wurde und für beide Enzyme die Kristallstrukturen gelöst werden konnten, wurde die Anordnung der Symmetrie-verwandten Moleküle der asymmetrischen Einheit untersucht, wobei festgestellt werden konnte, dass ein Dimer möglicherweise auf unterschiedlichen Wegen gebildet wird. Während für TobZ vermutlich eine *head-to-head*-Anordnung vorliegt, deutet eine mögliche Dimer-Interaktion für Mj1051 auf einen *side-to-side*-Aufbau hin, der ausschließlich durch die Kae1-ähnliche Domäne vermittelt wird

(Abbildung 72, S. 108). Für die O-CTase NovN konnte ebenfalls ein Dimer als biologisch präsenste Form festgestellt werden (Gomez, I *et al.*, 2008).

Neben der biochemischen Charakterisierung und der Strukturlösung wurden *soaking*-Experimente in Anwesenheit von CP und ADP bzw. ATP durchgeführt, um Informationen über die Substratbindung von Mj1051 zu erhalten, wodurch Vergleiche mit TobZ möglich sind. Die Bindung von CP und ADP in der YrdC-ähnlichen Domäne unterscheidet sich kaum von TobZ. In der Kae1-ähnlichen Domäne konnte eine vermutliche erweiterte katalytische Diade aus H<sup>9</sup>, N<sup>10</sup> und N<sup>35</sup> aufgedeckt werden, die der katalytischen Diade von TobZ entspricht (H<sup>14</sup> und D<sup>15</sup>). Dies kann möglicherweise eine Anpassung an den unbekanntes Akzeptor darstellen. Durch die Erweiterung des H-Brückennetzwerkes könnte die Konformation des Restes (Mj1051) H<sup>9</sup> stabilisiert werden, wodurch die vermutliche Abstrahierung eines Protons vom Akzeptor weiterhin katalysiert werden kann. Der Einsatz von CP und ATP resultierte in der Bildung des Carbamoyl-AMP, wie es bereits für TobZ beobachtet wurde. Jedoch konnte die entsprechende Elektronendichte für das Intermediat nur in der Kae1-ähnlichen Domäne aufgedeckt werden. In der YrdC-ähnlichen Domäne sind CP und ATP gebunden, wodurch die Verteilung der gebundenen Liganden der Kristallstruktur von TobZ K<sup>443</sup>A sehr ähnelt. Daher ist vermutlich durch den Austausch von (TobZ) K<sup>443</sup> zu (Mj1051) L<sup>380</sup> der geschwindigkeitsbestimmende Schritt zur CP-Hydrolyse übergegangen, was ebenfalls für die TobZ-Variante K<sup>443</sup>A vermutet wurde. Daher sollte sich die katalytische Geschwindigkeit auch in Anwesenheit des bisher unbekanntes Akzeptors nicht erhöhen. Im Gegensatz zu TobZ führt der Einsatz einer PP<sub>i</sub>-ase nicht zu einer Erhöhung des Umsatzes. Aufschluss darüber könnten PP<sub>i</sub>-Austauschexperimente ähnlich dem TobZ liefern. Ein Grund für den Austausch von (TobZ) K<sup>443</sup> zu (Mj1051) L<sup>380</sup> könnte durch die extremen Umgebungstemperaturen begründet sein, wodurch die verringerte Aktivität wiederum auf ein physiologisches Maß gesteigert werden könnte. Diese Annahme wird durch die ähnlichen katalytischen Geschwindigkeitskonstanten von Mj1051 und TobZ untermauert.

Die CA-Bildung scheint auf Grundlage der gelösten Kristallstrukturen von Mj1051 ähnlich des postulierten Mechanismus für TobZ abzulaufen. Der Einfluss des gebundenen zweiten Metallions in der YrdC-ähnlichen Domäne konnte nicht geklärt werden (Vgl. Abbildung 74 A und C, S. 111). Auffällig ist, dass sich das Ion an der vergleichbaren Stelle der ε-Aminogruppe von (TobZ) K<sup>443</sup> befindet. Möglicherweise könnte dem Metall eine Funktion zur Stabilisierung des Übergangszustandes während der CP-Hydrolyse zukommen. In der Nähe des Restes R<sup>390</sup> kann auch für Mj1051 ein Wassermolekül beobachtet werden, welches vermutlich für die CP-Hydrolyse korrekt positioniert ist. Da in Mj1051 der entsprechende Lysinrest, welcher vermutlich als Base zur Deprotonierung des Wassermoleküls wirkt, gegen ein Leucin ausgetauscht ist, übernimmt wahrscheinlich das

Lösungsmittel die Aufgabe als Base. Verstärkt wird diese Annahme durch die Gegebenheit, dass im basischen Milieu (pH 7,5) das CA in Kae1-ähnlichen Domäne von Mj1051 gefunden werden konnte, während im leicht sauren Milieu (pH 6,5) das Enzym ATP-gebunden vorlag. Dies unterstützt den für TobZ postulierten Mechanismus zur CA-Bildung, welcher für alle O-CTasen gültig sein sollte.

Ein weiterer bedeutender Unterschied von Mj1051 zu TobZ ist die Eigenschaft, ATP in der Kae1-ähnlichen Domäne und in der YrdC-ähnlichen Domäne unabhängig von CP zu binden. Womöglich könnte darin die Eigenschaft zur ATPase-Aktivität von Mj1051 begründet sein, welche ebenfalls für die S-CTase HypF, sowie bei den Kae1-Proteinen der  $t^6A_{37}$ -Biosynthese beobachtet wurde (Deutsch *et al.*, 2012; Paschos *et al.*, 2002). Eine ähnliche Eigenschaft wurde für die S-CTase HypF aufgedeckt, jedoch konnte die Bindung von ATP in der Kae1-ähnlichen Domäne bisher nicht gezeigt werden (Petkun *et al.*, 2011; Shomura und Higuchi, 2012). Interessanterweise sind die Proteine Kae1 und Sua5/YrdC, welche an der Biosynthese der konservierten  $t^6A_{37}$ -tRNA-Modifizierung beteiligt sind, in der Lage, ATP zu binden (PDB:2IVP (Hecker *et al.*, 2007) und PDB:3AJE (Kuratani *et al.*, 2011)). Die Bindung der Liganden in den Proteinen ist vergleichbar mit der Bindung in den aktiven Zentren von Mj1051 (Anhang 7, S. 167). Möglicherweise besteht aufgrund dieser Eigenschaft von Mj1051 sowie der nachgewiesenen ATPase-Aktivität eine nahe Verwandtschaft zu den Proteinen der  $t^6A_{37}$ -tRNA-Biosynthese. Zudem deutet die elektrostatische Oberfläche im Zusammenspiel mit der Co-Reinigung von RNA sowie die Dimerisierung von Mj1051 auf ein (t)RNA modifizierendes Enzym hin (Zhou und Huang, 2008; Goto-Ito *et al.*, 2009). Die Bindung einer tRNA, bei der die elektrostatische Ladungsverteilung auf der Oberfläche eine entscheidende Rolle darstellt, konnte für die Cysteinyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* gezeigt werden (Hauenstein *et al.*, 2004). Verstärkt wird die Annahme durch die Lage der Gene der Mj1051-ähnlichen Proteine im Genom des Wirtsorganismus. So befindet sich das Gen der putativen O-CTase Mj1051 im Genom von *M. jannaschii* neben zwei bisher weitestgehend uncharakterisierten Proteinen (Mj1052; PDB: 2EKY und Mj1053), jedoch ist das entsprechende Gen in den mesophilen Organismen der Spezies *M. maripaludis* und *M. vannielii* in einem Operon mit Proteinen angeordnet, die an einer tRNA-Reifung und/oder -Modifizierung beteiligt sind (MMP0649-0647 bzw. Mevan\_1544-1546) (Anhang 8, S. 168) (Taboada *et al.*, 2012). Dazu zählt das Protein Archease, welches in allen drei Domänen des Lebens konserviert ist und oft in einem Operon mit DNA/RNA-bindenden Proteinen vorkommt (Canaves, 2004). Das Protein ist an der Reifung von tRNAs beteiligt, in dem es die Spezifität und die katalytische Geschwindigkeit einer tRNA-Ligase (RtcB) erhöht (Desai *et al.*, 2014; Popow *et al.*, 2014). Die RtcB benötigt für die RNA-Ligation ein 2',3'-zyklisches Phosphat an der Ribose eines Substrates, welches durch das Enzym RtcA katalysiert wird (Das und Shuman, 2013; Zhelkovsky and McReynolds, 2014). Eben dieses Enzym RtcA

stellt das zweite Protein im Operon in den mesophilen Organismen dar, wodurch die Anordnung der zwei Gene in einem Operon biologisch zweckmäßig erscheint. Im Archaeon *M. jannaschii* sind die Gene für die Proteine Archease und RtcA ebenfalls in einem Operon angeordnet (Mj0024 bzw. Mj0025), wobei eine tRNA m<sup>5</sup>C Methyltransferase (Mj0026) wahrscheinlich Co-exprimiert wird (Taboada *et al.*, 2012). Zusätzlich konnte eine Interaktion einer Archease mit einer tRNA m<sup>5</sup>C Methyltransferase aus *P. abyssi* gezeigt werden, wodurch die Spezifität und die Löslichkeit der Methyltransferase gesteigert wird (Auxilien *et al.*, 2007). Aufgrund dessen ist eine Interaktion zwischen Mj0024 (Archease) und Mj0026 (tRNA m<sup>5</sup>C Methyltransferase) denkbar (Auxilien *et al.*, 2007; Kuratani *et al.*, 2010). Damit wird die Vermutung gestärkt, dass Proteine, welche in einem Operon mit einer Archease angeordnet sind, an der Biosynthese von (t)RNAs beteiligt sind (Desai *et al.*, 2014). Eine weitere Gegebenheit für diese Annahme besteht in der Anordnung des Operons im Archaeon *M. infernus ME*, wo die entsprechende Carbamoyltransferase (Metin\_0977) neben der Aspartyl-tRNA-Synthetase und dem ribosomalen Selenocystein-spezifischen Translations-Elongationsfaktor eF-Tu liegt (Taboada *et al.*, 2012). Das Protein eF-Tu bindet Amino-Acyl-beladene tRNAs und vermittelt den Eintritt in die *A-site* des Ribosoms (Hausmann *et al.*, 2007; Nilsson und Nissen, 2005).

Obwohl der terminale Akzeptor von Mj1051 unbekannt ist, kann aus den bisher erwähnten Daten eine Beteiligung des Enzyms an einer tRNA-Modifizierung postuliert werden. Möglichweise resultiert diese Eigenschaft aus der evolutiven Verwandtschaft zu den Proteinen, die an der t<sup>6</sup>A<sub>37</sub>-tRNA-Biosynthese beteiligt sind. Die tRNA-Modifizierungen weisen eine hohe Vielfalt in der Art der Veränderung auf, die von einer einfachen Methylierung (z. B. m<sup>6</sup>A) bis hin zu komplexen Basenmodifikationen (z.B. imG2) reichen (Littlefield und Dunn, 1958; de Crecy-Lagard *et al.*, 2010; Cantara *et al.*, 2011). Eine carbamoylierte Base (ncm<sup>5</sup>U) konnte bereits beschrieben werden, jedoch existiert diese wahrscheinlich nur in Eukaryonten (Johansson *et al.*, 2008). Auf Grundlage des Mechanismus von TobZ sowie den bisher veröffentlichten Daten zur Biosynthese der t<sup>6</sup>A<sub>37</sub>-tRNA-Modifizierung lässt sich eine gemeinsame Reaktionsfolge postulieren (Abbildung 85, S. 140). Dabei ähneln sich die Intermediate Carbamoyl-AMP und Threonylcarbamoyl-AMP sehr stark, da sie sich nur um die Threonylgruppe unterscheiden. Möglicherweise fand eine evolutive Veränderung der Faltung des Sua5/YrdC-Proteins statt, wodurch die Substratspezifität von *L*-Threonin zu Carbamoylphosphat verändert wurde. Mit der Reaktionsfolge wird ein am N<sup>6</sup>-carbamoyliertes Adenosinmolekül postuliert, welches bisher nicht beschrieben wurde. Zudem erfolgt die Übertragung auf ein N-Atom im möglichen terminalen Akzeptor, wodurch Mj1051 einen Vertreter einer neuen Klasse von



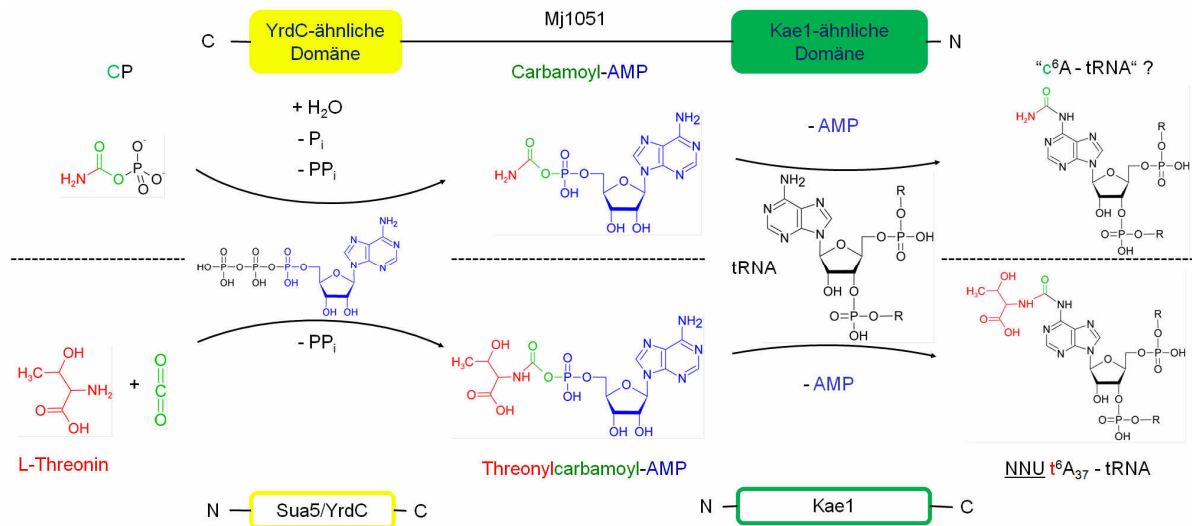


Abbildung 85: Postulierte Reaktionsfolge von Mj1051 auf Basis der  $t^6A_{37}$ -tRNA-Biosynthese

Im oberen Bereich ist die postulierte Reaktionsfolge von Mj1051 dargestellt, während im unteren Teil die Biosynthese der  $t^6A_{37}$ -tRNA-Modifizierung gezeigt ist.

Carbamoyltransferasen bilden könnte, die als *N*-CTase mit *O*-CTase-Faltung beschrieben werden kann. Jedoch konnte eine strukturell ähnliche tRNA-Modifizierung (*N*<sup>6</sup>-Acetyladenosin;  $ac^6A$ ) gefunden werden, die vermutlich spezifisch für Archaeen ist (Cantara *et al.*, 2011). Die  $ac^6A$ -Modifizierung unterscheidet sich von einer möglichen  $c^6A$ -Modifizierung durch den Austausch der Carbamoyl-Aminogruppe zu einer Methylgruppe. Die Biosynthese dieser Nukleotids ist bisher nicht beschrieben, jedoch wird die  $ac^6A$ -tRNA-Modifizierung mit der  $t^6A_{37}$ -tRNA-Biosynthese in Verbindung gebracht, da die *N*<sup>6</sup>-Acetyladenosin-Modifizierung einen Abkömmling mit minimaler struktureller Ähnlichkeit darstellen kann (Sauerwald *et al.*, 2005).

Die oben erwähnte gemeinsame Reaktionsfolge könnte das Verbindungsstück zwischen den *O*-CTasen und der  $t^6A_{37}$ -tRNA-Modifizierung darstellen. Dadurch könnte die eingangs gestellte Frage nach der ATP-Abhängigkeit der Carbamoylierungsreaktion beantwortet werden, da die  $t^6A_{37}$ -tRNA-Modifizierung durch die Aktivierung von Threonin und  $CO_2$  unbestritten ATP-abhängig ist. Möglicherweise erfolgte ein evolutiver Prozess zu einem Abkömmling der  $t^6A_{37}$ -tRNA-Modifizierung, wobei die Faltung der beteiligten Proteine weitestgehend beibehalten wurde, weshalb die Carbamoylierung ebenfalls ATP-abhängig ist. Dieser Weg stellte womöglich aus evolutiver Sicht einen Vorteil gegenüber der Generierung einer komplett neuen Faltung dar, wodurch die ATP-Abhängigkeit vermieden werden könnte. Die Faltung der unterschiedlichen *N*-CTasen ist sehr ähnlich, da die niedermolekularen Substrate eine hohe strukturelle Ähnlichkeit aufweisen (Wild und Wales, 1990). Demnach wird die Anpassung der Faltung der *N*-CTasen an einen komplexen molekularen Akzeptor, wie es eine tRNA darstellt, vermutlich nicht ohne starke strukturelle Veränderung möglich, wodurch ein wesentlich längerer evolutiver Prozess nötig erscheint. Demnach könnte die

Anpassung einer bekannten Faltung gegenüber der Entwicklung einer neuen Faltung in der Evolution begünstigt sein. Über die Faltung der Mj1051-ähnlichen Enzyme könnten sich die TobZ-ähnlichen O-CTasen entwickelt haben, da wiederum weitestgehend nur die Faltung der Kae1-ähnlichen Domäne an den Akzeptor angepasst werden musste, was in dem strukturellen Vergleich zwischen Mj1051 und TobZ deutlich zu sehen ist. Diese These wird durch die Entwicklung der S-CTase HypF unterstützt, da der modulare Aufbau im Vergleich zu den O-CTasen umgekehrt ist, weshalb ein alternativer evolutiver Prozess angenommen werden kann (Abbildung 86, S. 141). Demzufolge könnte eine parallele Entwicklung der O- und S-CTasen stattgefunden haben, die sich beide aus der  $t^6A_{37}$ -tRNA-Modifizierung entwickelten, wodurch die Frage nach der ATP-Abhängigkeit der Carbamoylierungsreaktion beantwortet werden könnte.

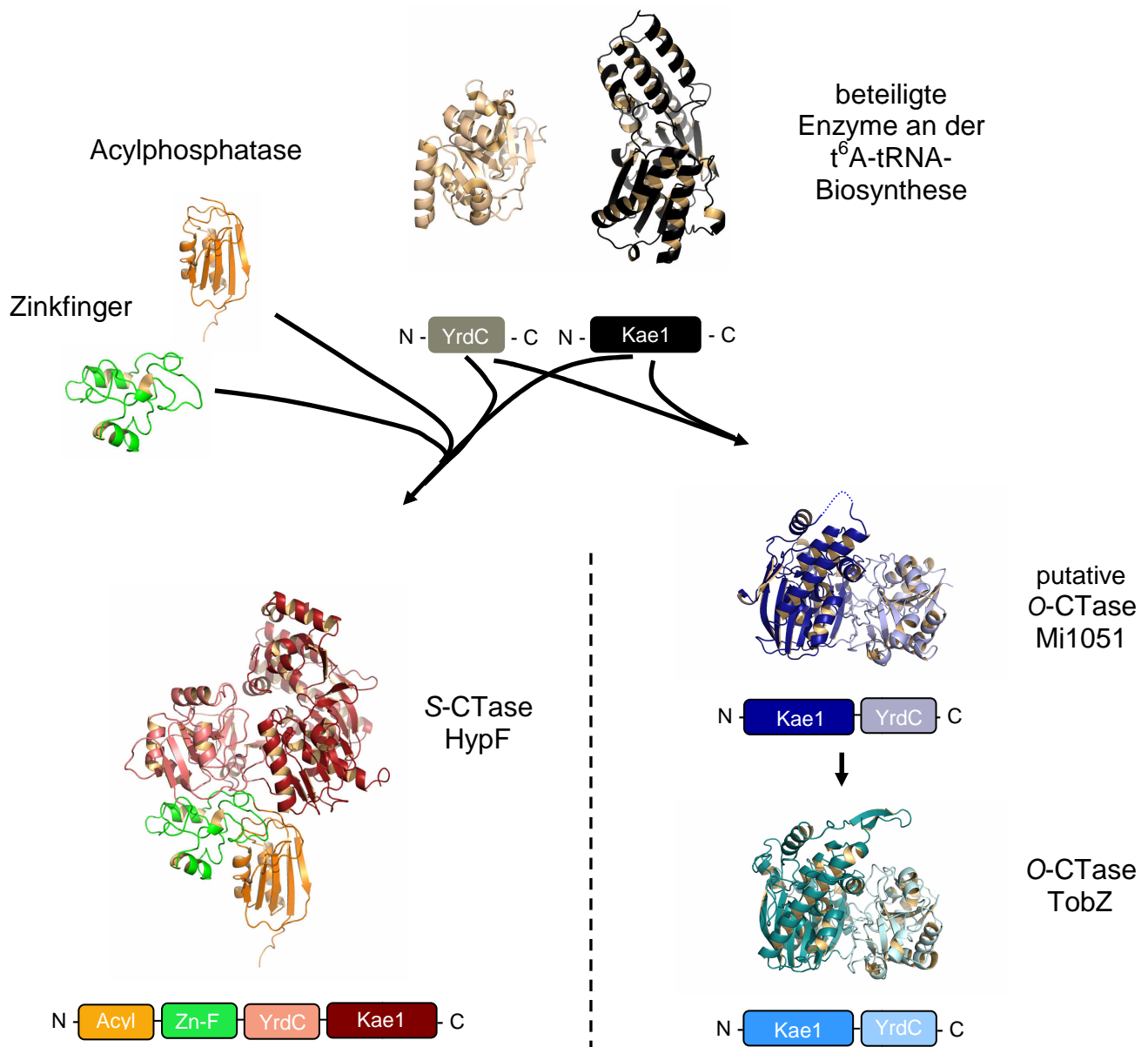


Abbildung 86: Mögliche evolutive Entwicklung der S- und O-CTasen ausgehend von der  $t^6A_{37}$ -tRNA-Modifizierung



## 6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Dissertation wurde die O-Carbamoyltransferase TobZ biochemisch und strukturbiologisch untersucht. Nach Expression in *S. lividans* TK 24 Zellen und erfolgreicher Reinigung des Enzyms konnte die Aktivität mittels Dünnschichtchromatographie überprüft werden. Im Rahmen dessen wurde festgestellt, dass ATP als Co-Substrat und daher essentiell für die Carbamoylierungsreaktion ist. Dabei wurde ein  $k_{cat}$ -Wert von ca.  $4,3 \text{ min}^{-1}$  ermittelt, wodurch das Enzym 14 Sekunden für einen Umsatz benötigt. Der Einsatz von radioaktiv-markierten Nukleotiden und Phosphatspezies sowie teilweise  $^{18}\text{O}$ -markiertem Carbamoylphosphat (CP) lieferte detaillierte Informationen über den Reaktionsmechanismus in der C-terminalen YrdC-ähnlichen Domäne. Die Charakterisierung der hergestellten Varianten von TobZ bestätigten die postulierte Reaktionsfolge. Des Weiteren konnte für die Aminoglykosid-Antibiotika-bindende N-terminale Kae1-ähnliche Domäne ebenfalls ein Reaktionsmechanismus aufgestellt werden.

Weiterhin wurde durch den Einsatz des semisynthetischen AGA Dibekacin das Produkt 6''-O-carbamoyl-Dibekacin erhalten. Die antibiotische Wirkung der carbamoylierten AGA gegen das gramnegative Bakterium *E. coli* wurde mittels Bioautographie nachgewiesen, wobei eine inhibitorische Wirkung auf die Aktivität einer Aminoglykosid 3'-Phosphotransferase nicht bestand.

Der letzte Schwerpunkt der Dissertation war die Charakterisierung einer Carbamoyltransferase aus dem thermophilen Organismus *M. jannaschii*. Das Enzym Mj1051 konnte löslich in *E. coli* exprimiert werden und zeigte eine Co-Reinigung von Wirts-RNA. Die Carbamoylierungsreaktion bedarf ebenfalls des Co-Substrates ATP, jedoch konnte der terminale Akzeptor nicht bestimmt werden. Die Lösung der Kristallstruktur sowie die Komplexstrukturen mit verschiedenen Liganden ermöglichten einen strukturellen Vergleich der Enzyme.

In folgenden Arbeiten könnte der Einsatz von enantiomeren-reinem ATP $\alpha$ S weitere Informationen über den Reaktionsmechanismus zur Carbamoyl-AMP-Bildung von TobZ liefern. Weiterhin wären Mutationen interessant, die den Carbamoyltransfer zwischen den Domänen beeinflussen sowie deren Wirkung auf die enzymatische Aktivität. Der Effekt der O-Carbamoylierung sollte auf die Resistenz-vermittelnde Aktivität einer Aminoglykosid 2''-Phosphotransferase überprüft werden. Die Charakterisierung des terminalen Akzeptors von Mj1051 wäre von hohem Interesse, wodurch dessen Funktionen im zellulären Kontext aufgedeckt werden könnte. Hinweise liefern möglicherweise die Co-Reinigung von RNA sowie die strukturelle Verwandtschaft zur t $^6\text{A}_{37}$ -tRNA-Modifizierung.

## 7 Literaturverzeichnis

- AGARI, Y., SATO, S., WAKAMATSU, T., BESSHO, Y., EBIHARA, A., YOKOYAMA, S., KURAMITSU, S., and SHINKAI, A. 2008. X-ray crystal structure of a hypothetical Sua5 protein from *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *Proteins* 70, 1108-1111.
- AKITA, E., ITO, T., TSURUOKA, T., and NIIDA, T. 1970. Synthesis of an aminocyclitol antibiotic, SF-733 (ribostamycin). *Antimicrob. Agents Chemother. (Bethesda.)* 10, 33-37.
- ALLEN, C.M., JR. and JONES, M.E. 1964. DECOMPOSITION OF CARBAMYLPHOSPHATE IN AQUEOUS SOLUTIONS. *Biochemistry* 3, 1238-1247.
- ALLEWELL, N.M., SHI, D.H., MORIZONO, H., and TUCHMAN, M. 1999. Molecular recognition by ornithine and aspartate transcarbamylases. *Accounts of Chemical Research* 32, 885-894.
- AUXILIEN, S., EL, K.F., RASMUSSEN, A., DOUTHWAITE, S., and GROSJEAN, H. 2007. Archease from *Pyrococcus abyssi* improves substrate specificity and solubility of a tRNA m5C methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 282, 18711-18721.
- AZUCENA, E. and MOBASHERY, S. 2001. Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. *Drug Resist. Updat.* 4, 106-117.
- BABCOCK, M.J. and KENDRICK, K.E. 1988. Cloning of DNA involved in sporulation of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 170, 2802-2808.
- BATTYE, T.G., KONTOGIANNIS, L., JOHNSON, O., POWELL, H.R., and LESLIE, A.G. 2011. iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67, 271-281.
- BECKER, B. and COOPER, M.A. 2013. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. *ACS Chem. Biol.* 8, 105-115.
- BEEKMAN, E.M. 1965. A new antibiotic against gonorrhoea. *Dermatologica* 131, 262-265.
- BJORKMAN, J., SAMUELSSON, P., ANDERSSON, D.I., and HUGHES, D. 1999. Novel ribosomal mutations affecting translational accuracy, antibiotic resistance and virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 31, 53-58.
- BLACK, J., CALESNICK, B., WILLIAMS, D., and WEINSTEIN, M.J. 1963. PHARMACOLOGY OF GENTAMICIN, A NEW BROAD-SPECTRUM ANTIBIOTIC. *Antimicrob. Agents Chemother. (Bethesda.)* 161, 138-147.
- BLOKESCH, M., PASCHOS, A., BAUER, A., REISSMANN, S., DRAPAL, N., and BOCK, A. 2004. Analysis of the transcarbamoylation-dehydration reaction catalyzed by the hydrogenase maturation proteins HypF and HypE. *Eur. J. Biochem* 271, 3428-3436.
- BODEY, G.P. and STEWART, D. 1973. In vitro studies of BB-K8, a new aminoglycoside antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4, 186-192.

- BOJANOWSKI,R., GAUDY,E., VALENTINE,R.C., and WOLFE,R.S. 1964. OXAMIC TRANSCARBAMYLASE OF STREPTOCOCCUS ALLANTOICUS. *J.Bacteriol.* 87, 75-80.
- BRADFORD,M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem* 72, 248-254.
- BREWER,S.J., TAYLOR,P.M., and TURNER,M.K. 1980. An adenosine triphosphate-dependent carbamoylphosphate--3-hydroxymethylcephem O-carbamoyltransferase from *Streptomyces clavuligerus*. *Biochem.J.* 185, 555-564.
- BRINKMANN,U., MATTES,R.E., and BUCKEL,P. 1989. High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene* 85, 109-114.
- BROGDEN,R.N., PINDER,R.M., SAWYER,P.R., SPEIGHT,T.M., and AVERY,G.S. 1976. Tobramycin: a review of its antibacterial and pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs* 12, 166-200.
- BRYAN,L.E. and KWAN,S. 1981. Mechanisms of aminoglycoside resistance of anaerobic bacteria and facultative bacteria grown anaerobically. *J.Antimicrob.Chemother.* 8 Suppl D, 1-8.
- BRYAN,L.E. and VAN DEN ELZEN,H.M. 1977. Effects of membrane-energy mutations and cations on streptomycin and gentamicin accumulation by bacteria: a model for entry of streptomycin and gentamicin in susceptible and resistant bacteria. *Antimicrob.Agents Chemother.* 12, 163-177.
- BULT,C.J., WHITE,O., OLSEN,G.J., ZHOU,L., FLEISCHMANN,R.D., SUTTON,G.G., BLAKE,J.A., FITZGERALD,L.M., CLAYTON,R.A., GOCAYNE,J.D., KERLAVAGE,A.R., DOUGHERTY,B.A., TOMB,J.F., ADAMS,M.D., REICH,C.I., OVERBEEK,R., KIRKNESS,E.F., WEINSTOCK,K.G., MERRICK,J.M., GLODEK,A., SCOTT,J.L., GEOGHAGEN,N.S., and VENTER,J.C. 1996a. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273, 1058-1073.
- BULT,C.J., WHITE,O., OLSEN,G.J., ZHOU,L., FLEISCHMANN,R.D., SUTTON,G.G., BLAKE,J.A., FITZGERALD,L.M., CLAYTON,R.A., GOCAYNE,J.D., KERLAVAGE,A.R., DOUGHERTY,B.A., TOMB,J.F., ADAMS,M.D., REICH,C.I., OVERBEEK,R., KIRKNESS,E.F., WEINSTOCK,K.G., MERRICK,J.M., GLODEK,A., SCOTT,J.L., GEOGHAGEN,N.S., and VENTER,J.C. 1996b. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273, 1058-1073.
- CANAVES,J.M. 2004. Predicted role for the archease protein family based on structural and sequence analysis of TM1083 and MTH1598, two proteins structurally characterized through structural genomics efforts. *Proteins* 56, 19-27.
- CANTARA,W.A., CRAIN,P.F., ROZENSKI,J., MCCLOSKEY,J.A., HARRIS,K.A., ZHANG,X., VENDEIX,F.A., FABRIS,D., and AGRIS,P.F. 2011. The RNA Modification Database, RNAMDB: 2011 update. *Nucleic Acids Res.* 39, D195-D201.
- CLAUSNITZER,D. 2010. Analyse von ausgewählten modifizierenden Enzymen aus den Aminoglycosidantibiotika-Biosynthesewegen von Neomycin, Lividomycin und Nebramycin. *Dissertation* urn:nbn:de:hbz:468-20100198.

- COOPER,A. 1999. Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. *Curr.Opin.Chem.Biol.* 3, 557-563.
- COQUE,J.J., PEREZ-LLARENA,F.J., ENGUITA,F.J., FUENTE,J.L., MARTIN,J.F., and LIRAS,P. 1995. Characterization of the cmcH genes of *Nocardia lactamdurans* and *Streptomyces clavuligerus* encoding a functional 3'-hydroxymethylcephem O-carbamoyltransferase for cephamycin biosynthesis. *Gene* 162, 21-27.
- DAS,U. and SHUMAN,S. 2013. 2'-Phosphate cyclase activity of RtcA: a potential rationale for the operon organization of RtcA with an RNA repair ligase RtcB in *Escherichia coli* and other bacterial taxa. *RNA*. 19, 1355-1362.
- DAVIES,J., JONES,D.S., and KHORANA,H.G. 1966. A further study of misreading of codons induced by streptomycin and neomycin using ribopolynucleotides containing two nucleotides in alternating sequence as templates. *J.Mol.Biol.* 18, 48-57.
- DAVIS,B.D., CHEN,L.L., and TAI,P.C. 1986. Misread protein creates membrane channels: an essential step in the bactericidal action of aminoglycosides. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83, 6164-6168.
- DE CRECY-LAGARD,V., BROCHIER-ARMANET,C., URBONAVICIUS,J., FERNANDEZ,B., PHILLIPS,G., LYONS,B., NOMA,A., ALVAREZ,S., DROOGMANS,L., ARMENGAUD,J., and GROSJEAN,H. 2010. Biosynthesis of wyosine derivatives in tRNA: an ancient and highly diverse pathway in Archaea. *Mol.Biol.Evol.* 27, 2062-2077.
- DE STASIO,E.A., MOAZED,D., NOLLER,H.F., and DAHLBERG,A.E. 1989. Mutations in 16S ribosomal RNA disrupt antibiotic--RNA interactions. *EMBO J.* 8, 1213-1216.
- DESAI,K.K., CHENG,C.L., BINGMAN,C.A., PHILLIPS,G.N., JR., and RAINES,R.T. 2014. A tRNA splicing operon: Archease endows RtcB with dual GTP/ATP cofactor specificity and accelerates RNA ligation. *Nucleic Acids Res.* 42, 3931-3942.
- DEUTSCH,C., EL,Y.B., DE CRECY-LAGARD,V., and IWATA-REUYL,D. 2012. Biosynthesis of threonylcarbamoyl adenosine (t6A), a universal tRNA nucleoside. *J.Biol.Chem.* 287, 13666-13673.
- DEWICK,P.M. 2009. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach (3rd ed.)*.
- DOUMITH,M., WEINGARTEN,P., WEHMEIER,U.F., SALAH-BEY,K., BENHAMOU,B., CAPDEVILA,C., MICHEL,J.M., PIEPERSBERG,W., and RAYNAL,M.C. 2000. Analysis of genes involved in 6-deoxyhexose biosynthesis and transfer in *Saccharopolyspora erythraea*. *Molecular and General Genetics* 264, 477-485.
- DUCKA,P., ECKHARD,U., SCHONAUER,E., KOFLER,S., GOTTSCHALK,G., BRANDSTETTER,H., and NUSS,D. 2009. A universal strategy for high-yield production of soluble and functional clostridial collagenases in *E. coli*. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 83, 1055-1065.
- DUGUAY,A.R. and SILHAVY,T.J. 2004. Quality control in the bacterial periplasm. *Biochim.Biophys.Acta* 1694, 121-134.
- ECKSTEIN,F. 1985. Nucleoside Phosphorothioates. *Annual Review of Biochemistry* 54, 367-402.

- EDELHOCH, H. 1967. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6, 1948-1954.
- EMSLEY, P., LOHKAMP, B., SCOTT, W.G., and COWTAN, K. 2010. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 66, 486-501.
- FAIR, R.J., MCCOY, L.S., HENSLER, M.E., AGUILAR, B., NIZET, V., and TOR, Y. 2014. Singly modified amikacin and tobramycin derivatives show increased rRNA A-site binding and higher potency against resistant bacteria. *ChemMedChem*. 9, 2164-2171.
- 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.
- FISCHBACH, M.A. and WALSH, C.T. 2006. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chem. Rev.* 106, 3468-3496.
- FISCHER, B., RUMMEL, G., ALDRIDGE, P., and JENAL, U. 2002. The FtsH protease is involved in development, stress response and heat shock control in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* 44, 461-478.
- FISCHER, S. and GRABER, P. 1999. Comparison of Delta-pH- and Delta-phi-driven ATP synthesis catalyzed by the H(+)-ATPases from *Escherichia coli* or chloroplasts reconstituted into liposomes. *FEBS Lett.* 457, 327-332.
- FLATT, P.M. and MAHMUD, T. 2007. Biosynthesis of aminocyclitol-aminoglycoside antibiotics and related compounds. *Nat. Prod. Rep.* 24, 358-392.
- FONG, D.H. and BERGHUIS, A.M. 2002. Substrate promiscuity of an aminoglycoside antibiotic resistance enzyme via target mimicry. *EMBO J.* 21, 2323-2331.
- FONTECILLA-CAMPS, J.C., VOLBEDA, A., CAVAZZA, C., and NICOLET, Y. 2007. Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases. *Chem. Rev.* 107, 4273-4303.
- FOURMY, D., RECHT, M.I., BLANCHARD, S.C., and PUGLISI, J.D. 1996. Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science* 274, 1367-1371.
- FREEL MEYERS, C.L., OBERTHUR, M., XU, H., HEIDE, L., KAHNE, D., and WALSH, C.T. 2004. Characterization of NovP and NovN: completion of novobiocin biosynthesis by sequential tailoring of the noviosyl ring. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 43, 67-70.
- FREY, P.A. and SAMMONS, R.D. 1985. Bond order and charge localization in nucleoside phosphorothioates. *Science* 228, 541-545.
- FREYER, M.W. and LEWIS, E.A. 2008. Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. *Methods Cell Biol.* 84, 79-113.
- GASTEIGER, E., HOOGLAND, C., GATTIKER, A., DUVAUD, S., WILKINS, M.R., APPEL, R.D., and BAIROCH, A. 2005. *Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press.*



- GERHART, J.C. and PARDEE, A.B. 1962. The enzymology of control by feedback inhibition. *J. Biol. Chem.* 237, 891-896.
- GILL, S.C. and VON HIPPEL, P.H. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182, 319-326.
- GILLE, C. and FROMMEL, C. 2001. STRAP: editor for STRuctural Alignments of Proteins. *Bioinformatics.* 17, 377-378.
- GOMEZ, G., I, FREEL MEYERS, C.L., WALSH, C.T., and LAWSON, D.M. 2008. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the O-carbamoyltransferase NovN from the novobiocin-biosynthetic cluster of *Streptomyces spheroides*. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 64, 1000-1002.
- GOTO-ITO, S., ITO, T., ISHII, R., MUTO, Y., BESSHO, Y., and YOKOYAMA, S. 2008. Crystal structure of archaeal tRNA(m(1)G37)methyltransferase aTrm5. *Proteins* 72, 1274-1289.
- GOTO-ITO, S., ITO, T., KURATANI, M., BESSHO, Y., and YOKOYAMA, S. 2009. Tertiary structure checkpoint at anticodon loop modification in tRNA functional maturation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 1109-1115.
- GRAHAM, D.E., KYRPIDES, N., ANDERSON, I.J., OVERBEEK, R., and WHITMAN, W.B. 2001. Genome of *Methanocaldococcus* (*Methanococcus*) *jannaschii*. *Methods Enzymol.* 330, 40-123.
- GRIBALDO, S. and BROCHIER-ARMANET, C. 2006. The origin and evolution of Archaea: a state of the art. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 361, 1007-1022.
- GRITZ, L. and DAVIES, J. 1983. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 25, 179-188.
- GULICK, A.M. 2009. Conformational dynamics in the Acyl-CoA synthetases, adenylation domains of non-ribosomal peptide synthetases, and firefly luciferase. *ACS Chem. Biol.* 4, 811-827.
- HADDAD, J., KOTRA, L.P., LLANO-SOTELO, B., KIM, C., AZUCENA, E.F., JR., LIU, M., VAKULENKO, S.B., CHOW, C.S., and MOBASHERY, S. 2002. Design of novel antibiotics that bind to the ribosomal acyltransfer site. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 3229-3237.
- HASHIMOTO-GOTOH, T., YASOJIMA, K., and TSUJIMURA, A. 1995. Plasmids with a kanamycin-resistance gene for site-directed mutagenesis using the oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method. *Gene* 167, 333-334.
- HAUENSTEIN, S., ZHANG, C.M., HOU, Y.M., and PERONA, J.J. 2004. Shape-selective RNA recognition by cysteinyl-tRNA synthetase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 1134-1141.
- HAUSMANN, C.D., PRAETORIUS-IBBA, M., and IBBA, M. 2007. An aminoacyl-tRNA synthetase:elongation factor complex for substrate channeling in archaeal translation. *Nucleic Acids Res.* 35, 6094-6102.
- HECKER, A., LEULLIOT, N., GADELLE, D., GRAILLE, M., JUSTOME, A., DORLET, P., BROCHIER, C., QUEVILLON-CHERUEL, S., LE, C.E., VAN, T.H., and FORTERRE, P. 2007. An archaeal orthologue of the universal protein Kae1 is an iron metalloprotein

- which exhibits atypical DNA-binding properties and apurinic-endonuclease activity in vitro. *Nucleic Acids Res.* 35, 6042-6051.
- HENDRICKSON,W.A., SMITH,J.L., PHIZACKERLEY,R.P., and MERRITT,E.A. 1988. Crystallographic structure analysis of lamprey hemoglobin from anomalous dispersion of synchrotron radiation. *Proteins* 4, 77-88.
- HENDRICKSON,W.A., SMITH,J.L., and SHERIFF,S. 1985. Direct phase determination based on anomalous scattering. *Methods Enzymol.* 115, 41-55.
- HERSCHLAG,D., PICCIRILLI,J.A., and CECH,T.R. 1991. Ribozyme-catalyzed and nonenzymatic reactions of phosphate diesters: rate effects upon substitution of sulfur for a nonbridging phosphoryl oxygen atom. *Biochemistry* 30, 4844-4854.
- HIGGINS,C.E. and KASTNER,R.E. 1967. Nebramycin, a new broad-spectrum antibiotic complex. II. Description of *Streptomyces tenebrarius*. *Antimicrob.Agents Chemother.(Bethesda.)* 7, 324-331.
- HOMMES,F.A., ELLER,A.G., SCOTT,D.F., and CARTER,A.L. 1983. Separation of ornithine and lysine activities of the ornithine-transcarbamylase-catalyzed reaction. *Enzyme* 29, 271-277.
- HOPWOOD,D.A. 1985. *Genetic manipulation of streptomyces: A laboratory manual*. The John Innes Foundation.
- HOUGHTON,J.E., BENCINI,D.A., O'DONOVAN,G.A., and WILD,J.R. 1984. Protein differentiation: a comparison of aspartate transcarbamoylase and ornithine transcarbamoylase from *Escherichia coli* K-12. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81, 4864-4868.
- HSUANYU,Y. and WEDLER,F.C. 1987. Kinetic mechanism of native *Escherichia coli* aspartate transcarbamylase. *Arch.Biochem Biophys.* 259, 316-330.
- HURLEY,J.H. 1996. The sugar kinase/heat shock protein 70/actin superfamily: implications of conserved structure for mechanism. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 25, 137-162.
- INDYK,L. and FISHER,H.F. 1998. Theoretical aspects of isothermal titration calorimetry. *Methods Enzymol.* 295, 350-364.
- JABBOURI,S., FELLAY,R., TALMONT,F., KAMALAPRIJA,P., BURGER,U., RELIC,B., PROME,J.C., and BROUGHTON,W.J. 1995. Involvement of nodS in N-methylation and nodU in 6-O-carbamoylation of *Rhizobium* sp. NGR234 nod factors. *J.Biol.Chem.* 270, 22968-22973.
- JENNER,L.B., DEMESHKINA,N., YUSUPOVA,G., and YUSUPOV,M. 2010. Structural aspects of messenger RNA reading frame maintenance by the ribosome. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 17, 555-560.
- JIN,L., STEC,B., and KANTROWITZ,E.R. 2000. A cis-proline to alanine mutant of *E. coli* aspartate transcarbamoylase: kinetic studies and three-dimensional crystal structures. *Biochemistry* 39, 8058-8066.
- JOHANSSON,M.J., ESBERG,A., HUANG,B., BJORK,G.R., and BYSTROM,A.S. 2008. Eukaryotic wobble uridine modifications promote a functionally redundant decoding system. *Mol.Cell Biol.* 28, 3301-3312.

- JONES,W.J., LEIGH,J.A., MAYER,F., WOESE,C.R., and WOLFE,R.S. 1983. Methanococcus-Jannaschii Sp-Nov, An Extremely Thermophilic Methanogen from A Submarine Hydrothermal Vent. *Archives of Microbiology* 136, 254-261.
- KABSCH,W. 2010. XDS. *Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.* 66, 125-132.
- 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 Sci.* 12, 1865-1871.
- KE,H.M., HONZATKO,R.B., and LIPSCOMB,W.N. 1984. Structure of unligated aspartate carbamoyltransferase of Escherichia coli at 2.6-A resolution. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81, 4037-4040.
- KELLMANN,R., MIHALI,T.K., and NEILAN,B.A. 2008. Identification of a saxitoxin biosynthesis gene with a history of frequent horizontal gene transfers. *J.Mol.Evol.* 67, 526-538.
- KHAREL,M.K., BASNET,D.B., LEE,H.C., LIOU,K., WOO,J.S., KIM,B.G., and SOHNG,J.K. 2004. Isolation and characterization of the tobramycin biosynthetic gene cluster from Streptomyces tenebrarius. *FEMS Microbiol.Lett.* 230, 185-190.
- KOCH,K.F., DAVIS,F.A., and RHOADES,J.A. 1973. Nebramycin: separation of the complex and identification of factors 4, 5, and 5'. *J.Antibiot.(Tokyo)* 26, 745-751.
- KOHANSKI,M.A., DWYER,D.J., WIERZBOWSKI,J., COTTAREL,G., and COLLINS,J.J. 2008. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell* 135, 679-690.
- KOMOTO,J., YAMADA,T., TAKATA,Y., MARKHAM,G.D., and TAKUSAGAWA,F. 2004. Crystal structure of the S-adenosylmethionine synthetase ternary complex: a novel catalytic mechanism of S-adenosylmethionine synthesis from ATP and Met. *Biochemistry* 43, 1821-1831.
- KONDO,J., FRANCOIS,B., RUSSELL,R.J., MURRAY,J.B., and WESTHOF,E. 2006. Crystal structure of the bacterial ribosomal decoding site complexed with amikacin containing the gamma-amino-alpha-hydroxybutyryl (haba) group. *Biochimie* 88, 1027-1031.
- KONDO,S. and HOTTA,K. 1999. Semisynthetic aminoglycoside antibiotics: Development and enzymatic modifications. *J.Infect.Chemother.* 5, 1-9.
- KONDO,S., IINUMA,K., YAMAMOTO,H., IKEDA,Y., and MAEDA,K. 1973a. Letter: Synthesis of (S)-4-amino-2-hydroxybutyryl derivatives of 3',4'-dideoxykanamycin B and their antibacterial activities. *J.Antibiot.(Tokyo)* 26, 705-707.
- KONDO,S., IINUMA,K., YAMAMOTO,H., MAEDA,K., and UMEZAWA,H. 1973b. Letter: Syntheses of 1-n-(S)-4-amino-2-hydroxybutyryl)-kanamycin B and -3', 4'-dideoxykanamycin B active against kanamycin-resistant bacteria. *J.Antibiot.(Tokyo)* 26, 412-415.
- KONDO,S., MIYASAKA,T., YOSHIDA,K., IINUMA,K., and UMEZAWA,H. 1977. Syntheses and properties of kanamycin C derivatives active against resistant bacteria. *J.Antibiot.(Tokyo)* 30, 1150-1152.

- KONDO,S., YAMAMOTO,H., NAGANAWA,H., and UMEZAWA,H. 1972. Isolation and characterization of lividomycin A inactivated by *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* carrying R factor. *J.Antibiot.(Tokyo)* 25, 483-484.
- KRAUSE,K.L., VOLZ,K.W., and LIPSCOMB,W.N. 1985. Structure at 2.9-Å resolution of aspartate carbamoyltransferase complexed with the bisubstrate analogue N-(phosphonacetyl)-L-aspartate. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82, 1643-1647.
- KURATANI,M., HIRANO,M., GOTO-ITO,S., ITOH,Y., HIKIDA,Y., NISHIMOTO,M., SEKINE,S., BESSHO,Y., ITO,T., GROSJEAN,H., and YOKOYAMA,S. 2010. Crystal structure of *Methanocaldococcus jannaschii* Trm4 complexed with sinefungin. *J.Mol.Biol.* 401, 323-333.
- KURATANI,M., KASAI,T., AKASAKA,R., HIGASHIJIMA,K., TERADA,T., KIGAWA,T., SHINKAI,A., BESSHO,Y., and YOKOYAMA,S. 2011. Crystal structure of *Sulfolobus tokodaii* Sua5 complexed with L-threonine and AMPPNP. *Proteins* 79, 2065-2075.
- KWON,D.H. and LU,C.D. 2006. Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob.Agents Chemother.* 50, 1615-1622.
- LAEMMLI,U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LAM,J., VAUGHAN,S., and PARKINS,M.D. 2013. Tobramycin Inhalation Powder (TIP): An Efficient Treatment Strategy for the Management of Chronic *Pseudomonas Aeruginosa* Infection in Cystic Fibrosis. *Clin.Med.Insights.Circ.Respir.Pulm.Med.* 7, 61-77.
- LANGER,G., COHEN,S.X., LAMZIN,V.S., and PERRAKIS,A. 2008. Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nat.Protoc.* 3, 1171-1179.
- LAUHON,C.T. 2012. Mechanism of N<sup>6</sup>-threonylcarbamoyladenonsine (t(6)A) biosynthesis: isolation and characterization of the intermediate threonylcarbamoyl-AMP. *Biochemistry* 51, 8950-8963.
- LAURBERG,M., ASAHARA,H., KOROSTELEV,A., ZHU,J., TRAKHANOV,S., and NOLLER,H.F. 2008. Structural basis for translation termination on the 70S ribosome. *Nature* 454, 852-857.
- LEE,Y. and KWON,Y.M. 2000. Identification of an isoform of ornithine carbamoyltransferase that can effectively utilize canaline as a substrate from the leaves of *Canavalia lineata*. *Plant Sci.* 151, 145-151.
- LEGRAIN,C., DEMAREZ,M., GLANSDORFF,N., and PIERARD,A. 1995. Ammonia-Dependent Synthesis and Metabolic Channeling of Carbamoyl-Phosphate in the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus-Furiosus*. *Microbiology-Uk* 141, 1093-1099.
- LEGRAIN,C. and STALON,V. 1976. Ornithine Carbamoyltransferase from *Escherichia-Coli* W - Purification, Structure and Steady-State Kinetic-Analysis. *European Journal of Biochemistry* 63, 289-301.
- LEIGH,D.A., BRADNOCK,K., and MARRINER,J.M. 1981. Augmentin (amoxicillin and clavulanic acid) therapy in complicated infections due to beta-lactamase producing bacteria. *J.Antimicrob.Chemother.* 7, 229-236.

- LITTLEFIELD, J.W. and DUNN, D.B. 1958. Natural occurrence of thymine and three methylated adenine bases in several ribonucleic acids. *Nature* 181, 254-255.
- LOULOUDI, M., NASTOPOULOS, V., GOURBATSIS, S., PERLEPES, S.P., and HADJILIADIS, N. 1999. Eight-coordination in nitrato manganese(II) complexes with tetradentate di-Schiff bases derived from 2-pyridyl ketones: preparation, characterization and catalytic activity for alkene epoxidation. *Inorganic Chemistry Communications* 2, 479-483.
- LOWRY, O.H. and LOPEZ, J.A. 1946. The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. *J. Biol. Chem.* 162, 421-428.
- MA, Q.F., REYNOLDS, M.A., and KENYON, G.L. 1989. Syntheses and Characterizations of Adenosine 5'-(Alpha, Beta-N-Methylimido)di and Triphosphates and Adenosine 5'-(Beta, Gamma-N-Methylimido)Triphosphate - Comparisons with Their Nonmethylated Analogs. *Bioorganic Chemistry* 17, 194-206.
- MACNEIL, D.J., GEWAIN, K.M., RUBY, C.L., DEZENY, G., GIBBONS, P.H., and MACNEIL, T. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* 111, 61-68.
- MAO, D.Y., NECULAI, D., DOWNEY, M., ORLICKY, S., HAFFANI, Y.Z., CECCARELLI, D.F., HO, J.S., SZILARD, R.K., ZHANG, W., HO, C.S., WAN, L., FARES, C., RUMPEL, S., KURINOV, I., ARROWSMITH, C.H., DUROCHER, D., and SICHERI, F. 2008. Atomic structure of the KEOPS complex: an ancient protein kinase-containing molecular machine. *Mol. Cell* 32, 259-275.
- MAO, Y., VAROGLU, M., and SHERMAN, D.H. 1999. Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the antitumor antibiotic mitomycin C from *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564. *Chem. Biol.* 6, 251-263.
- MATSUMOTO, T. 2014. Arbekacin: another novel agent for treating infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Clin. Pharmacol.* 6, 139-148.
- MATTHEWS, B.W. 1968. Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* 33, 491-497.
- MCPHERSON, A., JR. 1976. Crystallization of proteins from polyethylene glycol. *J. Biol. Chem.* 251, 6300-6303.
- MCPHERSON, A. 2001. A comparison of salts for the crystallization of macromolecules. *Protein Sci.* 10, 418-422.
- MINAJIGI, A. and FRANCKLYN, C.S. 2008. RNA-assisted catalysis in a protein enzyme: The 2'-hydroxyl of tRNA(Thr) A76 promotes aminoacylation by threonyl-tRNA synthetase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105, 17748-17753.
- MINGEOT-LECLERCQ, M.P., GLUPCZYNSKI, Y., and TULKENS, P.M. 1999. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 727-737.
- MIYAKE, T., TSUCHIYA, T., UMEZAWA, S., and UMEZAWA, H. 1976. A synthesis of 3',4'-dideoxykanamycin B. *Carbohydr. Res.* 49, 141-151.
- MOAZED, D. and NOLLER, H.F. 1987. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* 327, 389-394.

- MOKRASCH,L.C., CARAVACA,J., and GRISOLIA,S. 1960. A highly active carbamate kinase and its application to the regeneration and preparation of [32P] adenine nucleotides. *Biochim.Biophys.Acta* 37, 442-447.
- MORIC,I., SAVIC,M., ILIC-TOMIC,T., VOJNOVIC,S., BAJKIC,S., and VASILJEVIC,B. 2010. Rrna Methyltransferases and Their Role in Resistance to Antibiotics. *Journal of Medical Biochemistry* 29, 165-174.
- MULLIS,K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci.Am.* 262, 56-5.
- MURPHY,F.V., RAMAKRISHNAN,V., MALKIEWICZ,A., and AGRIS,P.F. 2004. The role of modifications in codon discrimination by tRNA(Lys)UUU. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 11, 1186-1191.
- MURSHUDOV,G.N., VAGIN,A.A., and DODSON,E.J. 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.* 53, 240-255.
- MYERS,T.C., NAKAMURA,K., and FLESHER,J.W. 1963. Phosphonic Acid Analogs of Nucleoside Phosphates .1. Synthesis of 5'-Adenylyl Methylendiphosphonate, A Phosphonic Acid Analog of Atp. *Journal of the American Chemical Society* 85, 3292-&.
- NARA,T., YAMAMOTO,M., KAWAMOTO,I., TAKAYAMA,K., OKACHI,R., TAKASAWA,S., SATO,T., and SATO,S. 1977. Fortimicins A and B, new aminoglycoside antibiotics. I. Producing organism, fermentation and biological properties of fortimicins. *J.Antibiot.(Tokyo)* 30, 533-540.
- NEU,H.C. and FU,K.P. 1978. 1-N HAPA gentamicin B, a new aminoglycoside active against gentamicin resistant isolates--activity compared to other aminoglycosides. *J.Antibiot.(Tokyo)* 31, 385-393.
- NILSSON,J. and NISSEN,P. 2005. Elongation factors on the ribosome. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 15, 349-354.
- OH,S.H. and CHATER,K.F. 1997. Denaturation of circular or linear DNA facilitates targeted integrative transformation of *Streptomyces coelicolor* A3(2): possible relevance to other organisms. *J.Bacteriol.* 179, 122-127.
- OKAMI,Y., HOTTA,K., YOSHIDA,M., IKEDA,D., KONDO,S., and UMEZAWA,H. 1979. New aminoglycoside antibiotics, istamycins A and B. *J.Antibiot.(Tokyo)* 32, 964-966.
- 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 Sci.* 4, 2411-2423.
- PAETZEL,M., DALBEY,R.E., and STRYNADKA,N.C. 2002. Crystal structure of a bacterial signal peptidase apoenzyme: implications for signal peptide binding and the Ser-Lys dyad mechanism. *J.Biol.Chem.* 277, 9512-9519.
- PAPE,T., WINTERMEYER,W., and RODNINA,M. 1999. Induced fit in initial selection and proofreading of aminoacyl-tRNA on the ribosome. *EMBO J.* 18, 3800-3807.
- PAPE,T., WINTERMEYER,W., and RODNINA,M.V. 2000. Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nat.Struct.Biol.* 7, 104-107.

- PARK,J.W., PARK,S.R., NEPAL,K.K., HAN,A.R., BAN,Y.H., YOO,Y.J., KIM,E.J., KIM,E.M., KIM,D., SOHNG,J.K., and YOON,Y.J. 2011. Discovery of parallel pathways of kanamycin biosynthesis allows antibiotic manipulation. *Nat.Chem.Biol.* 7, 843-852.
- PARTHIER,C., GORLICH,S., JAENECKE,F., BREITHAUPT,C., BRAUER,U., FANDRICH,U., CLAUSNITZER,D., WEHMEIER,U.F., BOTTCHER,C., SCHEEL,D., and STUBBS,M.T. 2012. The O-carbamoyltransferase TobZ catalyzes an ancient enzymatic reaction. *Angew.Chem.Int.Ed Engl.* 51, 4046-4052.
- PASCHOS,A., BAUER,A., ZIMMERMANN,A., ZEHELEIN,E., and BOCK,A. 2002. HypF, a carbamoyl phosphate-converting enzyme involved in [NiFe] hydrogenase maturation. *J.Biol.Chem.* 277, 49945-49951.
- PASCHOS,A., GLASS,R.S., and BOCK,A. 2001. Carbamoylphosphate requirement for synthesis of the active center of [NiFe]-hydrogenases. *FEBS Lett.* 488, 9-12.
- PERROCHIA,L., CROZAT,E., HECKER,A., ZHANG,W., BAREILLE,J., COLLINET,B., VAN,T.H., FORTERRE,P., and BASTA,T. 2013. In vitro biosynthesis of a universal t6A tRNA modification in Archaea and Eukarya. *Nucleic Acids Res.* 41, 1953-1964.
- PETKUN,S., SHI,R., LI,Y., ASINAS,A., MUNGER,C., ZHANG,L., WACLAWEK,M., SOBOH,B., SAWERS,R.G., and CYGLER,M. 2011. Structure of hydrogenase maturation protein HypF with reaction intermediates shows two active sites. *Structure.* 19, 1773-1783.
- PFLUGRATH,J.W. 1999. The finer things in X-ray diffraction data collection. *Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.* 55, 1718-1725.
- PIEPERSBERG,W., ABOSHANAB,K.M., SCHMIDT-BEIBNER,H., and WEHMEIER,U.F. 2007. *The Biochemistry and Genetics of Aminoglycoside Producers, in Aminoglycoside Antibiotics: From Chemical Biology to Drug Discovery (ed D. P. Arya), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.*
- PITTINGER,R.C., WOLFE,R.N., HOEHN,M.M., MARKS,P.N., DAILY,W.A., and MCGUIRE,J.M. 1953. Hygromycin. I. Preliminary studies on the production and biologic activity of a new antibiotic. *Antibiot.Chemother.(Northfield.Ill.)* 3, 1268-1278.
- POOLE,K. 2001. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr.Opin.Microbiol.* 4, 500-508.
- POPOW,J., JURKIN,J., SCHLEIFFER,A., and MARTINEZ,J. 2014. Analysis of orthologous groups reveals archease and DDX1 as tRNA splicing factors. *Nature* 511, 104-107.
- PURCELL,J. and HENGGE,A.C. 2005. The thermodynamics of phosphate versus phosphorothioate ester hydrolysis. *J.Org.Chem.* 70, 8437-8442.
- RANGARAJAN,E.S., ASINAS,A., PROTEAU,A., MUNGER,C., BAARDSNES,J., IANNUZZI,P., MATTE,A., and CYGLER,M. 2008. Structure of [NiFe] hydrogenase maturation protein HypE from Escherichia coli and its interaction with HypF. *J.Bacteriol.* 190, 1447-1458.
- REDMOND,W.B. 1955. The effect of streptomycin on autolysis of Mycobacterium tuberculosis. *J.Bacteriol.* 69, 616-619.

- REISSMANN,S., HOCHLEITNER,E., WANG,H., PASCHOS,A., LOTTSPREICH,F., GLASS,R.S., and BOCK,A. 2003. Taming of a poison: biosynthesis of the NiFe-hydrogenase cyanide ligands. *Science* 299, 1067-1070.
- RENGGLI,S., KECK,W., JENAL,U., and RITZ,D. 2013. Role of Autofluorescence in Flow Cytometric Analysis of Escherichia coli Treated with Bactericidal Antibiotics. *Journal of Bacteriology* 195, 4067-4073.
- REUSSER,P. 1967. Eine Methode Zur Bioautographie Von Dunnschicht-Chromatogrammen. *Zeitschrift fur Analytische Chemie Fresenius* 231, 345-&.
- RICHTER,Y. and FISCHER,B. 2003. Characterization and elucidation of coordination requirements of adenine nucleotides complexes with Fe(II) ions. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 22, 1757-1780.
- ROESTAMADJI,J. and MOBASHERY,S. 1998. The use of neamine as a molecular template: inactivation of bacterial antibiotic resistance enzyme aminoglycoside 3'-phosphotransferase type IIa. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 8, 3483-3488.
- ROSANO,C., ZUCCOTTI,S., BUCCIANTINI,M., STEFANI,M., RAMPONI,G., and BOLOGNESI,M. 2002. Crystal structure and anion binding in the prokaryotic hydrogenase maturation factor HypF acylphosphatase-like domain. *J.Mol.Biol.* 321, 785-796.
- ROSENBUSCH,J.P. and GRIFFIN,J.H. 1973. Carbamyl phosphate binding to aspartate transcarbamylase. Partial saturation and its alteration by succinate. *J.Biol.Chem.* 248, 5063-5066.
- SAMBROOK,J. and RUSSELL,D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, H.Y.
- SAUERWALD,A., SITARAMAIAH,D., MCCLOSKEY,J.A., SOLL,D., and CRAIN,P.F. 2005. N6-Acetyladenosine: a new modified nucleoside from Methanopyrus kandleri tRNA. *FEBS Lett.* 579, 2807-2810.
- SCHACHMAN,H.K. 1987. From allostery to mutagenesis: 20 years with aspartate transcarbamoylase. *Biochem Soc.Trans.* 15, 772-775.
- SCHATZ,A., BUGIE,E., and WAKSMAN,S.A. 2005. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. 1944. *Clin.Orthop.Relat Res.*, 3-6.
- SHAKYA,T., STOGIOS,P.J., WAGLECHNER,N., EVDOKIMOVA,E., EJIM,L., BLANCHARD,J.E., MCARTHUR,A.G., SAVCHENKO,A., and WRIGHT,G.D. 2011. A small molecule discrimination map of the antibiotic resistance kinome. *Chem.Biol.* 18, 1591-1601.
- SHARP,P.M., SAENZ,C.A., and MARTIN,R.R. 1974. Amikacin (BB-K8) treatment of multiple-drug resistant Proteus infections. *Antimicrob.Agents Chemother.* 5, 435-438.
- SHAW,K.J., RATHER,P.N., HARE,R.S., and MILLER,G.H. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol.Rev.* 57, 138-163.
- SHELDRIK,G.M. 2010. Experimental phasing with SHELXC/D/E: combining chain tracing with density modification. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 66, 479-485.



- SHI,D., GALLEGOS,R., DEPONTE,J., III, MORIZONO,H., YU,X., ALLEWELL,N.M., MALAMY,M., and TUCHMAN,M. 2002. Crystal structure of a transcarbamylase-like protein from the anaerobic bacterium *Bacteroides fragilis* at 2.0 Å resolution. *J.Mol.Biol.* 320, 899-908.
- SHI,D., MORIZONO,H., HA,Y., AOYAGI,M., TUCHMAN,M., and ALLEWELL,N.M. 1998. 1.85-Å resolution crystal structure of human ornithine transcarbamoylase complexed with N-phosphonacetyl-L-ornithine. Catalytic mechanism and correlation with inherited deficiency. *J.Biol.Chem.* 273, 34247-34254.
- SHI,K., HOUSTON,D.R., and BERGHUIS,A.M. 2011. Crystal structures of antibiotic-bound complexes of aminoglycoside 2''-phosphotransferase IVa highlight the diversity in substrate binding modes among aminoglycoside kinases. *Biochemistry* 50, 6237-6244.
- SHOMURA,Y. and HIGUCHI,Y. 2012. Structural basis for the reaction mechanism of S-carbamoylation of HypE by HypF in the maturation of [NiFe]-hydrogenases. *J.Biol.Chem.* 287, 28409-28419.
- SPECTOR,L., JONES,M.E., and LIPMANN,F. 1957. Carbamyl Phosphate. *Methods in Enzymology* 3, 653-655.
- STEEGBORN,C., LITVIN,T.N., LEVIN,L.R., BUCK,J., and WU,H. 2005. Bicarbonate activation of adenyl cyclase via promotion of catalytic active site closure and metal recruitment. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 12, 32-37.
- STEGER,E. and MARTIN,K. 1963. Schwingungsspektrum und Konstitution des Hydrogenthiophosphat-Ions. *Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie* 323, 108-113.
- STIVERS,J.T. and NAGARAJAN,R. 2006. Probing enzyme phosphoester interactions by combining mutagenesis and chemical modification of phosphate ester oxygens. *Chem.Rev.* 106, 3443-3467.
- STOGIOS,P.J., SPANOGIANNOPOULOS,P., EVDOKIMOVA,E., EGOROVA,O., SHAKYA,T., TODOROVIC,N., CAPRETTA,A., WRIGHT,G.D., and SAVCHENKO,A. 2013. Structure-guided optimization of protein kinase inhibitors reverses aminoglycoside antibiotic resistance. *Biochem.J.* 454, 191-200.
- STUDIER,F.W. and MOFFATT,B.A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J.Mol.Biol.* 189, 113-130.
- SUTER,P. and ROSENBUSCH,J.P. 1976. Determination of ligand binding: partial and full saturation of aspartate transcarbamylase. Applicability of a filter assay to weakly binding ligands. *J.Biol.Chem.* 251, 5986-5991.
- SVEDBERG. 1934. MOLECULAR WEIGHT ANALYSIS IN CENTRIFUGAL FIELDS. *Science* 79, 327-332.
- TABER,H.W., MUELLER,J.P., MILLER,P.F., and ARROW,A.S. 1987. Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol.Rev.* 51, 439-457.
- TABOADA,B., CIRIA,R., MARTINEZ-GUERRERO,C.E., and MERINO,E. 2012. ProOpDB: Prokaryotic Operon DataBase. *Nucleic Acids Res.* 40, D627-D631.

- TABOADA,B., VERDE,C., and MERINO,E. 2010. High accuracy operon prediction method based on STRING database scores. *Nucleic Acids Res.* 38, e130.
- TAMURA,T., ISHIDA,Y., OTOGURO,M., HATANO,K., and SUZUKI,K. 2008. Classification of 'Streptomyces tenebrarius' Higgins and Kastner as *Streptoalloteichus tenebrarius* nom. rev., comb. nov., and emended description of the genus *Streptoalloteichus*. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 58, 688-691.
- TEPLOVA,M., TERESHKO,V., SANISHVILI,R., JOACHIMIAK,A., BUSHUEVA,T., ANDERSON,W.F., and EGLI,M. 2000. The structure of the yrdC gene product from *Escherichia coli* reveals a new fold and suggests a role in RNA binding. *Protein Sci.* 9, 2557-2566.
- THE CCP4 SUITE. 1994. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 50, 760-763.
- THE UNIPROT CONSORTIUM. 2015. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.* 43, D204-D212.
- THODEN,J.B., HOLDEN,H.M., WESENBERG,G., RAUSHEL,F.M., and RAYMENT,I. 1997. Structure of carbamoyl phosphate synthetase: a journey of 96 Å from substrate to product. *Biochemistry* 36, 6305-6316.
- THODEN,J.B., MIRAN,S.G., PHILLIPS,J.C., HOWARD,A.J., RAUSHEL,F.M., and HOLDEN,H.M. 1998. Carbamoyl phosphate synthetase: caught in the act of glutamine hydrolysis. *Biochemistry* 37, 8825-8831.
- THODEN,J.B., RAUSHEL,F.M., BENNING,M.M., RAYMENT,I., and HOLDEN,H.M. 1999. The structure of carbamoyl phosphate synthetase determined to 2.1 Å resolution. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 55, 8-24.
- THOMPSON,R.Q. and PRESTI,E.A. 1967. Nebramycin, a new broad-spectrum antibiotic complex. 3. Isolation and chemical-physical properties. *Antimicrob.Agents Chemother.(Bethesda.)* 7, 332-340.
- UMEZAWA,H., HAMADA,M., SUHARA,Y., HASHIMOTO,T., and IKEKAWA,T. 1965. Kasugamycin, a new antibiotic. *Antimicrob.Agents Chemother.(Bethesda.)* 5, 753-757.
- UMEZAWA,H., UEDA,M., MAEDA,K., YAGISHITA,K., KONDO,S., OKAMI,Y., UTAHARA,R., OSATO,Y., NITTA,K., and TAKEUCHI,T. 1957. Production and isolation of a new antibiotic: kanamycin. *J.Antibiot.(Tokyo)* 10, 181-188.
- UMEZAWA,S. 1974. Structures and syntheses of aminoglycoside antibiotics. *Adv.Carbohydr.Chem.Biochem.* 30, 111-182.
- URBONAVICIUS,J., QIAN,Q., DURAND,J.M., HAGERVALL,T.G., and BJORK,G.R. 2001. Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications. *EMBO J.* 20, 4863-4873.
- VAKULENKO,S.B. and MOBASHERY,S. 2003. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin.Microbiol.Rev.* 16, 430-450.
- VAN DUYNNE,G.D., STANDAERT,R.F., KARPLUS,P.A., SCHREIBER,S.L., and CLARDY,J. 1993. Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. *J.Mol.Biol.* 229, 105-124.

- VAN VLEET, J.L., REINHARDT, L.A., MILLER, B.G., SIEVERS, A., and CLELAND, W.W. 2008. Carbon isotope effect study on orotidine 5'-monophosphate decarboxylase: support for an anionic intermediate. *Biochemistry* 47, 798-803.
- VICENS, Q. and WESTHOF, E. 2002. Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding a site. *Chem. Biol.* 9, 747-755.
- VICENS, Q. and WESTHOF, E. 2003. Crystal structure of geneticin bound to a bacterial 16S ribosomal RNA A site oligonucleotide. *J. Mol. Biol.* 326, 1175-1188.
- VONG, K., TAM, I.S., YAN, X., and AUCLAIR, K. 2012. Inhibitors of aminoglycoside resistance activated in cells. *ACS Chem. Biol.* 7, 470-475.
- WACHINO, J. and ARAKAWA, Y. 2012. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist. Updat.* 15, 133-148.
- WAKSMAN, S.A., HUTCHISON, D., and KATZ, E. 1949. Neomycin activity upon *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *Am. Rev. Tuberc.* 60, 78-89.
- WAKSMAN, S.A. and SCHATZ, A. 1943. Strain Specificity and Production of Antibiotic Substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 29, 74-79.
- WANG, Q., XIA, J., GUALLAR, V., KRILOV, G., and KANTROWITZ, E.R. 2008. Mechanism of thermal decomposition of carbamoyl phosphate and its stabilization by aspartate and ornithine transcarbamoylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105, 16918-16923.
- WARGNIES, B., LAUWERS, N., and STALON, V. 1979. Structure and properties of the putrescine carbamoyltransferase of *Streptococcus faecalis*. *Eur. J. Biochem* 101, 143-152.
- WILD, J.R. and WALES, M.E. 1990. Molecular evolution and genetic engineering of protein domains involving aspartate transcarbamoylase. *Annu. Rev. Microbiol.* 44, 193-218.
- WIMBERLY, B.T., BRODERSEN, D.E., CLEMONS, W.M., JR., MORGAN-WARREN, R.J., CARTER, A.P., VONRHEIN, C., HARTSCH, T., and RAMAKRISHNAN, V. 2000. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407, 327-339.
- 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. *Anal. Biochem* 179, 131-137.
- WONG, C., SRIDHARA, S., BARDWELL, J.C., and JAKOB, U. 2000. Heating greatly speeds Coomassie blue staining and destaining. *Biotechniques* 28, 426-8, 430, 432.
- WOOD, T. 1961. Procedure for Analysis of Acid-Soluble Phosphorus Compounds and Related Substances in Muscle and Other Tissues. *Journal of Chromatography* 6, 142-&.
- YOKOTA, K., SATOU, K., and OHKI, S. 2006. Comparative analysis of protein thermo stability: Differences in amino acid content and substitution at the surfaces and in the core regions of thermophilic and mesophilic proteins. *Science and Technology of Advanced Materials* 7, 255-262.

- YOKOYAMA,K., DOI,Y., YAMANE,K., KUROKAWA,H., SHIBATA,N., SHIBAYAMA,K., YAGI,T., KATO,H., and ARAKAWA,Y. 2003. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* 362, 1888-1893.
- YU,Y., HOU,X., NI,X., and XIA,H. 2008. Biosynthesis of 3'-deoxy-carbamoylkanamycin C in a *Streptomyces tenebrarius* mutant strain by *tacB* gene disruption. *J.Antibiot.(Tokyo)* 61, 63-69.
- ZHELKOVSKY,A.M. and MCREYNOLDS,L.A. 2014. Polynucleotide 3'-terminal Phosphate Modifications by RNA and DNA Ligases. *J.Biol.Chem.* 289, 33608-33616.
- ZHOU,C. and HUANG,R.H. 2008. Crystallographic snapshots of eukaryotic dimethylallyltransferase acting on tRNA: insight into tRNA recognition and reaction mechanism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105, 16142-16147.



## Anhang 1 Fortsetzung

Sequenzvergleich der Kae1-ähnliche Domäne auf Basis der gelösten Kristallstrukturen

TobZ\_Kae1 1 MRVLGLNGWPRDFHDASAALLVDGRIAAFAEEERFTRKKKHGYN.....  
Mj1051\_Kae1 1 MILGICD...GHNASSSLIKRDEILFAMSEERFTRKKKNQR.....  
CsHypF\_Kae1 391 PILLKKEVKASILAVGGFYKNTFCMTKGHYAFISHHIGDLDNEKAFNYII  
PaKae1 1 MLALGIEGT...AHTLGIGIVSEDKVLANVFD.....TLTTEKGGIH

TobZ\_Kae1 44 .....TA...PVQAAAFCLAQAGLTVDDLDVAFAFGWD.L....PAMYR  
Mj1051\_Kae1 38 .....GF...PEKSVDYILN..KVAPDEINYVSVGGV.FRRGERI....  
CsHypF\_Kae1 441 EQIERYKKLFRV.....DPEVVAHDM.....HK....  
PaKae1 40 PKEAAEHARLMKPLLRKALSEAGVSLDDIDVIAFSQGPGLGPALR....

TobZ\_Kae1 79 ERLGGWPHSDSEA..LDILLPRDVFPRRTD...PPLHFVQHHLAHAASAY  
Mj1051\_Kae1 72 .....KK..LKEFQNR.....IN...KKFLYFYHHISHSYL.F  
CsHypF\_Kae1 464 .....GYLSTQYAKSL.....D...LPKIEVQHHAHIAS.C  
PaKae1 86 .....VV..ATAARAL.....AVKYRKPIVGVNHCHIAHVEI.T

TobZ\_Kae1 124 YFS.GEDR.GAVLIVDG.....QGEEECVTLAHAEGGKIT.....V  
Mj1051\_Kae1 99 KLS.DFKE.ALVISIDG.....GGDGLSFLASIANKNNLE.....I  
CsHypF\_Kae1 492 MAEHNLDKVIIGIAYDGTGYGTGDNVWG...AEILV.....CDLKSFE  
PaKae1 116 KMF.GVKD.PVGLYVSG.....GN...TQVLALEG..GRY.....R

TobZ\_Kae1 158 LDTVPGA.....  
Mj1051\_Kae1 133 IAQSDLI.....  
CsHypF\_Kae1 532 RIAHLKYKPLPGNELAIKKIYRTALGFIFDNISFYKNFVEQVDSRELDII  
PaKae1 145 VFGETLD.....

TobZ\_Kae1 165 .....WSLGGFFYEHVSEY..TGLG....G.DNPGKLMGLAAH  
Mj1051\_Kae1 140 .....DSVGDFFYASITEL..LGFK....PMEDEGKVMSSLSY  
CsHypF\_Kae1 582 LKQIDRKINTAYVSSMGRFFDAVAALIGVRKEVLFEG.QAAMELESLM..  
PaKae1 152 .....IGIGNAIDVFARE..LGLG....F.PGGPKVEKLAEK

TobZ\_Kae1 195 GTTVDETLTSAFAFDS..DGYRLNLIDPQARDPEDWDEYSVTERAWFAHLE  
Mj1051\_Kae1 171 EGEDDINLTIDYIKELKSFKNYLG.....VIGYEATKALK  
CsHypF\_Kae1 629 AESEE.YYEYEILKEDRYVIDPEL.....ILRQIY  
PaKae1 182 GEKYI.ELPYAVKG...MDLSFSG.....LLTEAI

TobZ\_Kae1 243 RIYRLPPNEFVRRYDPAKGRVVRDTRRDPYEURDLAATAQAALERAVFGL  
Mj1051\_Kae1 207 KLIV.....QLSFEDKVRISKFAQRTLENIVLKA  
CsHypF\_Kae1 658 EDY.....MKG.FEKSYISAKFHNTVVNFYDYL  
PaKae1 208 RKYR.....SGK.YRVEDLAYSFOETAFALVEV

TobZ\_Kae1 293 ADSVLARTGERTLTFVAGGVGLNATMNGKLLTRSTVD....KMFVPP..V  
Mj1051\_Kae1 240 IDDLTNEYNIDNIVFVGGVAQNVKLNKIAEK...Y.....NLFVPP..F  
CsHypF\_Kae1 685 ANLIRKETGINKVVLSSGGSFQNRYYLLRRLIEK...LSLSGFVYSNSKVP  
PaKae1 236 TERAHAHTEKDEVVLVGGVAANNRLREMLRIM...TEDRGIKFFVPPYDL

TobZ\_Kae1 336 ASD..IGVSLGAAAVALVELGDRIAPM  
Mj1051\_Kae1 280 MGD..EGLCLGASLA...DKRIDRIN  
CsHypF\_Kae1 732 CNDGGI..SLGQAVI...ANKILEG  
PaKae1 283 CRD..N..GAMIAYT...GLRMYKAGISFRLEETIVKQKFRTEVEIVWH

## Sequenzvergleich der YrdC-ähnlichen Domänen auf Basis der gelösten Kristallstrukturen

```

TobZ_YrdC      361  GDTAAWGPEFSPDQVRAALDRTGL.....AYREPA..NLEREVAALIASG
Mj1051_YrdC   301  INNTYFGYEIENERAEKILEELKNKLNDYKIEFVEERDIPEVIGNLILDN
CsHypF_YrdC   192  SLSFVGEFCFD.....DEIKCVAKALKEG
StSua5         2   TQIIKIDPLNPEI.....DKIKIAADVIRNG

TobZ_YrdC      404  KVVGWAQGRGEVGPRALGQRSLGSAHSPTMRDHINLRVKDREWWRPFAP
Mj1051_YrdC   351  KVVCLSRGKMEFGPRALGNRSVIALP.TKENKEKINK.KLKRSWFMPFAP
CsHypF_YrdC   216  KIVAIKGIGG.....FHLAVNALDDEAVATLRR.RKKR.YGKPFVAV
StSua5         28  GTVAFPTETV.....YGLGANAFDGNACLKIFQ.AKNRPVDNPLIV

TobZ_YrdC      454  SMLRS.VSDQV.LEV....DADF.....PYMIMTTKVRAYAERLPSV
Mj1051_YrdC   399  TILYD.FIDYD.LIN....PRYS.....PFMTQIFKVKENKIKEIEGVI
CsHypF_YrdC   255  MMRDVVEEVKKY.CIVSPEEERLLLSQ..RRPI.VLLKKKGE..KLAKGIA
StSua5         68  HIADFNQLFEVAKDIPDKVLEIAQIIVWPGPLT.FVLKKT.E..RVPKEVT

TobZ_YrdC      492  HEDWSTRPQTVTEASNPRYHRMLTELGDVGDVCLNTSFNDRGEPVSS
Mj1051_YrdC   437  HVDKTRPQTLKKDSNKTFYGIIRYIYDSIGIPVVLNTSFNLHGEPVSN
CsHypF_YrdC   299  DDLDLGVMLP...YAPIHYLLMEEID....FPIVMTSGNVSEEPICKD
StSua5         114  AGLDTVAVRMP...AHPIALQLIRESG....VPIAAPSANLATRPSPK

TobZ_YrdC      542  PADALLTFSRLPIDALAVGPYLVTK
Mj1051_YrdC   487  EKDAINSFLKADFDALLLGNYLISKV
CsHypF_YrdC   341  NEEALEKLLK.DIADVFLNLRDIVNRIDDSVTSFNAGAERIIRRARGYA
StSua5         156  AEDVIVDLN.GRVDVIIDGG.HTFFGVESTIINVTVEPPVLLRPGPFTIE

```

## Abbildung 88: Strukturelles Sequenzalignment von TobZ, Mj1051, HypF, StSua5 und PaKae1

TobZ: PDB\_3VET / Mj1051: Die Reste 211-214 sind nicht im Vergleich enthalten / CsHypF: 192-388 (YrdC), 391-751 (Kae1); PDB\_3VTH / StSua5: 2-203 (YrdC); PDB\_3AJE / PaKae1: PDB\_2IVP. Für den Vergleich wurde das Programm STRAP (<http://www.bioinformatics.org/strap/>) genutzt (Gille and Frommel, 2001).

## Anhang 2

Erstellte Varianten von TobZ und Expressionslevelvergleich mit TobZ *wt*

Variante	Domäne	Aggregation	Expressionslevel im Vergleich zum <i>wt</i>	Kristalle
<i>wt</i>	-	nein	-	ja
H <sup>14</sup> N	Kae1	nein	vergleichbar	ja
N <sup>439</sup> S	YrdC	ja	stark verringert	ja
K <sup>443</sup> A	YrdC	nein	verringert	ja
R <sup>445</sup> K	YrdC	nein	vergleichbar	ja
N <sup>528</sup> A	YrdC	ja	verringert	ja
T <sup>529</sup> A	YrdC	nein	verringert	ja

Varianten von TobZ und Vergleich mit TobZ *wt*, die nicht in der Arbeit erwähnt werden

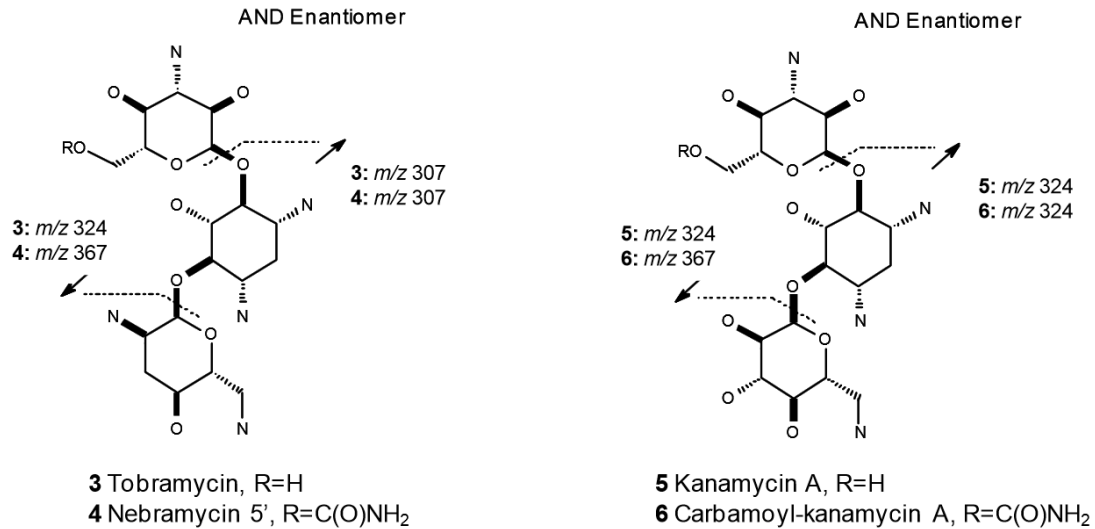
Variante	Domäne	Funktion ?	Aggregation	Expressionslevel im Vergleich zum <i>wt</i>	Kristalle
M <sup>189</sup> E	Kae1	Adenylat-Transfer	nein	erhöht	ja
H <sup>114</sup> A	Kae1	Fe <sup>2+</sup> -Bindung	ja	stark verringert	nein
D <sup>226</sup> S	Kae1	Akzeptor-Bindung	nein	vergleichbar	ja
N <sup>314</sup> A	Kae1	Nukleotid-Bindung	ja	stark verringert	nein
M <sup>189</sup> E/T <sup>476</sup> S	beide	<i>rescue</i> -Mutante zu M <sup>189</sup> E	nein	stark verringert	nein
M <sup>473</sup> I	YrdC	Nukleotid-Bindung	nein	stark verringert	ja
S <sup>530</sup> A	YrdC	Nukleotid-Bindung	nein	vergleichbar	ja
N <sup>532</sup> A	YrdC	Nukleotid-Bindung	nein	vergleichbar	ja

Die Ausbeute der jeweiligen Variante war stark abhängig vom entsprechenden Codon. Aufgrund der GC-reichen Sequenz und der damit verbundenen Sekundärstrukturausbildung der Primer konnte nicht immer das geeignetste Codon verwendet werden.

### Anhang 3

Massenspektren von Tobramycin und Nebramycin 5' sowie Kanamycin A und 6''-O-carbamoyl-Kanamycin A





**Tobramycin (3).** ESI(+)-TOF-MS,  $m/z$  (rel. int. (%)) = 468.2663 (20, [M+H]<sup>+</sup>, calc. for C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub><sup>+</sup>: 468.2664), 234.6375 (100, [M+2H]<sup>2+</sup>, calc. for C<sub>18</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub><sup>2+</sup>: 234.6368), 156.7601 (81, [M+3H]<sup>3+</sup>, calc. for C<sub>18</sub>H<sub>40</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub><sup>3+</sup>: 156.7603).

ESI(+)-CID-MS/MS of  $m/z$  234.6, [M+2H]<sup>2+</sup>, CE = 10 eV, collision gas N<sub>2</sub>;  $m/z$  (rel. int. (%)) = 324.178 (100, C<sub>12</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup>), 307.199 (36, C<sub>12</sub>H<sub>27</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>), 234.638 (15, [M+2H]<sup>2+</sup>), 205.119 (38, C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>), 187.106 (2, C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>), 163.109 (37, C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>), 162.077 (25, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup>), 145.097 (25, C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>), 144.067 (8, C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup>), 127.087 (13, C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup>).

**Nebramycin 5' (4).** ESI(+)-TOF-MS,  $m/z$  (rel. int. (%)) = 511.2722 (8, [M+H]<sup>+</sup>, calc. for C<sub>19</sub>H<sub>39</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub><sup>+</sup>: 511.2722), 256.1399 (85, [M+2H]<sup>2+</sup>, calc. for C<sub>19</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub><sup>2+</sup>: 256.1398), 171.0958 (100, [M+3H]<sup>3+</sup>, calc. for C<sub>19</sub>H<sub>41</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub><sup>3+</sup>: 171.0956).

ESI(+)-CID-MS/MS of  $m/z$  256.1, [M+2H]<sup>2+</sup>, CE = 10 eV, collision gas N<sub>2</sub>;  $m/z$  (rel. int. (%)) = 367.183 (100, C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup>), 324.177 (4, C<sub>12</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub><sup>+</sup>), 307.197 (14, C<sub>12</sub>H<sub>27</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>), 256.141 (14, [M+2H]<sup>2+</sup>), 205.117 (58, C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>), 187.106 (3, C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>), 163.108 (15, C<sub>6</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>), 145.097 (11, C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>), 144.065 (5, C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup>), 127.089 (11, C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sup>+</sup>).

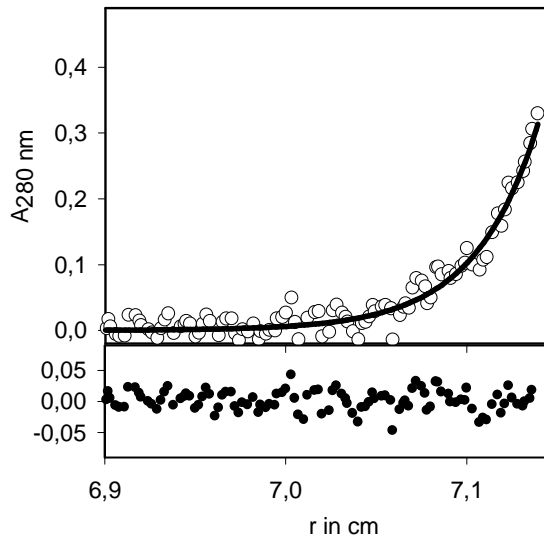
**Kanamycin A (5).** ESI(+)-TOF-MS,  $m/z$  (rel. int. (%)) = 485.2452 (20,  $[M+H]^+$ , calc. for  $C_{18}H_{37}N_4O_{11}^+$ : 485.2453), 243.1265 (100,  $[M+2H]^{2+}$ , calc. for  $C_{18}H_{38}N_4O_{11}^{2+}$ : 243.1263), 162.4195 (17,  $[M+3H]^{3+}$ , calc. for  $C_{18}H_{39}N_4O_{11}^{3+}$ : 162.4200).

ESI(+)-CID-MS/MS of  $m/z$  243.1,  $[M+2H]^{2+}$ , CE = 10 eV, collision gas  $N_2$ ;  $m/z$  (rel. int. (%)) = 324.178 (100,  $C_{12}H_{26}N_3O_7^+$ ), 243.127 (14,  $[M+2H]^{2+}$ ), 205.119 (12,  $C_8H_{17}N_2O_4^+$ ), 163.107 (35,  $C_6H_{15}N_2O_3^+$ ), 162.076 (36,  $C_6H_{12}NO_4^+$ ), 144.066 (20,  $C_6H_{10}NO_3^+$ ), 126.055 (1,  $C_6H_8NO_2^+$ ), 120.066 (1,  $C_4H_{10}NO_3^+$ ), 115.040 (3,  $C_5H_7O_3^+$ ).

**Carbamoyl-kanamycin A (6).** ESI(+)-TOF-MS,  $m/z$  (rel. int. (%)) = 528.2516 (8,  $[M+H]^+$ , calc. for  $C_{19}H_{38}N_5O_{12}^+$ : 528.2512), 264.6297 (100,  $[M+2H]^{2+}$ , calc. for  $C_{19}H_{39}N_5O_{12}^{2+}$ : 264.6292), 176.7552 (22,  $[M+3H]^{3+}$ , calc. for  $C_{19}H_{40}N_5O_{12}^{3+}$ : 176.7552).

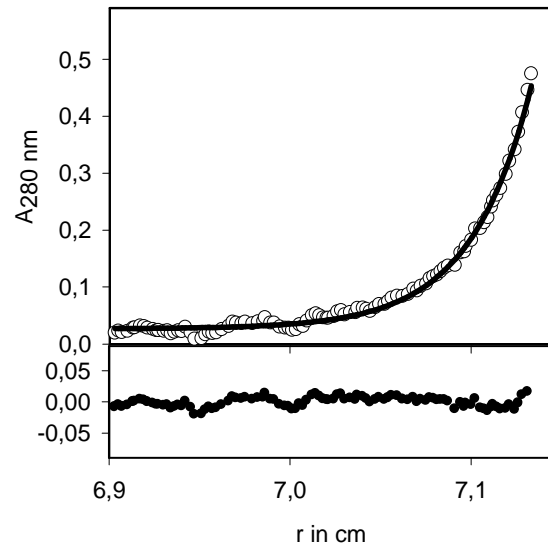
ESI(+)-CID-MS/MS of  $m/z$  264.6,  $[M+2H]^{2+}$ , CE = 10 eV, collision gas  $N_2$ ;  $m/z$  (rel. int. (%)) = 367.182 (100,  $C_{13}H_{27}N_4O_8^+$ ), 324.177 (89,  $C_{12}H_{26}N_3O_7^+$ ), 264.631 (44,  $[M+2H]^{2+}$ ), 205.109 (67, superposition of  $C_8H_{17}N_2O_4^+$  and  $C_7H_{13}N_2O_5^+$ ), 163.107 (45,  $C_6H_{15}N_2O_3^+$ ), 162.078 (27,  $C_6H_{12}NO_4^+$ ), 144.064 (46,  $C_6H_{10}NO_3^+$ ), 126.054 (6,  $C_6H_8NO_2^+$ ), 115.040 (13,  $C_5H_7O_3^+$ ).

TobZ wt + CP



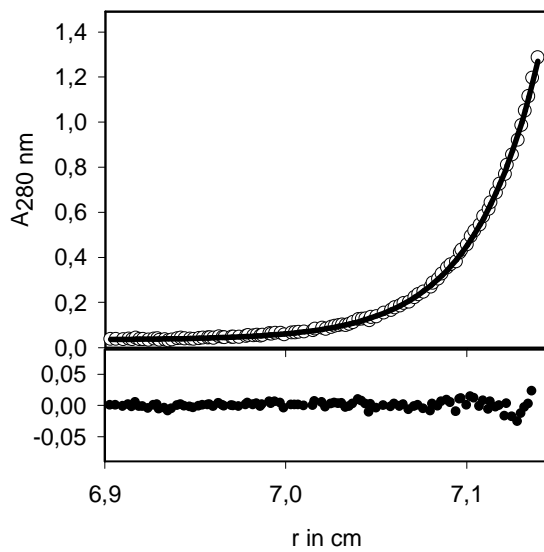
mittlere, apparente molare Masse = 122 kDa

TobZ wt + ADP



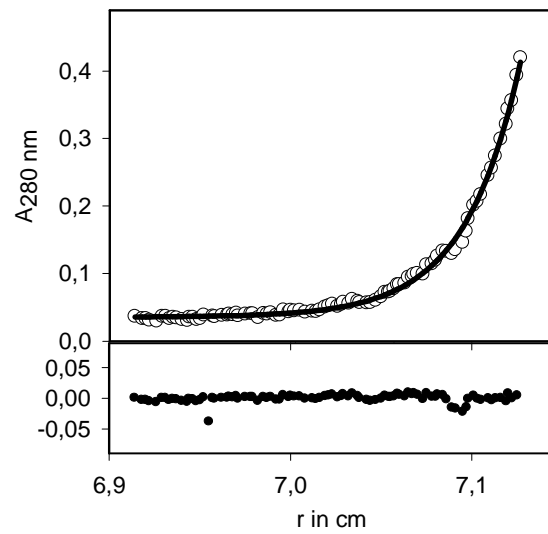
mittlere, apparente molare Masse = 127 kDa

TobZ wt + ADP + TOB



mittlere, apparente molare Masse = 119 kDa

TobZ wt + CP + ADP



mittlere, apparente molare Masse = 140 kDa

Abbildung 89: Analytische Ultrazentrifugation von TobZ in Anwesenheit von CP, ADP und TOB

Zum Vergleich von  $^{18}\text{O}$ -CP gegenüber kommerziell verfügbaren CP wurde die Aktivität der von TobZ-katalysierten Carbamoylierungsreaktion untersucht (Abbildung 90, S. 167). Der Einsatz von  $^{18}\text{O}$ -CP ist vergleichbar zu unmarkiertem CP. Nach 2 h Stunden ist ebenfalls ein ca. 50 %-iger Umsatz von Tobramycin in Anwesenheit von  $^{18}\text{O}$ -CP erkennbar.

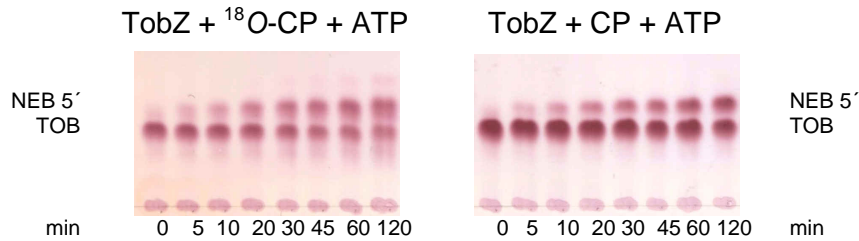


Abbildung 90: DC-Analyse der Aktivität von TobZ *wt* in Abhängigkeit von  $^{18}\text{O}$ -CP bzw. CP

## Anhang 6

Vergleich der Anordnung ausgewählter symmetrieverwandter Moleküle von TobZ im Kristall zwischen den Raumgruppen  $P4_12_12$  und  $P6_122$

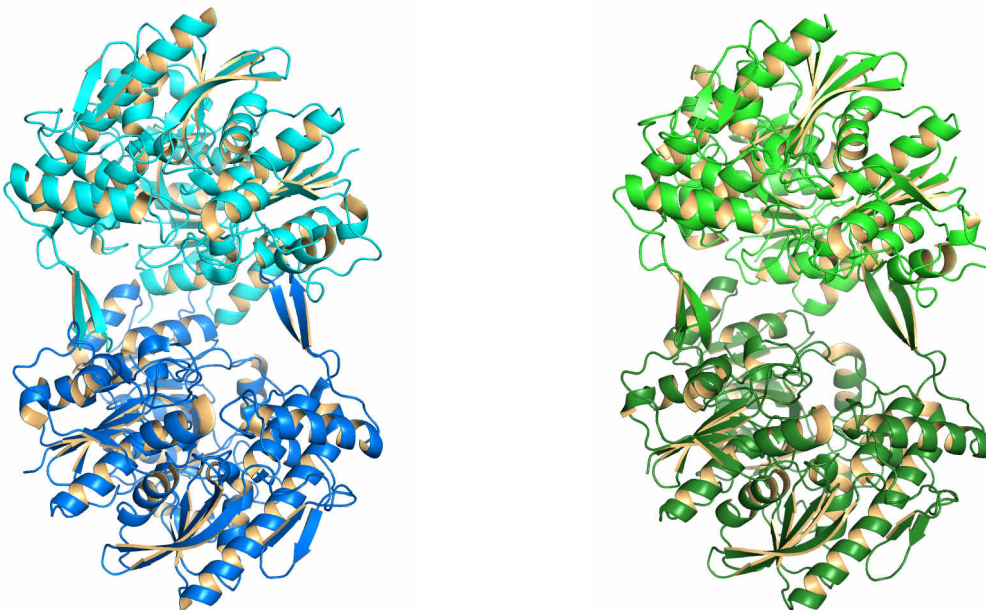
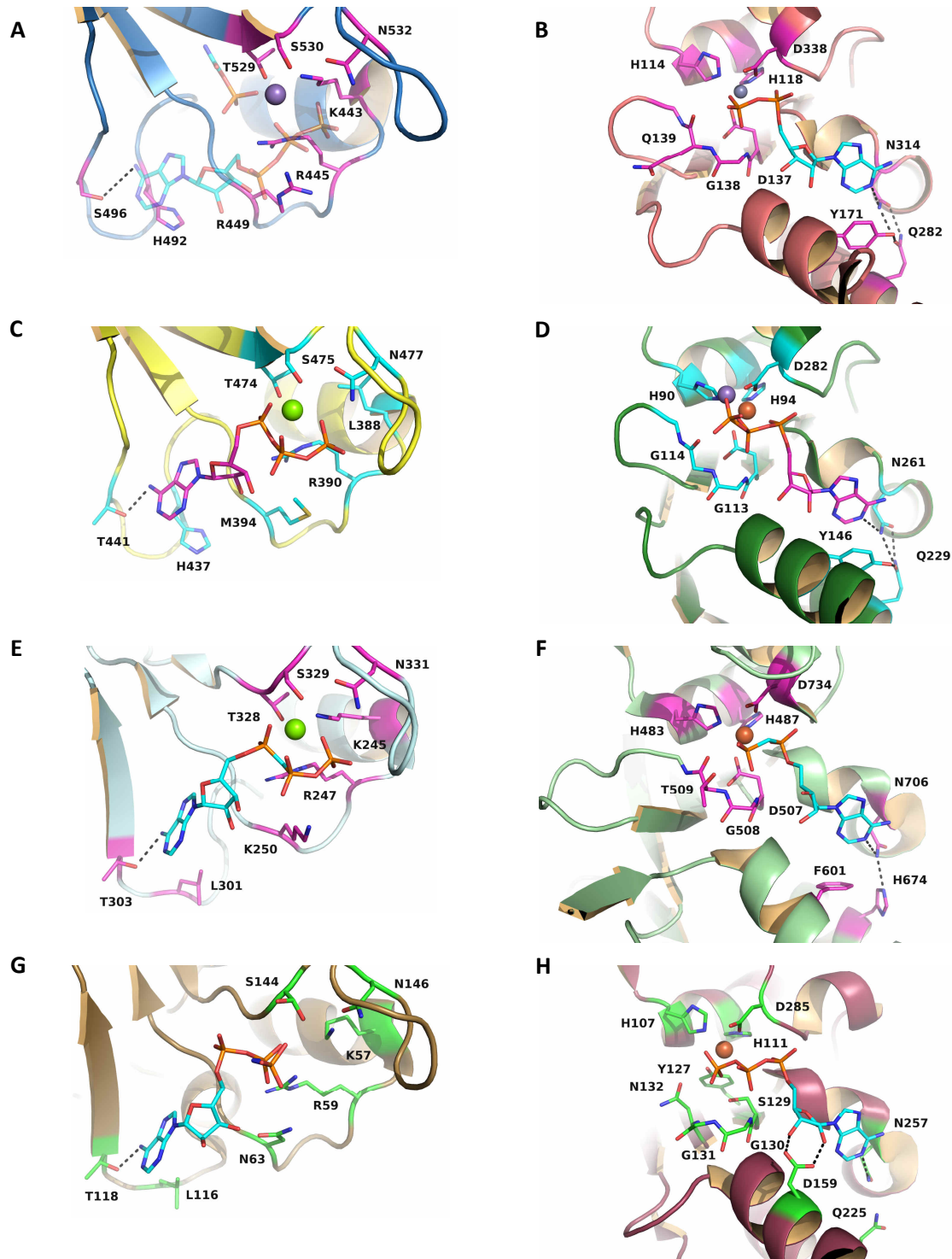


Abbildung 91: Vergleich der potentiellen Dimere von TobZ zwischen den Raumgruppen  $P4_12_12$  und  $P6_122$

A) Cartoondarstellung von TobZ in Raumgruppe  $P4_12_12$ . Die Monomere sind in blau bzw. türkis dargestellt. B) Cartoondarstellung von TobZ in Raumgruppe  $P6_122$ . Die Monomere sind in dunkelgrün bzw. hellgrün dargestellt. PDB: 3VEN (Parthier *et al.*, 2012).

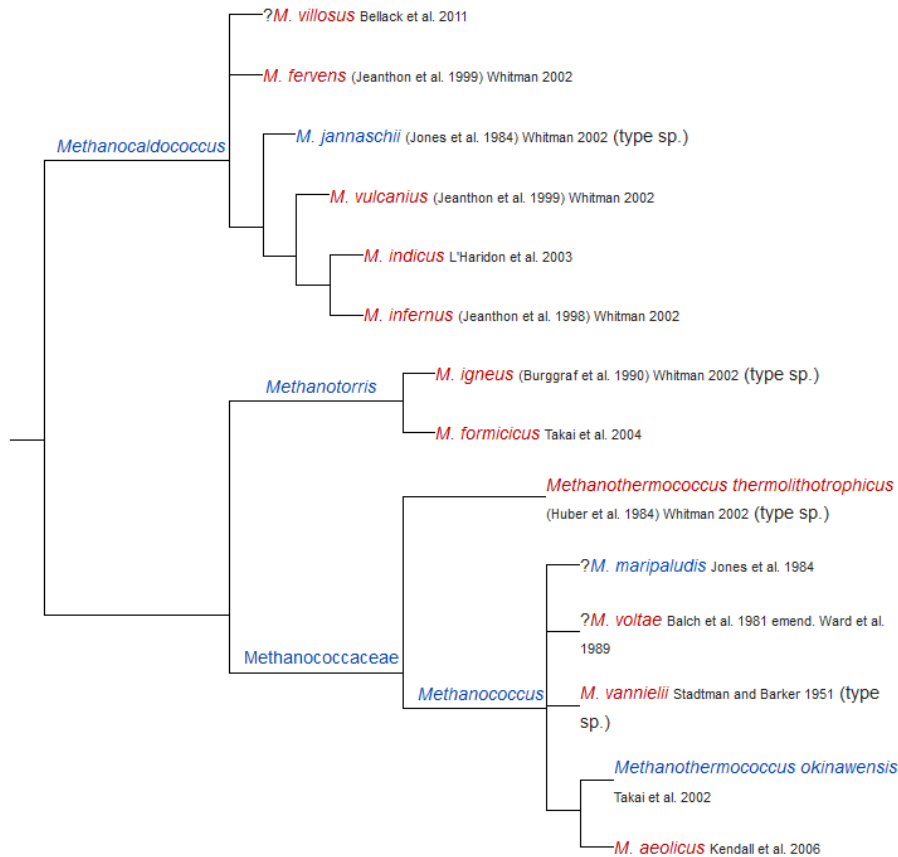
Die Kristalle von TobZ in der Raumgruppe  $P4_12_12$  konnten in der folgenden Bedingung erhalten werden: 1,5 M Ammoniumsulfat, 25 % Glycerin

## Anhang 7



**Abbildung 92: Vergleich der Ligand-gebundenen Strukturen von TobZ, Mj1051, HypF, StSua5 und PaKae1**

Cartoondarstellung der YrdC-ähnlichen Domäne von TobZ (blau, A), Mj1051 (gelb, C), CsHypF (grau, E) bzw. der Kae1-ähnlichen Domäne von TobZ (rot, B), Mj1051 (grün, D), und HypF (hellgrün, F). Die YrdC-Domäne von StSua5 ist in dunkel-gelb (G) und PaKae1 ist in dunkel-rot (H) gefärbt. Nicht-C-Atome sind mit den üblichen Farben versehen, wobei die Färbung der C-Atome von Bild zu Bild unterschiedlich ist. Wasserstoffbrückenbindungen (Abstand: 2,2 - 3,5 Å) sind in schwarz gefärbt. Das Magnesiumion ist als grüne Kugel, das Eisenatom ist als braune Kugel dargestellt. CsHypF PDB: 3VTH; StSua5 PDB: 3AJE; PaKae1 PDB: 2IVP



### Phylogenetische Abstammung der Ordnung Methanococcales

Abbildung übernommen aus <http://en.wikipedia.org/wiki/Methanococcales>; abgerufen am 01.01.2015

Die Operons wurde anhand des Servers: *Prokaryotic Operon DataBase* aufgestellt (Taboada *et al.*, 2010; Taboada *et al.*, 2012).

Gleiches Operon wie Mj1051 in *M. jannaschii*

- ***Methanocaldococcus* sp. JH146 (JH146\_0596 / A0A076LAP4)**
- ***Methanocaldococcus fervens* (Mefer\_0110 / C7P5X0)**
- ***Methanocaldococcus* sp. (strain FS406-22) (MFS40622\_0874 / D3S3Z2)**
- ***Methanotorris igneus* (Metig\_0707 / F6BCP6)**

Co-Expression mit RNA 3'cylase und einer Archease

- ***Methanococcus maripaludis* C5** (MmarC5\_0955 / A4FYH7)
- ***Methanococcus maripaludis* KA1** (MMKA1\_07000 / A0A090AX43)
- ***Methanococcus maripaludis* C7** (MmarC7\_1673 / A6VJV5)
- ***Methanococcus maripaludis* OS7** (MMOS7\_06950 / A0A090AWV7)
- ***Methanococcus maripaludis* S2** (MMP0649 / Q6LZH9)
- ***Methanococcus maripaludis* C6** (MmarC6\_0240 / A9A7D7)
- ***Methanococcus vannielii* SB** (Mevan\_1544 / A6USG4)

Operon mit Aspartyl tRNA Synthase und elongation factor Tu domain 2 protein

- ***Methanocaldococcus infernus* ME** (Metin\_0977 / D5VST2)

Isoliertes Gen entsprechend Mj1051

- ***Methanococcus voltae* A3** (Mvol\_0863 / D7DTR2)
- ***Methanocaldococcus vulcanius* M7** (Metvu\_1457 / C9RIA8)
- ***Methanothermococcus okinawensis*** (Metok\_0890 / F8AMN2)
- ***Methanococcus aeolicus* Nankai-3** (Maeo\_1051 / A6UVV7)

## Anhang 9

Datensatz	Adenylat TobZ wt	Adenylat-S TobZ wt	ATPaS TobZ T <sup>529</sup> A	ATP TobZ R <sup>445</sup> K	ATP TobZ N <sup>439</sup> S	Adenylat TobZ K <sup>443</sup> A	Adenylat TobZ N <sup>528</sup> A
Puffer	Tartrat	Tartrat	Tartrat	Tartrat	Sulfat / Tartrat	Tartrat	Sulfat / Tartrat
Röntgenquelle	BESSY BL14.1	BESSY BL14.1	Kupferanode	Kupferanode	Kupferanode	BESSY BL14.1	BESSY BL14.1
Wellenlänge in Å	0,9184	0,9184	0,9184	1,5418	1,5418	0,9184	0,9184
Auflösung in Å	30 – 2,34	100 – 2,21	30 – 2,34	30 – 2,3	30 – 2,4	30 – 2,3	30 – 2,5
Raumgruppe	P6 <sub>1</sub> 22	P6 <sub>1</sub> 22	P6 <sub>1</sub> 22	P6 <sub>1</sub> 22	P6 <sub>1</sub> 22	P6 <sub>1</sub> 22	P6 <sub>1</sub> 22
Einheitszelle							
a; b; c in Å	99,3; 99,3; 281,3	99,2; 99,2; 280,3	99,8; 99,8; 280,8	99,4; 99,4; 281,1	100,0; 100,0; 280,4	99,3; 99,3; 279,4	99,3; 99,3; 280,5
α; β; γ in °	90; 90; 120	90; 90; 120	90; 90; 120	90; 90; 120	90; 90; 120	90; 90; 120	90; 90; 90
Moleküle pro AE	1	1	1	1	1	1	1
R <sub>meas</sub> in %	9,0 (61,2)	10,5 (83)	10,7 (69,9)	7,7 (55,4)	8,8 (58,4)	11,5 (70,5)	13,3 (55,8)
I / σI	16,2 (2,5)	12,6 (1,9)	13,3 (2,8)	21,9 (3,7)	28,7 (5,7)	13,2 (2,7)	10,7 (2,7)
Vollständigkeit in %	99,7 (100)	99,5 (99,4)	99,5 (100)	99,1 (96,9)	99,9 (99,9)	99,9 (100)	99,7 (99,7)
Multiplizität	4,1 (4,2)	3,5 (3,6)	5,7 (5,5)	7,4 (5,9)	11,9 (12,2)	5,9 (6,0)	3,9 (3,9)
<b>refinement</b>							
<b>R<sub>work</sub> / R<sub>free</sub></b>	0,145 / 0,176	0,21 / 0,249	0,195 / 0,247	0,21 / 0,25	0,22 / 0,27	0,21 / 0,26	0,20 / 0,26
<b>PDB code</b>	3VER	-	-	-	-	-	-



Datensatz	TOB, ATP $\alpha$ S TobZ H <sup>14</sup> N	Dibekacin TobZ wt	G418 TobZ wt	TobZ wt
Puffer	Tartrat	Tartrat	Tartrat	Sulfat
Röntgenquelle	BESSY BL14.1	BESSY BL14.1	BESSY BL14.1	BESSY BL14.1
Wellenlänge in Å	0,9184	0,9184	0,9184	0,9184
Auflösung in Å	30 – 2,8	30 – 2,14	30 – 2,2	100 – 3,0
Raumgruppe	P6 <sub>1</sub> 22	P6 <sub>1</sub> 22	P6 <sub>1</sub> 22	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Einheitszelle				
a; b; c in Å	99,3; 99,3; 279,7	99,9; 99,9; 280,7	100,1; 100,1; 281,6	98,5; 98,5; 161,5
$\alpha$ ; $\beta$ ; $\gamma$ in °	90; 90; 120	90; 90; 120	90; 90; 120	90; 90; 90
Moleküle pro AE	1	1	1	1
R <sub>meas</sub> in %	10,8 (42,8)	10,3 (62,1)	8,7 (57,8)	15,2 (62,6)
I / $\sigma$ I	17,9 (4,6)	14,9 (2,8)	21,0 (4,3)	11,5 (2,8)
Vollständigkeit in %	99,6 (99,5)	99,8 (99,9)	99,9 (99,8)	96,8 (98,6)
Multiplizität	5,8 (6,0)	5,1 (5,2)	13,6 (9,7)	7,1 (7,2)
<b>refinement</b>				
<b>R<sub>work</sub> / R<sub>free</sub></b>	0,191 / 0,24	0,221 / 0,27	0,22 / 0,26	0,21 / 0,29
<b>PDB code</b>	-	-	-	-

Datensatz	SeMj1051	ADP SeMj1051	ATP SeMj1051	ATP Mj1051	Adenylat SeMj1051	Adenylat SeMj1051
Puffer	Jeffamine	MPD	Jeffamine	MPD	MPD	MPD pH 8
Röntgenquelle	BESSY BL14.1	Kupferanode	SLS	Kupferanode	Kupferanode	Kupferanode
Wellenlänge in Å	0,9184	1,5418	0,976	1,5418	1,5418	1,5418
Auflösung in Å	30 – 2,0	30 – 1,75	30 – 1,8	30 – 2,1	30 – 1,8	30 – 2,1
Raumgruppe	C2	P22 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	C2	P22 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P22 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P22 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Einheitszelle						
a; b; c in Å	116,3; 78,9; 56,5	46,3; 96,0; 172,0	116,4; 78,8; 56,8	46,5; 96,1; 171,3	46,5; 96,0; 171,6	46,5; 96,0; 171,6
α; β; γ in °	90; 98,1; 90	90; 90; 90	90; 98,0; 90	90; 90; 90	90; 90; 90	90; 90; 90
Moleküle pro AE	1	1	1	1	1	1
R <sub>meas</sub> in %	8,1 (37,5)	6,2 (61,0)	16,4 (56,5)	8,8 (51,5)	5,1 (36,0)	6,4 (21,4)
I / σI	10,0 (2,7)	16,7 (2,3)	11,5 (3,2)	12,9 (2,3)	23,8 (3,4)	26,6 (9,7)
Vollständigkeit in %	98,9 (98,1)	99,1 (99,2)	97,9 (94,1)	97,1 (91,5)	99,0 (94,3)	98,0 (95,7)
Multiplizität	2,7 (2,6)	3,7 (3,7)	5,0 (3,4)	2,7 (2,0)	5,0 (2,4)	7,3 (7,3)
<b>refinement</b>						
<b>R<sub>work</sub> / R<sub>free</sub></b>	0,205 / 0,253	0,233 / 0,263	0,189 / 0,230	0,237 / 0,279	0,227 / 0,257	0,187 / 0,226
<b>PDB code</b>	-	-	-	-	-	-

## Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An vorderster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Milton T. Stubbs für das in mich gesetzte Vertrauen bedanken, dieses interessante Thema in seiner Arbeitsgruppe bearbeiten zu dürfen. Nicht nur ich werde mich mit einem Schmunzeln an die intensiven Diskussionen über die zahlreichen Facetten dieses Projektes zurückerinnern.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Christoph Parthier, der immer ein offenes Ohr für die Probleme des wissenschaftlichen Alltags hatte und mir die Grundlagen der Röntgenkristallographie näher brachte.

Des Weiteren gebührt ein besonderer Dank Uwe Fandrich, der einen großen Anteil am Gelingen meiner Arbeit hatte. Die gemeinsame Zeit in und außerhalb des Labors werden mir immer in Erinnerung bleiben.

Dr. Christoph Böttcher danke ich für die Übernahme der Massenspektren der Antibiotika,  
Dr. Martin Dippe für die Hilfestellung bei einigen Synthesen und Hinweise zum Nachweis der Antibiotika mittels Ninhydrin-Färbung,  
PD Dr. Hauke Lilie für die Übernahme der analytischen Ultrazentrifugation,  
Pia Rosenberg für die Hilfe im Labor, wodurch mir viel Zeit erspart blieb,  
Dr. Marco Fischer für die Hinweise und Ratschläge zum Nachweis der antibiotischen Wirkung mittels Bioautographie,  
und dem BESSY II Team um Dr. Manfred Weiss und Dr. Uwe Müller für die Unterstützung zur Datensammlung am Synchrotron.

Ich möchte mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Stubbs sowie der gesamten Belegschaft der Abteilung Physikalische Biotechnologie für die nette Arbeitsatmosphäre als auch für die Versüßung der "Schoki"-Pausen bedanken.

Ich danke meiner Frau Josephin, meiner Familie und meinen Freuden die mich auf meinem bisherigen Weg unterstützt haben und ohne die das Gelingen dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

**Lebenslauf**

Name: Stefan Görlich

Geburtsdatum: 12.08.1985

Geburtsort: Oschatz

- 10/2010 - 05/2015 Dissertation unter Anleitung und in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Milton T. Stubbs, Abteilung Physikalische Biotechnologie am Institut für Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zum Thema: „Strukturelle und biochemische Charakterisierung von O-Carbamoyltransferasen“
- 09/2010 Abschluss des Studiums als Diplom-Biochemiker
- 11/2009 - 08/2010 Anfertigung der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Milton T. Stubbs, Physikalische Biotechnologie am Institut für Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mit dem Titel: „Biophysikalische Charakterisierung der Interaktion zwischen der Ezrin FERM Domäne und den monomeren GTPasen Gem und Rac1“
- 10/2005 - 09/2010 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 10/2004 - 06/2005 Grundwehrdienst
- 1996 - 2004 Pestalozzi-Gymnasium Oschatz
- 1992 - 1996 Grundschule Dahlen

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht. Ferner erkläre ich, dass ich mich mit dieser Arbeit an keiner anderen Hochschule oder Universität um die Erlangung eines akademischen Grades beworben habe.

Halle (Saale), den 03.11.2015

Stefan Görlich