



WESTFÄLISCHE  
WILHELMS-UNIVERSITÄT  
MÜNSTER

Biochemie

# Konformationelle Dynamik in A- und PCP-Domänen der nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Jonas Alfermann  
aus Werne

-2015-

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
2.1	Die nicht-ribosomale Peptidsynthese . . . . .	4
2.1.1	Aufbau nicht-ribosomaler Peptidsynthetasen (NRPS) . . . . .	8
2.1.2	Mechanismus der nicht-ribosomalen Peptidsynthese . . . . .	11
2.1.3	Adenylierungsdomänen . . . . .	12
2.1.4	<i>Peptidyl Carrier Protein</i> -Domänen . . . . .	23
2.1.5	Kondensationsdomänen . . . . .	29
2.1.6	Thioesterasedomänen . . . . .	31
2.1.7	Strukturelle Dynamik und Interaktionen von NRPS-Domänen . . . . .	33
2.1.8	Gramicidin S . . . . .	39
2.1.9	Grenzen des Verständnisses von NRPS . . . . .	40
2.2	Strukturelle Dynamik in zu NRPS homologen Proteinen . . . . .	41
2.3	Konformationelle Dynamik in Proteinen . . . . .	42
2.4	Förster-Resonanzenergietransfer . . . . .	45
2.4.1	Physikalischer Hintergrund . . . . .	45
<b>3</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>Material</b>	<b>53</b>
4.1	Geräte . . . . .	53
4.2	Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien . . . . .	54
4.3	Vektoren . . . . .	56
4.3.1	pET16b . . . . .	56
4.3.2	pET28a . . . . .	56
4.3.3	pQE-60 . . . . .	56
4.3.4	pREP4 . . . . .	56
4.4	Primer . . . . .	56
4.5	Mikroorganismen . . . . .	58
4.6	Medien . . . . .	58
4.7	Puffer . . . . .	58

<b>5 Methoden</b>	<b>60</b>
5.1 Herstellung der Expressionsplasmide . . . . .	60
5.1.1 Ausgangsplasmide . . . . .	61
5.1.2 A-PCP-eGFP Fusionskonstrukte . . . . .	61
5.1.3 Weitere Plasmide . . . . .	62
5.2 Heterologe Expression und Proteinreinigung . . . . .	65
5.2.1 Heterologe Expression in <i>Escherichia coli</i> . . . . .	65
5.2.2 Zellernte und Zellaufschluss . . . . .	65
5.2.3 Affinitätschromatographische Proteinreinigung . . . . .	65
5.2.4 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	66
5.3 Modifizierung von NRPS-Enzymen . . . . .	66
5.3.1 Chemische Modifizierung von Cysteinseitenketten und Reinigung modifizierter Proteine . . . . .	66
5.3.2 Posttranslationale Phosphopantheteinylierung von NRPS-Enzymen	67
5.3.3 Bestimmung der Markierungseffizienz . . . . .	68
5.4 Charakterisierung von NRPS-Enzymen . . . . .	69
5.4.1 Native Polyacrylamidgelelektrophorese . . . . .	69
5.4.2 Bestimmung der Adenylierungsaktivität . . . . .	70
5.4.3 Bestimmung der Thioesterbildung mittels [ <sup>3</sup> H]-markierten Ami- nosäuren . . . . .	71
5.4.4 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Proteinkonfor- mation . . . . .	72
<b>6 Ergebnisse</b>	<b>77</b>
6.1 Herstellung eines A-PCP FRET-Sensors . . . . .	79
6.2 Charakterisierung des A-PCP-eGFP Fusionsproteins . . . . .	83
6.3 Einfluss der Substrate auf die Konformation von <i>holo</i> -A-PCP-eGFP . . . . .	88
6.4 Konzentrationsabhängigkeit der FRET-Signalentwicklung . . . . .	93
6.5 Simulation der Konformationen des FRET-Sensors . . . . .	96
6.6 Die Bindung von PP <sub>i</sub> blockiert Konformationswechsel . . . . .	100
6.7 Ein Mechanismus zur Ladungsdetektion im aktiven Zentrum . . . . .	106
6.8 Schlüsselaminosäuren im <i>domain alternation</i> -Mechanismus . . . . .	114
6.8.1 Die Mutation K517A destabilisiert die Adenylierungskonformation	115
6.8.2 Lys434 ist essentiell für die Stabilisierung der T-Konformation . .	121
6.8.3 Arg439 hat geringen Einfluss auf die Thiolierungskonformation .	124

6.9	Die Rolle der Ppant-Modifizierung in der A-PCP-Interaktion . . . . .	126
6.9.1	Die Phosphopantetheinylierung ist essentiell für stabile A-PCP-Interaktionen . . . . .	128
6.9.2	Die Ausbildung des Thioesters hat keinen Einfluss auf die A-PCP-Interaktion . . . . .	131
6.10	Die Bedeutung des <i>Linkers</i> für die A-PCP-Interaktion . . . . .	135
6.11	FRET-gestützte Bestimmung der Selektivität von GrsA . . . . .	138
6.12	Durch Phe-Analoga induzierte Konformationen der A-Domäne . . . . .	141
<b>7</b>	<b>Diskussion</b>	<b>145</b>
7.1	Funktionsweise des A-PCP FRET-Sensors . . . . .	145
7.2	Substrate stabilisieren die Konformationen der A-Domäne . . . . .	146
7.2.1	Stabilisierung der Konformationen unter nicht-reaktiven Bedingungen . . . . .	146
7.2.2	Ungewöhnliches Bindungsverhalten des Inhibitors Phe-AMS . . . . .	148
7.3	Enzymatische Katalyse und Proteinkonformation . . . . .	150
7.3.1	Kontrolle der Adenylierungskonformation und -reaktion . . . . .	150
7.3.2	Koordinierung von Aminoacyladenylat- und Thioesterbildung mit der T-Konformation . . . . .	156
7.3.3	Die Verdrängung des $Mg^{2+}$ -Ions aus dem aktiven Zentrum gewährleistet katalytische Funktion . . . . .	159
7.4	Die Dynamik der Interaktionen von A- und PCP-Domäne . . . . .	160
7.4.1	Phosphopantethein ist entscheidend für die A-PCP-Interaktion . . . . .	160
7.4.2	Einfluss der Thioesterbildung auf A-PCP-Interaktionen . . . . .	163
7.4.3	Die Orientierung der PCP-Domäne ist nicht an die Subdomänenrotation der A-Domäne gekoppelt . . . . .	166
7.4.4	Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Thioesterbildung . . . . .	168
7.4.5	Vergleich mit früheren Arbeiten zur A-PCP-Interaktion . . . . .	171
7.5	Bindung von Substraten und Inhibitoren . . . . .	173
7.5.1	Bestimmung der Substratspezifität der A-Domäne . . . . .	173
7.6	Die Funktionsweise des Substrat- <i>channeling</i> in NRPS . . . . .	175
<b>8</b>	<b>Ausblick</b>	<b>179</b>
8.1	Protein-Protein-Interaktionen . . . . .	179
8.1.1	Weiterführende Untersuchungen zum Substrat <i>channeling</i> in NRPS . . . . .	179
8.1.2	Untersuchung der „Scharnierregion“ der A-Domäne . . . . .	180
8.1.3	Struktur und Zusammensetzung des A-PCP- <i>Linkers</i> . . . . .	182

8.2	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung weiterer NRPS-Proteine . . .	184
8.2.1	Neue Modifizierungsstrategien . . . . .	184
8.2.2	Übertragung des Sensor-Prinzips auf andere NRPS-Domänen . . .	186
8.2.3	FRET-Studien an Multidomänenkonstrukten . . . . .	187
8.3	Weitere Methoden zur Untersuchung der Organisation von NRPS . . . .	188
8.4	Protein-Ligand-Interaktionen . . . . .	190
8.4.1	Design und Screening spezifischer ANL-Inhibitoren . . . . .	190
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>193</b>
9.1	Abbildungen . . . . .	193
9.2	Tabellen . . . . .	206
9.3	MATLAB-Script . . . . .	213
<b>Literatur</b>		<b>215</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	<b>223</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>225</b>