

Peptidinhibitoren der Transpeptidase Sortase A aus
Staphylococcus aureus

und

Untersuchungen zur Ovoidiol A-Biosynthese in
Erwinia tasmaniensis

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie der Technischen Universität Dortmund

angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund

vorgelegt von

Dipl. Biologin Andrea Braunhausen
aus Neunkirchen (Saar)

März 2012

Die vorliegende Arbeit wurde in dem Zeitraum von März 2008 bis März 2012 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in der Abteilung Physikalische Biochemie von Prof. Dr. Roger S. Goody unter der Leitung von Prof. Dr. Florian P. Seebeck angefertigt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Roger S. Goody

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Roland Winter

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
1.1 Peptidinhibitoren der Transpeptidase SrtA aus <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.2 Untersuchungen zur Ovoidiol A-Biosynthese in <i>Erwinia tasmaniensis</i>	2
2. Peptidinhibitoren der Transpeptidase SrtA aus <i>Staphylococcus aureus</i>.....	4
2.1 Einleitung.....	4
2.1.1 Bakterielle Infektionen: Ablauf und zugrunde liegende Mechanismen.....	4
2.1.2 Antibiotika.....	7
2.1.2.1 Antibiotika mit hemmender Wirkung auf die Folsäurebiosynthese.....	8
2.1.2.2 Antibiotika mit hemmender Wirkung auf die Zellwandbiosynthese.....	8
2.1.2.3 Antibiotika mit hemmender Wirkung auf die ribosomale Proteinbiosynthese...	9
2.1.2.4 Antibiotika mit hemmender Wirkung auf die DNA-Replikation und Reparatur...	10
2.1.2.5 Einfluss der bakteriellen Zellhülle auf die Wirkung von Antibiotika.....	11
2.1.3 Antibiotikaresistenzen.....	11
2.1.3.1 Herkunft.....	11
2.1.3.2 Antibiotikaresistenzen bei <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.1.3.2.1 <i>S. aureus</i> -Resistenzmechanismen gegen die Zellwandbiosynthese hemmende Antibiotika.....	13
2.1.3.2.2 <i>S. aureus</i> -Resistenzmechanismen gegen die Proteinbiosynthese hemmende Antibiotika.....	14
2.1.3.2.3 <i>S. aureus</i> -Resistenzmechanismen gegen die DNA-Replikation hemmende Antibiotika.....	15
2.1.4 Die notwendige Suche nach neuen Antibiotika.....	16
2.1.5. Oberflächenassoziierte Virulenzfaktoren in <i>S. aureus</i>	17
2.1.6. SrtA	18
2.1.7 SrtA als Zielprotein neuer antimikrobieller Wirkstoffe.....	20
2.1.8 SrtA-Inhibitoren.....	21
2.2 Zielsetzung.....	22
2.3 Ergebnisse.....	23
2.3.1 Proteinherstellung.....	23
2.3.2 Peptidherstellung.....	28
2.3.3 K_d -Werte der Peptidinhibitoren und SrtA _{ΔN59}	31

2.3.3.1 K_d -Werte der fluoresceinmarkierten Peptidinhibitoren und SrtA.....	33
2.3.3.1 K_d -Werte der unmarkierten Peptidinhibitoren und SrtA $_{\Delta N59}$	36
2.3.4 Enthalpie, Entropie und Stöchiometrie der Bindung zwischen linearer oder zyklischer P1-Peptidsequenz und SrtA $_{\Delta N59}$	36
2.3.5 <i>In vitro</i> Inhibition der SrtA $_{\Delta N59}$ durch die Peptidinhibitoren.....	41
2.3.5.1 Entwicklung eines SrtA-Aktivitätsassays.....	41
2.3.5.2 IC_{50} -Werte der Peptidinhibitoren im entwickelten SrtA-Aktivitätsassays.....	48
2.3.6 Inhibitionsmechanismus der Peptidinhibitoren an SrtA $_{\Delta N59}$	51
2.3.7 K_{off} -Wert des Komplexes SrtA $_{\Delta N59}$:P1 $_{5FAM}$ (linear).....	56
2.3.8 <i>In vivo</i> Bindung der Peptidinhibitoren an SrtA.....	58
2.3.8 Versuche zur <i>in vivo</i> Inhibition von SrtA durch P2 $_{unmarkiert}$	65
2.4 Diskussion.....	67
2.4.1 Bestimmung der K_d -Werte der Peptidinhibitoren und SrtA $_{\Delta N59}$	67
2.4.1.1 Bestimmung der K_d -Werte der fluoresceinmarkierten Peptidinhibitoren und SrtA $_{\Delta N59}$	67
2.4.1.2 Bestimmung der K_d -Werte der fluoresceinmarkierten Peptidinhibitoren und dem Komplex (SrtA $_{bio}$:Avidinmonomer) $_4$	68
2.4.1.3 Bestimmung der K_d -Werte der unmarkierten Peptidinhibitoren und SrtA $_{\Delta N59}$	68
2.4.1.4 Übertragbarkeit des Assays zur Bestimmung der K_d -Werte der unmarkierten Peptidinhibitoren auf SrtA-Inhibitoren allgemein.....	70
2.4.2 K_{off} -Wert des Komplexes SrtA $_{\Delta N59}$:P1 $_{5FAM}$ (linear).....	71
2.4.3 ITC-Messungen zur Ermittlung von ΔH , ΔS und N	73
2.4.4 IC_{50} -Werte der unmarkierten Peptidinhibitoren an SrtA $_{\Delta N59}$	74
2.4.4.1 Entwicklung IC_{50} -Assay.....	74
2.4.4.2 ermittelte IC_{50} -Werte.....	78
2.4.5 <i>In vivo</i> Bindung der Peptidinhibitoren an SrtA.....	79
2.4.6 Versuche zur <i>in vivo</i> Inhibition von SrtA durch P2 $_{unmarkiert}$	81
2.4.7 Fazit.....	84

3. Untersuchungen zur Ovothiol A Biosynthese in <i>Erwinia tasmaniensis</i>.....	86
3.1 Einleitung.....	86
3.1.1 Ovothiol A.....	86
3.1.2 Biosynthese von Ovothiol A.....	88
3.1.3 Enzyme der Ovothiol A-Biosynthese.....	89
3.1.3.1 Die Sulfoxidsynthase OvoA.....	89
3.1.3.2 Die β -Lyase OvoB.....	90
3.2 Zielsetzung.....	91
3.2.1 Die Fe ²⁺ -Koordination in OvoA aus <i>E. tasmaniensis</i>	91
3.2.2 Die Funktion von Arg ¹⁸³ in OvoA aus <i>E. tasmaniensis</i>	92
3.2.3 Codiert das Gen ETA_14770 aus <i>E. tasmaniensis</i> OvoB?.....	92
3.3 Ergebnisse.....	94
3.3.1 Untersuchungen zu OvoA.....	94
3.3.1.1 Herstellung und Charakterisierung der OvoA-Varianten.....	94
3.3.1.2 OvoA-Aktivitätstests.....	96
3.3.2 Untersuchungen zu OvoB.....	98
3.3.2.1 Herstellung von OvoB.....	98
3.3.3.3 Charakterisierung der Substratspezifität von OvoB.....	98
3.4 Diskussion.....	102
3.4.1 Untersuchungen zu OvoA.....	102
3.4.1.1 Fe(II)-Koordination.....	102
3.4.1.2 Arginin ¹⁸³	103
3.4.2 Untersuchungen zu OvoB.....	103
4. Material.....	105
4.1 Instrumentation.....	105
4.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	106
4.3 Enzyme.....	107
4.4 Kits.....	108
4.5 Bakterienstämme.....	108
4.6 Oligonukleotide.....	108
4.7 Vektoren.....	109
4.8 Puffer und Lösungen.....	110

4.9 Medien	111
4.10 Software	111
5. Methoden	112
5.1 Herstellung und Analytik der verwendeten Peptide	112
5.1.1 Peptidherstellung.....	112
5.1.1.1 Beladung Harz, Aufbau eines PPO-Linkers.....	112
5.1.1.2 Automatisierte Peptidsynthese.....	112
5.1.1.3 Fluorescein-Markierung am Harz.....	112
5.1.1.4 Abspaltung vom Harz.....	113
5.1.1.5 Intramolekulare Verbrückung Cysteine.....	113
5.1.2 Peptidaufreinigung und Analytik.....	113
5.1.3 Bestimmung der Peptidkonzentration.....	114
5.2 Herstellung und Analytik der verwendeten Proteine	114
5.2.1 Klonierung.....	114
5.2.1.1 Gewinnung von Plasmid-DNA.....	115
5.2.1.2 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	116
5.2.1.3 Insertgewinnung.....	116
5.2.1.3.1 Annealing der Oligonukleotidpaare der P1-Inserts.....	116
5.2.1.3.2 Herstellung modifizierter OvoA-Gene mittels Overlap Extension PCR.....	116
5.2.1.4 Restriktionsverdau.....	117
5.2.1.5 Ligation.....	118
5.2.1.6 Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> XL1-Blue-Zellen.....	118
5.2.1.7 Transformation der Ligationsansätze in <i>E. coli</i> XL1-Blue-Zellen.....	118
5.2.1.8 Sequenzierung.....	119
5.2.1.9 Herstellung von Glycerolstocks.....	120
5.2.2 Proteingewinnung.....	120
5.2.2.1 Herstellung Hitzekompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (Expressionsstämme).....	120
5.2.2.2 Hitzeschock-Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i> -Expressionsstämme.....	120
5.2.2.3 Proteinexpression.....	121
5.2.2.4 Proteinaufreinigung.....	122
5.2.2.5 MBP-P1 Zyklisierung.....	123
5.2.2.6 Gewinnung des (SrtA _{bio} :Avidinmonomer) ₄ -Komplexes.....	123
5.2.3 Proteinanalytik.....	124

5.3 Messungen	125
5.3.1 Fluoreszenzpolarisation-Messungen.....	125
5.3.1.1 K_d -Bestimmung direkt.....	125
5.3.1.2 K_d -Bestimmung indirekt.....	126
5.3.1.3 Ermittlung der IC_{50} -Werte der unmarkierten Peptide / Fusionsproteine bezüglich SrtA $_{\Delta N59}$	127
5.3.1.3.1 Etablierung des SrtA-Aktivitätsassays	127
5.3.1.3.2 Messung der IC_{50} -Werte.....	129
5.3.1.4 K_{off} -Wert-Bestimmung für den Komplex SrtA $_{\Delta N59}$:P1 $_{5FAM}$ (linear).....	130
5.3.2 ITC-Messungen.....	130
5.3.3 HPLC-Messungen.....	132
5.3.3.1 Umsetzung des Substrates LPETGK $_{5FAM,Biotin}$ G durch SrtA $_{\Delta N59}$	132
5.3.3.2 Inhibitionsmechanismus der fluoresceinmarkierten Peptide an SrtA $_{\Delta N59}$	132
5.3.3.3 Vergleich der Aktivität von OvoA $_{wt}$ und diverser OvoA-Mutanten.....	133
5.3.4 <i>In vivo</i> -Studien an <i>S. aureus</i> -Zellen.....	133
5.3.4.1 Bindung der fluoresceinmarkierten Peptide an <i>S. aureus</i> -Zellen.....	133
5.3.4.2 Untersuchungen zur <i>in vivo</i> Inhibition von SrtA durch das Peptid P2 $_{unmarkiert}$ anhand der Bestimmung des Fibrinogen-Clumpingtiters.....	134
5.3.5 UV / VIS-Messungen zur Bestimmung der katalytischen Effizienz von OvoB bezüglich diverser Substrate.....	135
 6. Anhang	 137
6.1 Prinzip der Fluoreszenzpolarisation.....	137
6.2 Prinzip der Isothermalen Titrations Kalorimetrie.....	139
6.3 verwendete Gleichungen.....	141
6.4 Aminosäuresequenzen der hergestellten Proteine.....	144
 7. Literaturverzeichnis	 146
 8. Abkürzungsverzeichnis	 157
 9. Danksagung	 161

1. Zusammenfassung

1.1 Peptidinhibitoren der Transpeptidase Sortase A aus *Staphylococcus aureus*

Sortase A (SrtA) aus *Staphylococcus aureus* ist eine membranverankerte Transpeptidase, welche Vorläufermoleküle oberflächenassoziiierter Virulenzfaktoren anhand des Motivs LPXTG erkennt und an der Zelloberfläche verankert. Aus einem gegen SrtA gerichteten mRNA Display gingen dem LPXTG-Motiv ähnelnde putative SrtA-Binder hervor (Seebeck, unpublizierte Daten). In der vorliegenden Arbeit wurden diese zyklischen Peptidsequenzen hinsichtlich ihrer Interaktion mit SrtA charakterisiert. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf der Relevanz der Peptidzyklisierung für diese Interaktion. Die untersuchten Peptidsequenzen wurden eindeutig als SrtA-Inhibitoren klassifiziert. Es wurden hierzu *in vitro* Methoden zur Ermittlung der K_d -Werte, Reaktionsprofile, Bindungsstöchiometrien, IC_{50} -Werte und des Inhibitionsmechanismus entwickelt. Zudem wurde ein Assay zur Quantifizierung der *in vivo*-Bindung der Peptidinhibitoren an *S. aureus*-Zellen etabliert. Zur Ermöglichung der genannten Untersuchungen wurden die Peptidinhibitoren als MBP- und GFP-Fusionsproteine und / oder als C-terminal PEG₃-modifizierte und z.T. N-terminal fluoresceinmarkierte Peptide hergestellt. SrtA wurde als lösliche Variante ohne Membrananker heterolog in *E. coli* exprimiert.

Die Dissoziationskonstanten der Peptidinhibitoren und SrtA liegen im niedrigen nanomolaren Bereich (10 - 94 nM). Dies konnte anhand eines erstmalig für SrtA angewendeten direkten bzw. indirekten Fluoreszenzpolarisationsassays für die fluoresceinmarkierten bzw. unmarkierten Peptidinhibitoren ermittelt werden. Weder die Variation der C- und N-terminalen Modifikationen, noch das Vorhandensein oder Fehlen einer Zyklisierung der Peptidsequenzen beeinflussen deren Bindungsaffinitäten an SrtA in signifikanter Weise. Die Reaktionsprofile der Bindung an SrtA wurden exemplarisch für die zyklische und lineare Variante einer Peptidsequenz mittels ITC bestimmt. Die Bindungen sind enthalpiegetrieben, wobei die Entropie kaum eine Änderung erfährt und die Peptidsequenzzyklisierung das Bindungsgeschehen nicht beeinflusst. Ebenfalls aus den ITC-Messungen geht eine 1:1-Bindungsstöchiometrie hervor. Zur Ermittlung der IC_{50} -Werte der Peptidinhibitoren an SrtA wurde ein ausreichend sensibler SrtA-Aktivitätsassay entwickelt. Mit Hilfe dieses, auf Fluoreszenzpolarisation basierenden, Assays wurden den Peptidinhibitoren SrtA- IC_{50} -Werte im einstelligen mikromolaren Bereich (0,4 - 3,7 μ M) zugewiesen. Auch für die SrtA- IC_{50} -Werte sind die unterschiedlichen N- und C-terminalen Modifikationen und eine Zyklisierung der Peptidsequenzen ohne signifikante Bedeutung. Durch HPLC-basierte Versuche und Verdrängungstests wurde der Inhibitionsmechanismus als langsam reversibel definiert.

Exemplarisch für eine Peptidsequenz wurde für den Inhibitor:SrtA-Komplex ein K_{off} -Wert von $0,7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und eine Halbwertszeit von 990 s ermittelt. Für die Quantifizierung der *in vivo* Bindung der fluoresceinmarkierten Peptidinhibitoren an SrtA wurde ein fluoreszenzbasierter Bindungsassay für *S. aureus*-Flüssigkulturen entwickelt. Exemplarisch für den Peptidinhibitor mit der höchsten Bindungsaffinität an *S. aureus*-Zellen wurde die Sequenzspezifität der *in vivo* Bindung experimentell bestätigt. Eine *in-vivo*-Inhibition der SrtA durch diesen Peptidinhibitor konnte nicht gezeigt werden. Aufgrund seiner geringen Löslichkeit konnte er nur in einer maximalen Konzentration von ca. 30 μM eingesetzt werden. In dieser Konzentration senkte er nicht den von der SrtA-Aktivität abhängigen Fibrinogen-Clumpingtiter von *S. aureus* Zellen.

Durch eine Erhöhung der Peptidinhibitorlöslichkeit, z.B. aufgrund geeigneter N- und C-terminaler Modifikationen, und den Einsatz entsprechend höherer Peptidinhibitor-konzentrationen, könnte eine *in vivo* Inhibition der SrtA vermutlich detektiert werden. Die ermittelten Eigenschaften der hier charakterisierten peptidischen SrtA-Inhibitoren sprechen für eine Fortsetzung der Studien. Da die K_{d} - und IC_{50} -Werte nicht von der Variation des N- und / oder C-Terminus beeinflusst werden, könnte die Löslichkeit und Bioverfügbarkeit der Peptidinhibitoren optimiert werden. Eine Resistenzausbildung wäre unwahrscheinlich. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen den Peptidinhibitoren und dem LPXTG-Erkennungsmotiv der SrtA-Substrate, würde eine SrtA-Mutante, welche eine geringere Affinität zu den Peptidinhibitoren aufweist, einen Funktionsverlust zeigen. Um diesen auszugleichen, müsste in den Erkennungsmotiven aller 21 Vorläufermolekülen der durch SrtA an der Zellwand verankerten Virulenzfaktoren eine entsprechende Mutation auftreten. Ein auf den hier untersuchten Peptidsequenzen beruhendes Antibiotikum müsste nur in relativ geringen Konzentrationen appliziert werden. Zum einen müsste es nicht die Cytoplasmamembran des Bakteriums überwinden, da SrtA auf der Membranaußenseite lokalisiert ist, und zum anderen sind langsam reversible Inhibitoren mit niedrigen K_{d} -Werten vielversprechende Leitstrukturen, da sie in relativ geringen Plasmakonzentrationen wirksam sind.

1.2 Untersuchungen zur Ovoidiol A-Biosynthese aus *Erwinia tasmaniensis*

Die Ovoidiol A-Biosynthese in *E. tasmaniensis* beruht auf drei enzymatischen Schritten, einer Synthese, einer β -Elimination und einer Methylierung (Vogt et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden die Produkte eines Ovoidiol A Sulfoxidsynthase Gens (*OvoA*) und eines Ovoidiol A β -Lyase Gens (*OvoB*) aus *E. tasmaniensis* charakterisiert.

1. Zusammenfassung

Die Sulfoxidsynthese der Ovothiol A-Biosynthese ist Fe^{2+} und O_2 abhängig (Vogt et al., 2001). *OvoA* enthält die konservierte Sequenz His-X₃-His-X-Glu, welche dem Eisenbindungsmotiv aus 2 Histidinseitenketten und einer Glutamin- oder Asparaginsäureseitenkette Mononuklearer Nicht-Häm-Eisen(II)-Enzyme (reviewed in Koehntop et al., 2005) entspricht. Es wurde überprüft, ob das Motiv His¹⁷⁰-X₃-His¹⁷⁴-X-Glu¹⁷⁶ der Ovothiol A-Sulfoxidsynthese (*OvoA*) für die Eisenkoordination verantwortlich ist. Hierzu wurden die Mutationen H170A, H174A und E176A jeweils in *OvoA* eingeführt. *OvoA*_{wt} und die *OvoA*-Mutanten wurden heterolog in *E. coli* exprimiert und in einem hohen Reinheitsgrad als Dimere aus dem Zellysate gewonnen. Aktivitätstests zeigten, dass im Gegensatz zu *OvoA*_{wt}, keine der drei *OvoA*-Mutanten fähig ist, Histidin und Cystein in das Ovothiol A-Intermediat S-4-(Histidyl)-Cystein-Sulfoxid umzusetzen. Dieses Ergebnis ermöglichte, in Zusammenhang mit weiteren in der Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchungen zur Substratspezifität und Fe^{2+} -Abhängigkeit der *OvoA*_{wt}, die eindeutige Identifizierung von *OvoA* als codierendes Gen für die Ovothiol A-Sulfoxidsynthese in *E. tasmaniensis* (Braunshausen und Seebeck, 2011, enthält Teile der vorliegenden Arbeit). Ergänzend wurde die Relevanz des in *OvoA* konservierten Arg¹⁸³ untersucht. Hierzu wurden die Mutanten *OvoAR183A* und *OvoAR183K* hergestellt. *OvoAR183A* zeigte einen vollständigen Aktivitätsverlust und *OvoAR183K* einen erheblichen Aktivitätsverlust. Vermutlich sind an Position 183 positive Ladungen zur Koordination des Substrates Cystein für die *OvoA*-Aktivität erforderlich.

Das Genprodukt von *OvoB* wurde heterolog in *E. coli* exprimiert und in einem hohen Reinheitsgrad als monomeres Holoenzym aus dem Zellysate gewonnen. Die Umsatzraten des Enzyms wurden für diverse Substrate bestimmt. Das von *OvoA* gelieferte Intermediat S-4-(Histidyl)-Cystein-Sulfoxid wird 10 bis $8 \cdot 10^5$ -fach effizienter von der Ovothiol A β -Lyase (*OvoB*) umgesetzt als die übrigen untersuchten Substrate. Eine Ausnahme hierzu bildet das Substrat S-(β -Amino- β -carboxyethyl)-Ergothionein-Sulfoxid des zu *OvoB* homologen Enzyms *EgtE*, welches nur um 25% weniger effizient umgesetzt wird als S-4-(Histidyl)-Cystein-Sulfoxid. Insgesamt lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass es sich bei dem untersuchten Genprodukt von *OvoB* um die β -Lyase *OvoB* der Ovothiol A-Biosynthese in *E. tasmaniensis* handelt und diese eine geringe Substratspezifität aufweist.

2. Peptidinhhibitoren der Transpeptidase Sortase A aus *Staphylococcus aureus*

2.1 Einleitung

Forschungsarbeiten zu Inhibitoren der Sortase A (SrtA) sind von großem Interesse, da SrtA als vielversprechender Ansatzpunkt neuer Medikamente gilt (Maresso und Schneewind, 2008). Insbesondere *S. aureus*-Stämme entwickeln sehr häufig Antibiotikaresistenzen und verursachen oft tödlich verlaufende nosokomiale Infektionen. Da der Ablauf einer bakteriellen Infektion, die Mechanismen des Immunsystems und die bereits bekannten Antibiotikaresistenzen die Wissensgrundlage für die Entwicklung antimikrobieller Wirkstoffe bilden, wird im Folgenden zunächst eine Einführung in diese Themen gegeben.

2.1.1 Bakterielle Infektionen: Ablauf und zugrunde liegende Mechanismen

(nach Madigan et al., 2000, Kayser et al., 1993, Vollmar und Dingermann 2005)

Unter der Vielfalt der Bakterienspezies, deren Lebensweisen von Lithoautotroph und Phototroph über Mischformen (Mixotroph, Photoheterotroph) bis hin zur Chemoheterotrophie reichen, ist nur ein geringer Anteil der chemoheterotrophen Bakterien humanpathogen. Dieser Anteil aber war bis zur Mitte des 20. Jahrhunderts weltweit eine bedeutende menschliche Todesursache, wobei Epidemien, wie die durch *Corynebacterium diphtheriae* hervorgerufenen, insbesondere die Kindersterblichkeit auf einem hohen Niveau hielten. Seit den 1940er Jahren hat eine Therapie durch Antibiotika in den Industriestaaten die Mortalität bakterieller Infektionen drastisch reduziert. Jedoch führt das Auftreten antibiotikaresistenter Bakterienstämme trotz intensiver medizinischer Behandlung wieder zunehmend zu tödlichen Infektionsverläufen.

Die Pathogenität beruht auf einer Spezialisierung der Bakterien, der Wirtskörper als Lebensraum fordert wie andere ökologische Nischen eine Anpassung seiner Bewohner. Wobei zu bemerken ist, dass die für den Wirt (der folgende Text bezieht sich auf Säugetiere als Wirte) nützlichen Kommensalen diesen nur, als sogenannte „Normalflora“, oberflächlich besiedeln, denn wenn auch der hoch besiedelte Verdauungstrakt und der Respirations- und Urogenitaltrakt dem Anschein nach im Inneren des Körpers liegen, so sind sie in Wirklichkeit eine nach Innen gestülpte Außenwelt. Eine Invasion in den Wirtskörper (Infektion), durch eindringen in Zellen, Lymphe, Blut, Gewebe oder Organe, wie Pathogene sie vornehmen, ist immer ein unerwünschtes Ereignis für den Wirt, und wird von diesem durch ein Arsenal von Abwehrmechanismen zu verhindern versucht. Die Fähigkeit diese Wirtsabwehr zu umgehen, ist die besondere Eigenschaft aller Pathogene.

2.1 Einleitung

Der erste Schritt einer bakteriellen Infektion ist die Adhärenz. Die Bakterienzellen müssen sich zuerst an das Wirtsgewebe anheften, bevor sie in dieses eindringen können. Sie binden mittels Oberflächenstrukturen wie Haftpili, Fimbrien und Membranproteinen an die Epithelzellen des Wirts. Aber auch Implantate können den Bakterien als Anheftungsort dienen. Hierfür ist die Bindungsaffinität zu wirtseigenen Matrixproteinen, die wiederum die Implantate überziehen, verantwortlich.

Nach der Anheftung erfolgt die Invasion der Bakterien in den Wirt. Dies kann auf drei unterschiedliche Weisen stattfinden. Im einfachsten Fall dringen die Mikroorganismen über Mikro- und Makrotraumata der (Schleim-) Haut in den Wirt ein. Eine andere Methode besteht darin, solche Mikrotraumata der Haut aktiv durch das Ausscheiden von zell- und gewebschädigenden Exoenzymen herbeizuführen. Völlig verschieden hiervon ist der Mechanismus der „parasitendeterminierten Endozytose“, wobei die Keime nach der Anheftung an die Epithelzelle von dieser durch Endozytose aufgenommen, in einem endozytotischen Vesikel transportiert und schließlich auf der Subserosa-Seite des Epithels durch die Verschmelzung des Vesikels mit der Membran wieder freigesetzt werden. Mit der Invasion in den Wirt haben die Krankheitserreger bereits die mechanischen Barrieren der unspezifischen Immunabwehr, wie Haut, Säureschutzmantel, Schleimsekretion und -fluss, Ziliarbewegung des Respirationstraktes, Peristaltik des Darmtraktes und Harnstrom im Urogenitaltrakt, überwunden. Nach erfolgreicher Wirtsinvasion können sich die Krankheitserreger über die Lymph- oder Blutbahn und die Schädigung von Geweben durch Exoproteasen im Wirtsorganismus verbreiten. Hierzu müssen die Bakterien die nächste Verteidigungslinie der unspezifischen Immunabwehr überwinden. Als erstes sei genannt, dass die Körperflüssigkeiten des Wirtes keine freien Eisenionen enthalten. Fe^{3+} ist an das Eisentransportprotein Transferrin oder das Depot-Eisenprotein Ferritin gebunden, wohingegen Fe^{2+} entweder an Hämoglobin gebunden vorliegt, oder von Ferritin zu Fe^{3+} oxidiert und in dieser Form gespeichert wird (Harrison und Arosio, 1996). Da Bakterien Eisen für ihr Wachstum benötigen, entreißen sie mittels der Sekretion von Siderophoren Eisenionen dem Transferrin oder Hämoglobin. Die wichtigste Rolle jedoch in der Immunabwehr des Wirts spielt die Phagozytose. Phagozyten sind „Fresszellen“, die Mikroorganismen chemotaktisch auffinden, binden, phagozytieren und dann abtöten. Hierbei dienen bakterielle Peptide als Lockstoff und Komponenten des Komplementsystems des Wirts. Das Komplementsystem ist ein aus über 20 Aktivator- und Regulationsproteinen bestehendes humorales enzymatisches Kaskadensystem. Innerhalb der zunächst stattfindenden unspezifischen Immunantwort erkennen Rezeptoren des Komplementsystems sogenannte PAMPs (pathogen-associated molecular pattern), zu denen z.B. Lipid A-Strukturen der gramnegativen und die Lipoteichonsäure der grampositiven Bakterien

gehören. Die Erkennung der PAMPs durch das Komplementsystem führt zu einer proteolytischen Spaltungskaskade, wobei unter anderem die C3b-Komponente an den Mikroorganismus gebunden wird und chemotaktisch wirksame Spaltprodukte entstehen. Die angelockten Phagozyten binden das Bakterium über PAMP-Rezeptoren und Rezeptoren für die C3b-Komponente. Einige Tage nach dem Infektionsbeginn tritt zusätzlich die spezifische Immunantwort auf. Es werden spezifische, lösliche Antikörper produziert, die an Antigene des Bakteriums binden. Der Fc-Locus der Antikörper, welcher sich am der Antigenbindungsstelle gegenüberliegenden Ende des Antikörpers befindet, wird sowohl von Rezeptoren des Komplementsystems als auch der Phagozyten erkannt. Die spezifische Immunantwort verstärkt also sowohl die Anlockung der Phagozyten als auch das Bindungsvermögen der Phagozyten an den entsprechenden Mikroorganismus. Nach der rezeptorvermittelten Kontaktherstellung umfließt die Phagozyte das Bakterium, bis es sich in einer membranumgebenen Vakuole (Phagosom) im Inneren der Phagozyte befindet. Das Phagosom fusioniert mit einem Lysosom zum Phagolysosom, in welchem das Bakterium schließlich durch verschiedene Mechanismen getötet wird. Zum einen spielen dabei abbauende Enzyme und ein saurer pH-Wert, und zum anderen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies, die von der NADPH-Oxidase und der induzierbaren NO-Synthase gebildet werden, eine Rolle. Es gibt zwei Varianten von Phagozyten: die langlebigen Makrophagen, und die kurzlebigen neutrophilen Granulozyten. Makrophagen können nach ihrer Aktivierung durch die Bindung an ein Bakterium Zytokine freisetzen, die der Induzierung weiterer Abwehrmechanismen dienen, wie z.B. neutrophile Granulozyten an den Infektionsherd zu locken und nach einer Phagozytose wieder in den Ruhezustand zurückkehren. Die neutrophilen Granulozyten hingegen sterben kurz nach der Phagozytose ab. Bakterien können die Erkennung durch Phagozyten auf unterschiedliche Weise umgehen. Sie können die Einverleibung durch die Ausbildung von Kapseln erschweren oder die Erkennung durch PAMP-Rezeptoren und Antikörper verhindern, indem sie deren Zielstrukturen modifizieren. Zum einen kann dies durch „Molekulare Mimikry“ geschehen. Hierbei passt der Mikroorganismus seine Oberflächenproteine strukturell denen des Wirts an und wird daher nicht als fremd erkannt. Zum anderen können Bakterien auch eine hohe Antigenvariabilität aufweisen. Hierbei werden die Antigene derart schnell variiert, dass die spezifisch produzierten Antikörper immer wieder ihre Wirkung verlieren. Konnte die Phagozytose nicht verhindert werden, so können die Abtötungsmechanismen im Inneren der Phagozyte von Bakterien umgangen werden, indem sie die Lysosom-Phagosom-Fusion hemmen, eine Resistenz gegenüber lysosomalen Enzymen aufweisen oder die Bildung der reaktiven Sauerstoffspezies im Phagolysosomen hemmen. Die Anpassung an die Phagozytose durch

2.1 Einleitung

Mikroorganismen kann bis zur Nutzung von Makrophagen als Verbreitungsmittel und Vermehrungsort führen.

Viele dieser Umgehungsmechanismen der Mikroorganismen beruhen auf der Produktion bestimmter Zelloberflächen- oder Exoproteine, die zusammenfassend als Virulenzfaktoren bezeichnet werden. Da diese nur im Wirt und nicht alle zum gleichen Zeitpunkt benötigt werden, unterliegen sie einer Regulation, die den Aufenthalt des Bakteriums innerhalb oder außerhalb des Wirtes und das Stadium der Infektion, d.h. die Populationsdichte des entsprechenden Bakteriums, berücksichtigt.

Die Schädigung bis hin zur Tötung des Wirts durch eine bakterielle Infektion beruht auf verschiedenen Ursachen. Zum einen schädigen die von den Bakterien ausgeschiedenen Proteasen lokal die Gewebe und zum anderen verbreiten sich die von ihnen ausgeschiedenen Toxine im Wirtskörper und lösen unterschiedlichste Reaktionen aus. So sondert z.B. das Bakterium *Clostridium tetani* Tetanospasmin ab, welches zu Muskellähmungen und –krämpfen und schließlich dem Tod des Wirts durch Erstickung führt. Zum anderen hat die Immunabwehr selbst gewebeschädigende Folgen. So werden z.B. mikrobentötende Inhaltstoffe der Lysosomen oder Granula beim Absterben der Phagozyten, oder direkt von Zellen der Immunabwehr, wie eosinophilen Granulozyten, in die Umgebung freigesetzt und schädigen außer den Mikroorganismen auch das umliegende Wirtsgewebe.

2.1.2 Antibiotika

(nach Walsh, 2003)

Der Gebrauch von Antibiotika seit den 1940er Jahren und die Durchimpfung der Bevölkerung seit den 1960er Jahren nahm in den entwickelten Ländern den bakteriellen Krankheitserregern ihren Schrecken. Antibiotika sind Moleküle die Bakterien töten (bakterizide Wirkung) oder am Wachstum hindern (bakteriostatische Wirkung) und sind entweder Naturprodukte, bzw. von diesen abgewandelt oder synthetischen Ursprungs. Viele der medizinisch eingesetzten Antibiotika entstammen Pilzen. In der Umwelt verbreiteter sind jedoch Antibiotika bakteriellen Ursprungs. Gehen die Nährstoffe eines Habitats aus und eine Bakterienpopulation folglich gezwungener Maßen in die stationäre Phase über, so beginnt die Produktion antimikrobieller Wirkstoffe. Diese sollen Bakterien anderer Spezies töten oder am Wachstum hindern, woraus zwei Vorteile erwachsen. Die knappen Nährstoffe müssen nicht mehr mit Konkurrenten geteilt werden, sondern werden, ganz im Gegenteil, durch die Überreste der abgestorbenen Bakterien gemehrt. Es wurden in den vergangenen 70 Jahren zahlreiche Antibiotika entdeckt und ihre Wirkmechanismen untersucht. Ausschlaggebend für eine Nutzung als Medikament ist hierbei, dass die Antibiotika selektiv auf Mikroorganismen

wirken, Mensch und Tier allerdings nicht schädigen. Es muss also ein Stoffwechselfvorgang in den Mikroorganismen gestört werden, den es in Mensch und Tier entweder nicht gibt, oder für den die beteiligten Enzyme genügend große Differenzen aufweisen. Aufgrund der verschiedenen Angriffspunkte im Mikroorganismus können Antibiotika in vier Hauptklassen unterteilt werden.

2.1.2.1 Antibiotika mit hemmender Wirkung auf die Folsäurebiosynthese

Das weltweit erste vermarktete Antibiotikum, das seit den 1930ern eingesetzte Prontosil, gehört zur Gruppe der Sulfonamide. Es handelt sich hier um voll synthetische Moleküle, die im Rahmen der Farbstoffherstellung produziert wurden und deren antimikrobielle Wirkung später entdeckt wurde. Sulfonamide hemmen das Enzym Dihydropteroatsynthase des Folsäurebiosynthesewegs und führen folglich zu einer Erschöpfung der Folsäure und damit zum Tod der Mikroorganismen. Diese Wirkung betrifft sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien. Somit waren Sulfonamide nicht nur die ersten Antibiotika generell, sondern gleichzeitig auch die ersten Breitbandantibiotika und sind bis heute noch, wenn auch nur eingeschränkt, im Einsatz. Da der Folsäurebiosyntheseweg in Menschen nicht vorhanden ist, ist er ein für Mikroorganismen selektives Angriffsziel und die Nebenwirkungen der Sulfonamide sind daher gering.

2.1.2.2 Antibiotika mit hemmender Wirkung auf die Zellwandbiosynthese

Nach den Sulfonamiden wurde 1928 entdeckte Penicillin auf dem Markt eingeführt. Es wird von Pilzen der Gattung *Penicillium* ausgeschieden. Penicillin blockiert die bakterielle Zellwandsynthese; Ein für Bakterien selektives Ziel, da das gesamte Reich der Tiere keine Zellwandsynthese betreibt und die Zellwände im Pflanzen- und Pilzreich sehr verschieden von denen der Bakterien sind. Die Bakterienzellwand ist eine stabile, starre Umhüllung der Zelle und schützt diese vor einer osmotischen Lyse. Während des Zellwachstums / der Zellteilung muss die Zellwand lückenlos mitwachsen, um eine osmotische Zellyse zu verhindern. Ist die Zellwandbiosynthese gehemmt, kann kein Zellwachstum / keine Zellteilung stattfinden. Die Zellwand besteht aus Peptidoglykan, auch Murein genannt, einer Polysacharidkette, die alternierend aus den beiden Bausteinen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure aufgebaut ist. Über Tetrapeptide sind die Polysacharidketten quervernetzt. Die gesamte Zellwand stellt ein einziges, riesiges Molekül dar. Bei grampositiven Bakterien ist die Peptidoglykanhülle aus bis zu 40 Schichten aufgebaut und bildet die äußerste Begrenzung des Bakteriums. Die gramnegativen Bakterien besitzen

hingegen eine wesentlich dünnere Peptidoglykanschicht, dafür ist diese aber von einer zweiten, äußeren Zellmembran umhüllt (Kayser et al., 1993). Es können ganz verschiedene Schritte der Zellwandbiosynthese durch Antibiotika gehemmt werden. Von der Synthese der Zellwandmonomere, dem Zusammensetzen der Monomere zu Vorläufermolekülen, über deren Translokation durch die Zytoplasmamembran bis hin zur Vernetzung der Vorläufermoleküle mittels Transglykosylasen und Transpeptidasen zur fertigen Zellwand. Penicillin und alle weiteren β -Lactamantibiotika z. B. binden an das aktive Zentrum der Transpeptidasen, so dass diese irreversibel gehemmt sind und die Zellwand aufgrund fehlender Quervernetzung ihre Stabilität verliert. Vancomycin, ein Glykopeptidantibiotikum, bindet mit hoher Affinität an den C-Terminus des D-Ala-D-Ala Dipeptids der Zellwandvorläufermoleküle und verhindert so die Quervernetzung der Zellwand durch Transpeptidasen (Reynolds, 1989). Antibiotika, welche die Zellwandsynthese hemmen, sind bakteriostatisch, d.h. sie töten nur Bakterien ab, die im Wachstum begriffen sind, da nur dann die Zellwandsynthese von Nöten ist. Bakterien in der stationären Phase nehmen keine Veränderungen ihrer fertigen Zellwand vor und werden daher von Inhibitoren der Zellwandbiosynthese nicht beeinträchtigt. Dennoch sind bakteriostatische Antibiotika sehr wirkungsvolle Medikamente, da sich nicht vermehrende Bakterien keinen ernsthaften Gegner für das Immunsystems darstellen.

2.1.2.3 Antibiotika mit hemmender Wirkung auf die ribosomale Proteinbiosynthese

Die Ribosomen von Prokaryoten und Eukaryoten unterscheiden sich erheblich, weshalb das bakterielle Ribosom ein selektives Angriffsziel für Antibiotika darstellt. Das bakterielle Ribosom besteht zu zwei Dritteln aus RNA und zu einem Drittel aus Proteinen. Die kleinere der beiden ribosomalen Untereinheiten, die 30S-Untereinheit setzt sich aus 20 Proteinen und der ca. 1500 bp umfassenden 16S-rRNA zusammen. Die größere 50S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms besteht aus 30 Proteinen und der 2900 bp umfassenden 23S-rRNA sowie der 120 bp umfassenden 5S-rRNA. Die mRNA, die für die Aminosäuresequenz des zu synthetisierenden Proteins codiert, verläuft durch einen Tunnel der 30S-Untereinheit, wobei nur 6 Nukleotide, das Peptidylcodon und das stromabwärts folgende Aminoacylcodon, der 50S-Untereinheit zugänglich sind. Die Bindung der mRNA an die 30S-Untereinheit des Ribosoms erfolgt über die Ribosomenbindungsstelle (Shine-Dalgarno-Sequenz) der mRNA. Sie liegt stromaufwärts des Startcodons und bildet Basenpaarungen mit der komplementären Anti-Shine-Dalgarno-Sequenz der 16S-rRNA der 30S-Untereinheit (Culver, 2001, Yusupova et al., 2001). Die tRNA-Moleküle transportieren die Aminosäuren zum Ribosom. Entsprechend ihrer verschiedenen Anticodons werden sie zuvor von der jeweiligen

Aminoacyl-tRNA-Synthetase mit ihrer spezifischen Aminosäure beladen. Zwei tRNA's können zu einem Zeitpunkt mittels ihrer Anticodons Basenpaarungen mit den zwei, der 50S-Untereinheit zugänglichen, mRNA-Codons bilden. Ihre mit den Aminosäuren beladenen Enden ragen dabei tief in die 50S-Untereinheit hinein. Die Aminosäure bzw. Polypeptidkette wird von der tRNA in der Peptidylstelle auf die tRNA in der Aminoacylstelle durch die von der 23S-rRNA vermittelten Peptidyltransferaseaktivität des Ribosoms übertragen (Nissen et al., 2000). Um die Elongation der Polypeptidkette zu ermöglichen, bewegt sich das Ribosom nun an der mRNA entlang ein Codon stromabwärts. Die unbeladene, deacetylierte tRNA verschiebt sich dadurch von der Peptidyl- zur Exitstelle, die Peptidkette tragende tRNA von der Aminoacylstelle zur Peptidylstelle und die Aminoacylstelle wird frei um eine neue tRNA aufnehmen zu können. Der gesamte Vorgang kann an zahlreichen der einzelnen Schritte durch Antibiotika blockiert werden. Das 1943 auf dem Markt eingeführte Streptomycin, ein Aminoglykosidantibiotikum, beeinträchtigt z. B. die Translationspräzision (Carter et al., 2000). Tetrazyklin, 1948 eingeführt, blockiert die Bindung der tRNA an die Aminoacylstelle (Chopra und Roberts, 2001). Das 1952 auf dem Markt eingeführte Makrolid Erythromycin bindet an die 23S-rRNA und führt zur verfrühten Freisetzung der Polypeptidketten (Ban et al., 2000, Schlunzen et al., 2001). Das einzige totalsynthetische Antibiotikum, welches die Proteinbiosynthese am Ribosom hemmt, ist das erst 2000 auf dem Markt eingeführte Linezolid. Aktive Komponente ist der Oxazolidinonring der zu einer kompetitiven Inhibition an der Peptidyl- und Aminoacylstelle führt (Patel et al., 2001).

2.1.2.4 Antibiotika mit hemmender Wirkung auf die DNA-Replikation und Reparatur

Um die die Zelle um ein vielfaches an Länge überragende chromosomale DNA räumlich unterbringen zu können, müssen Zellen ihre DNA „verknäulen“. Eine doppelsträngige DNA liegt von sich aus als Helix vor, die eine Windung pro 10-11 Basenpaare aufweist. In Bakterien liegt die chromosomale DNA als geschlossener Ring vor. Fügt man in diesem Ring eine zusätzliche helikale Windung (=Windung der komplementären Einzelstränge umeinander) ein, so führt das zu einer Verdrillung des DNA-Rings (=Windung der doppelsträngigen Helixes umeinander), welche als positiver Supercoil bezeichnet wird. Wird eine helikale Windung entfernt, so verdrillt sich der DNA-Ring in entgegengesetzter Richtung und es entsteht ein negativer Supercoil. Verschiedene Enzyme, Topoisomerasen genannt, können diese DNA-Verdrillungen einführen oder wieder entfernen. Die DNA-Supercoils spielen unter anderem eine Rolle bei der DNA / RNA-Synthese. Da zur Ermöglichung der Aktivität der DNA / RNA-Polymerasen helikale Windungen sowohl entwunden als auch gewunden werden müssen, hinterlässt der Transkriptionskomplex negative Supercoils und

staut positive Supercoils vor sich auf. Die positiven Supercoils werden von dem Enzym DNA-Gyrase, auch Topoisomerase II genannt, wieder aufgelöst, indem sie einen der Doppelstränge schneidet, ihn auf die andere Seite des zweiten Doppelstranges führt, und ihn dann wieder schließt (Albert et al., 1996). Die DNA-Gyrase entfernt also positive Supercoils, was gleichbedeutend ist mit der Einführung von negativen Supercoils. Die Topoisomerase IV entfernt positive und negative Supercoils und trennt während der bakteriellen Zellteilung die zwei Tochterchromosomen voneinander, die aus der Replikation als Catenane hervorgehen (Pan und Fisher, 1997). Die vollsynthetische Klasse der erstmals auf dem Markt 1962 eingeführten Chinolone, wie z.B. Ciprofloxacin und Sparfloxacin, hemmen, mit unterschiedlichen Präferenzen, die Topoisomerase IV und die DNA-Gyrase (Takei et al., 2001), und greifen dabei empfindlich in die lebensnotwendige DNA-Replikation und -Transkription grampositiver wie gramnegativer Bakterien ein. Da es im Menschen kein Homolog zur DNA-Gyrase oder Topoisomerase IV gibt, wirken Chinolone selektiv gegen Bakterien.

2.1.2.5 Einfluss der bakteriellen Zellhülle auf die Wirkung von Antibiotika

Nicht alle Antibiotika entfalten die gleiche Wirkung auf gramnegative und grampositive Bakterien. Die äußere Membran der gramnegativen Bakterien stellt eine zusätzliche Barriere dar. Moleküle, deren Molekulargewicht es nicht zulässt, die von den Porinen gebildeten Poren der äußeren Membran zu passieren, zeigen keine Wirkung auf gramnegative Bakterien. Die Peptidoglykanschicht hingegen, für grampositive Bakterien gleichbedeutend mit der äußeren Zellbegrenzung, stellt erst für Moleküle erheblicher Größe eine Barriere dar. So wirkt das 1450 Da große Vancomycin nur auf grampositive Bakterien, da es die Poren der äußeren Membran gramnegativer Bakterien nicht passieren kann. Penicillin hingegen passiert mit seiner Größe von nur ca. 350 Da diese Poren und wirkt daher gleichermaßen auf gramnegative und grampositive Bakterien.

2.1.3 Antibiotikaresistenzen

2.1.3.1 Herkunft

Der übermäßige, stetig gesteigerte Einsatz von Antibiotika in der Medizin und Tierhaltung in den letzten Jahrzehnten baute einen enormen Selektionsdruck auf und hatte die Entstehung antibiotikaresistenter Pathogene zur Folge.

Eine Resistenz gegenüber einem Antibiotikum kann generell auf vier unterschiedlichen Mechanismen beruhen. Das Antibiotikum kann am Eindringen in die Zelle gehindert werden, es kann abgebaut oder aus der Zelle wieder hinaus gepumpt werden, oder das Ziel des Antibiotikums kann derart variiert werden, dass es unempfindlich gegenüber dem Antibiotikum ist. Der Erwerb eines solchen Resistenzmechanismus erfordert eine Veränderung der DNA des Bakteriums. Hier gibt es zwei Möglichkeiten: beruht die Resistenz z.B. auf dem Erwerb neuer Enzyme, so wird die genetische entsprechende Information aus der Außenwelt entnommen. Fremde DNA kann über Viren (Transduktion), Plasmidtransfer über bakterielle Zell-Zell-Kontakte (Konjugation) oder die Aufnahme freier DNA aus der Umwelt (Transformation) in ein Bakterium gelangen. Die genetische Information für den Resistenzmechanismus stammt meistens von dem Produzenten des entsprechenden Antibiotikums, denn jeder Antibiotikaproduzent benötigt Mechanismen, um sich selbst vor seinem Wirkstoff zu schützen. Hierbei können die Genome aller Bakterien als ein riesiger gemeinsamer Genpool betrachtet werden aus dem sich die meisten, oder gar alle Bakterien bedienen können (Bennet, 2008). Neben dem Hinzufügen neuer DNA besteht die andere Möglichkeit der DNA-Modifikation darin, die bereits vorhandene DNA durch Mutationen zu variieren. Hierbei kann es sich um Punktmutationen, DNA-Deletionen oder -Inversionen handeln. Alle diese beschriebenen DNA-Veränderungen treten zufällig auf, wobei diejenigen, welche ihrem Träger einen Vorteil verschaffen, sich mit ihm vervielfältigen und so Bedeutsamkeit erlangen.

2.1.3.2 Antibiotikaresistenzen in *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus ist ein in der Umwelt weitverbreitetes, grampositives, Haufenkokken bildendes Bakterium (Abb.1). Der Keim besiedelt die Haut und Schleimhaut von, je nach untersuchtem Kollektiv, 10 - 90% der gesunden Menschen. Er kann verschiedene Krankheiten beim Menschen verursachen. Dies können zum einen auf die Haut begrenzte, mit Eiterbildung assoziierte Infektionen wie Furunkel oder Wundinfekte sein, zum anderen können aber auch lebensgefährliche Erkrankungen wie die Septikämie oder Pneumonie bei starker Abwehrschwäche auftreten. Ebenfalls ein lebensbedrohliches Problem stellen Infektionen durch *S. aureus* nach dem operativen Einsatz von Implantaten dar. Künstliche Herzklappen und Gelenke, Schrauben, Drähte etc. können von *S. aureus* mit einem Biofilm überzogen werden, und Ausgangspunkt für die Verbreitung des Bakteriums im Körper sein. Die Eigenschaft des Erregers, sich multiple Antibiotikaresistenzen anzueignen, steigert die von *S. aureus* ausgehende Gefahr enorm (Kayser et al., 1993).

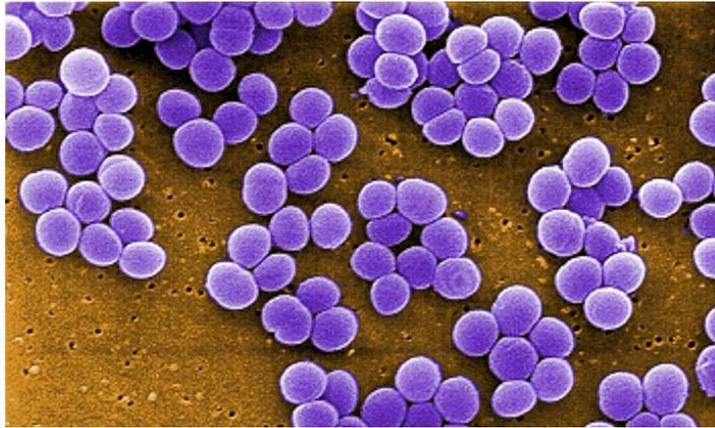


Abb. 1: elektronenmikroskopische Aufnahme (SEM) von *Staphylococcus aureus*
(Public Health Image Library, # 11153)

Die ersten antibiotikaresistenten *S. aureus*-Stämme traten schon in den 1960er Jahren auf. Bereits während der klinischen Erprobungsphase des β -Lactamantibiotikums Methicillin wurde in England über methicillinresistente S. aureus-Stämme (MRSA) berichtet. Die MRSA sind nicht nur gegen Methicillin, sondern gegen alle β -Lactamantibiotika und oft mehrfach gegen verschiedene Antibiotikastanzklassen resistent. Bis Mitte der 1990er Jahre traten sie nur in Krankenhäusern, als Verursacher nosokomialer Infektionen, auf (hospital acquired; HA-MRSA). Seit Mitte der 1990er Jahre treten MRSA-Infektionen auch außerhalb von Krankenhäusern auf (community acquired; CA-MRSA) und seit 2005 bei Nutztieren in der Tiermast (Livestock associated; LA-MRSA). Auch die LA-MRSA stellen eine Gefahr für den Menschen dar, denn z.B. waren 17,4 % der CA-MRSA-Infektionen zwischen 2006 und 2010 auf LA-MRSA-Stämme zurückzuführen (Robert Koch Institut, Epidemiologisches Bulletin, 26/2011). In Krankenhäusern verursacht der hohe Antibiotikaeinsatz einen Selektionsdruck in Richtung multipler Antibiotikaresistenzen, die Patienten stellen oft einen geschwächten und daher leicht zu befallenden Wirt und das medizinische Personal einen Verbreitungsvektor für Bakterien dar. Gesunde Menschen wie das Personal registrieren ihre Besiedlung, meist im vorderen Nasenbereich, durch MRSA nicht, infizieren aber vor allem durch mangelnde Händehygiene geschwächte Patienten. Durch eine Einführung höherer Krankenhaus-Hygienestandards könnte zwar die HA-MRSA-Problematik gemildert werden, Infektionen durch CA- und LA-MRSA wären davon jedoch unbeeinflusst.

2.1.3.2.1 *S. aureus*-Resistenzmechanismen gegen die Zellwandsynthese hemmende Antibiotika

Die Resistenz gegenüber β -Lactamantibiotika (Penicilline und Cephalosporine), welche die Zellwandsynthese durch eine irreversible Hemmung der das Peptidoglykangerüst

verknüpfenden Transpeptidasen stören, beruht auf zwei unterschiedlichen Mechanismen. Erstens können die β -Lactame durch die plasmidcodierte β -Lactamase *blaZ* abgebaut werden. Diese unterliegt einem Regulationsmechanismus und wird exprimiert, sobald sich Penicilline oder Cephalosporine in der Umgebung des Bakteriums befinden, wobei die beiden Regulatorproteine *blaR1* und *blaI* direkt stromaufwärts des *blaZ*-Gens codiert werden (Walsh, 2003). Zweitens können die β -Lactam-Zielproteine, die „Penicillin-Binding“-Proteine (PBP1-4) um ein neues, β -Lactam unempfindliches Protein, dem von dem Gen *mecA* codierten PBP2a, ergänzt werden. Wie *BlaZ* ist auch PBP2a induzierbar. Über 90% der klinischen MRSA-Isolate tragen das *mecA*-Gen (Hiramatsu et al., 2001). Das ab ca. 1980 gegen MRSA eingesetzte Glykopeptidantibiotikum Vancomycin wurde bereits 1987 durch das Auftreten vancomycinresistenter MRSA seiner uneingeschränkten Wirkung beraubt. Vancomycin bindet an das D-Ala-D-Ala-Dipeptid der Zellwandvorläufermoleküle und verhindert so die Quervernetzung der Zellwand durch Transpeptidasen. Das Transposon Tn1546 vermittelt die Vancomycinresistenz bei *S. aureus* durch die Bereitstellung von 9 Polypeptiden. Zwei dienen der Transposition und von 6 weiteren ist die Funktion bekannt. VanR und VanS regulieren die Expression der Resistenzgene, VanA und VanH bilden das Depsipeptid D-Ala-D-Lac und VanX und VanY hydrolysieren Peptidoglykanvorläufermoleküle. Die dadurch in der Überzahl vorhandenen Peptidoglykanvorläufermoleküle mit dem D-Ala-D-Lac-Depsipeptid können unbeeinflusst von Vancomycin in die Zellwand eingebaut und quervernetzt werden, da Vancomycin an D-Ala-D-Lac nicht bindet (Courvalin 2006).

2.1.3.2.2 *S. aureus*-Resistenzmechanismen gegen die Proteinbiosynthese hemmende Antibiotika

Eine Resistenz gegenüber Aminoglykosiden, welche an die 16S-rRNA binden und zu Translationsfehlern bei der ribosomalen Proteinbiosynthese führen, erfolgt in fast allen Fällen durch die enzymatische Modifikation des Aminoglykosids durch plasmidkodierte Enzyme wie N-Acetyltransferasen, O-Nukleotidyltransferasen und O-Phosphotransferasen. Diese Enzyme treten in verschiedenen Varianten mit unterschiedlichen Substratspezifitäten auf (Mingeot-Leclercq et al., 1999). Im Jahr 1999 besaßen 96% aller MRSA in Europa das Gen *aac(6')-Ie+aph(2'')*, welches für eine bifunktionale N-Acetyltransferase-O-Nukleotidyltransferase codiert und Resistenzen gegen Gentamicin, Tobramycin und Kanamycin verleiht (Schmitz et al., 1999). Kreuzresistenzen für Aminoglykoside treten nicht nur durch den gleichzeitigen Besitz mehrerer Resistenzgene, sondern auch durch Mutationen in Resistenzgenen auf. So konnte in japanischen MRSA-Isolaten die Arbekacin-Resistenz auf

eine Mutation im Gen *aac(6')-aph(2'')* zurückgeführt werden (Fujimura et al., 2000). Weitere Antibiotika, die die ribosomale Proteinbiosynthese hemmen sind Makrolide, Lincosamide und Streptogramine. Sie werden als MLS-Antibiotika zusammengefasst, da sich ihre Bindungsstellen an der ribosomalen 50S-Untereinheit überschneiden (Andersson und Kurland, 1987). Bereits 5 Jahre nach der Markteinführung des Macrolids Erythromycin (1952) wurde über erythromycinresistente klinische *S. aureus* Isolate berichtet, die auch Resistenzen gegen andere Makrolide, Lincosamide und Streptogramin B aufweisen (Chabbert, 1956, Garrod, 1957, Jones et al., 1957). Der wichtigste Erythromycin-Resistenzmechanismus ist die Variation der Erythromycin-Bindungsstelle an der 23S-rRNA durch die Methylierung einer Adenin-Base (Lai und Weisblum, 1971) z.B. durch die Erythromycinresistenzmethylase A (*ermA*) (Murphy, 1985). Tetrazyklin hemmt die Proteinbiosynthese, indem es mit der 30S-Untereinheit interagiert. Die Resistenz gegenüber Tetrazyklin beruht auf der Tetrazyklin-Effluxpumpe TetA. Diese wird von Tetrazyklin induziert. Der Tetrazyklinrezeptor TetR fungiert als Repressor für das *TetR*- und *TetA*-Gen und bindet Tetrazyklin wesentlich besser als die ribosomale 30S-Untereinheit. Die Bindung von Tetrazyklin an TetR verursacht eine Konformationsänderung in TetR, die zu einer Dissoziation von TetR vom Operator führt. Nun wird TetA überexprimiert, gelangt in die Zellmembran und befördert Tetrazyklin aus der Zelle (Ramos et al., 2005). Gegen das nach Vancomycin als letztes gegen MRSA, im Jahr 2000, eingeführte Antibiotikum Linezolid trat bereits 2001 eine Resistenz bei klinischen *S. aureus*-Isolaten auf (Tsiodras, Gold et al. 2001), welche auf einer Punktmutation in der 23S-rRNA beruht (Meka et al., 2004).

2.1.3.2.3 *S. aureus*-Resistenzmechanismen gegen die DNA-Replikation hemmende Antibiotika

Die Resistenz gegenüber Chinolonen, welche an die Topoisomerase IV oder die DNA-Gyrase binden, und somit die DNA-Replikation und -Transkription hemmen, beruht nicht auf plasmidkodierten Genen aus der Umwelt, sondern auf Modifikationen vorhandener Proteine oder Proteinregulationsmechanismen durch Mutationen. So verursachen Punktmutationen im *GyrA*- oder *GrlA*-Gen, welche jeweils für die Untereinheit A der DNA-Gyrase bzw. Topoisomerase IV codieren, Resistenzen gegenüber Chinolonen (Drlica und Zhao, 1997, Ruiz et al., 2001). Eine Punktmutation in der regulierenden Region 89 Basenpaare stromaufwärts des Startcodons führt zur Überexpression der chromosomal codierten Effluxpumpe NorA. Diese von einem Protonengradient abhängige Multi-Substrat-Effluxpumpe befördert unter anderem hydrophile Chinolone aus der Bakterienzelle und sorgt im Falle einer Überexpression für eine entsprechende Resistenz (Neyfakh et al., 1993,

Ng et al., 1994, Fournier et al., 2001). Ein Beispiel für die schnelle Chinolon-Resistenzentwicklung von MRSA veranschaulicht eine Studie aus Hongkong. Dort stieg der Anteil an Ciprofloxacinresistenten MRSA von 9% im Jahr 1988 auf 92% im Jahr 1993 an (Scheel et al., 1996).

2.1.4 Die notwendige Suche nach neuen Antibiotika

Aus dem oben beschriebenen z. T. sehr schnellen Auftreten von Antibiotikaresistenzen in pathogenen Bakterien wie *S. aureus* resultiert der Zwang, fortlaufend neue Antibiotika zu entwickeln. Die Suche nach neuen Antibiotika umfasst das Screening von zum einen Naturstoffen und zum anderen Bibliotheken synthetischer Substanzen. Wobei die zu untersuchenden Substanzen z.B. Bakterienkulturen zugesetzt werden können, um deren Einfluss auf Wachstum oder z.B. Biofilmbildung zu beobachten, oder es werden z.B. die Substanzen *in vitro* bezüglich ihrer Bindung an oder Hemmung von ausgewählte(n) Enzyme(n) untersucht. Die derzeit wichtigsten Quellen für antimikrobiell wirksame Leitstrukturen sind bakterielle Symbionten mariner Schwämme (Imhof et al., 2011). Naturstoffe werden nach ihrer Entdeckung oft chemisch weiterentwickelt, z.B. um ihre Wirkung zu erhöhen oder entstandene Resistenzmechanismen zu umgehen. Dies führt zu semisynthetischen Antibiotika wie z. B. dem Ampicillin, welches eine Modifikation des Penicillins darstellt. Die Ziele, gegen die *in vitro*-Screenings gerichtet wurden, waren bis Mitte der 1990er Jahre beschränkt auf die ribosomale Proteinbiosynthese, die Zellwandbiosynthese und die DNA-Gyrase. Ab Mitte der 1990er Jahre wurden immer mehr Genome von pathogenen Bakterien komplett sequenziert. Dies ermöglichte eine völlig neue Suche nach Angriffsziele. In den Genomen kann zunächst nach ORFs gesucht werden, zu denen es keine Homologe im menschlichen Genom gibt. Anschließend kann die Wichtigkeit der Genprodukte dieser ORFs überprüft werden, indem man die Folgen einer entsprechenden Genzerstörung (knock-out-Mutanten) oder Unterbindung der Genexpression (Expression von Antisense-RNA) auf das bakterielle Wohlergehen untersucht (Walsh, 2003). Auch die ständig wachsenden Proteinstrukturdatenbanken eröffnen neue Möglichkeiten. Wenn die Architektur einer Bindungstasche auf atomarer Ebene bekannt ist, kann für beliebige Substanzen eine computergestützte Berechnung der Ausrichtung in der Bindungstasche (Molecular Docking) und damit auch der Bindungsaffinität versucht werden (Lengauer und Rarey, 1996). Dies erweitert das Spektrum möglicher Antibiotika, da auch Substanzen identifiziert werden können, die weder als Naturstoff noch in einer Substanzbibliothek vorliegen. Ein besonderes Augenmerk bei der Suche nach neuen Antibiotika gilt Wirkstoffen gegen MRSA, da diese ein großes Problem im Gesundheitswesen darstellen. Als neues Wirkstoffziel in MRSA rückten

z.B. die oberflächenassoziierten Virulenzfaktoren ins Blickfeld, ohne die ein Bakterium ein leicht zu bewältigender Gegner für das Immunsystem ist. Das Vorhandensein der Virulenzfaktoren auf der Bakterienoberfläche könnte z.B. durch die Hemmung ihrer Verankerung an der Zellwand reduziert werden.

2.1.5 Oberflächenassoziierte Virulenzfaktoren in *S. aureus*

Die meisten der bisher gut charakterisierten oberflächenassoziierte Virulenzfaktoren dienen der Anheftung der *S. aureus* Zelle an das Wirtsgewebe und werden zusammengefasst als MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules). Zu ihnen zählen der Clumpingfactor A und B (ClfA und ClfB), die beide Fibrinogen binden (McDevitt et al., 1994, Ni Eidhin et al., 1998). Fibrinogen ist ein im Blutplasma von Wirbeltieren vorkommendes Glykoprotein, welches an der Blutgerinnung beteiligt ist. Durch die Bindung von Fibrinogen kann sich *S. aureus* an Blutgerinnsel und an von Fibrinogen überzogene Implantate heften. Zudem führt die Bedeckung der *S. aureus*-Zelloberfläche mit Fibrinogen bezüglich des Immunsystems des Wirts zu einer schutzbietenden Maskierung des Erregers. Die Oberflächenproteine FnBpA und FnBpB binden Fibronectin (Flock et al., 1987, Signas et al., 1989, Jonsson et al., 1991), ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix. Das Protein Can bindet an Kollagen (Switalski et al., 1989, Patti et al., 1992), welches hauptsächlich in der extrazellulären Matrix von Bindegeweben vorkommt und das häufigste Protein des menschlichen Körpers darstellt. Außer an der Adhärenz sind oberflächenassoziierte Virulenzfaktoren in *S. aureus* auch an anderen Mechanismen beteiligt. Zunächst muss die Eisenversorgung des Bakteriums innerhalb des Körpers gewährleistet werden. Da keine freien Eisenionen in den Körperflüssigkeiten vorkommen, muss *S. aureus* Fe^{2+} aus Hämoglobin und Fe^{3+} aus dem Eisentransportprotein Transferrin gewinnen. Hämoglobin wird hierfür von den Oberflächenproteinen IsdA und IsdB gebunden (Mazmanian et al., 2003) und Transferrin von StbA (Taylor und Heinrichs, 2002). Als Schutz vor einer Phagozytose dient Protein A, welches 7% der Zellwand stellt und Antikörper (IgG und IgM) am Fc-Locus bindet (Dossett et al., 1969, Forsgren, 1969). Dadurch ist der Fc-Locus der Antikörper weder zugänglich für den Fc-Rezeptor der Phagozyten noch für Komponenten des Komplementsystems, womit die spezifische Immunabwehr außer Kraft gesetzt ist.

Vor ihrem Einbau in das Peptidoglykangerüst ist allen oben beschriebenen oberflächenassoziierten Virulenzfaktoren von *S. aureus* ein konserviertes, C-terminales LPXTG-Motiv gemein (Fischetti et al., 1990). Das LPXTG-Motiv ist die Signalsequenz, die zur Verankerung des entsprechenden Proteins an die Zelloberfläche führt. C-terminal folgt

2.1 Einleitung

ein Membrananker auf das LPXTG-Motiv (Schneewind et al., 1993, Mazmanian et al., 2001, Paterson und Mitchell, 2004). Anhand des LPXTG-Motivs und 6 *S. aureus* Genomsequenzen konnten *in silico* insgesamt 21 Mitglieder der LPXTG-Familie identifiziert werden, wobei die genaue Funktion nicht für alle aufgeklärt ist (Roche et al., 2003).

2.1.6 Sortase A

Das LPXTG-Motiv wird erkannt von Sortase A (SrtA), einer 206 Aminosäuren umfassenden membranassoziierten Transpeptidase. SrtA gehört zur Klasse der Cystein-Proteasen und besitzt eine C-terminale katalytische Domäne und einen N-terminalen Membrananker. In Abb. 2 ist die Funktion der SrtA schematisch dargestellt.

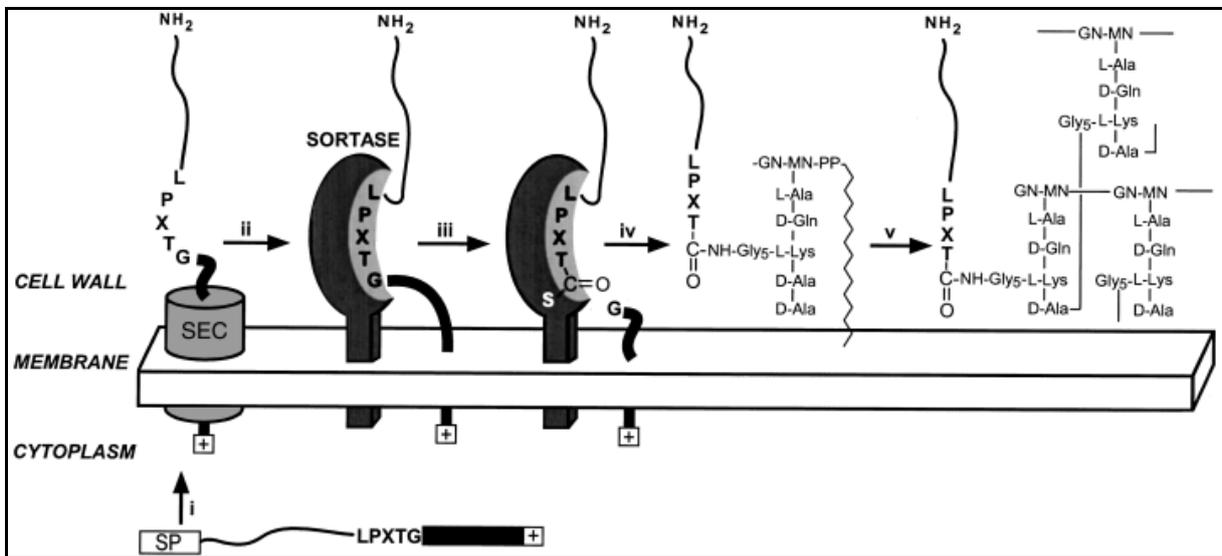


Abb. 2: Schema der Verankerung von Oberflächenproteinen an der Zellwand grampositiver Bakterien durch Sortase A. Erläuterung siehe Text. (Mazmanian et al., 2001).

Zunächst findet, vermittelt durch ein N-terminales Signalpeptid (SP), die Sekretion der für die Zelloberflächenverankerung bestimmten Proteine auf die Außenseite der Cytoplasmamembran statt (i). Die C-terminale hydrophobe Region durchspannt dabei die Membran und die C-terminal folgenden, noch im Cytoplasma befindlichen positiv geladenen Aminosäuren fungieren als Anker. Das LPXTG-Motiv befindet sich nun, ebenso wie das N-terminal vorgeschaltete spätere Oberflächenprotein, auf der Außenseite der Zelle. Trifft ein SrtA-Molekül auf das LPXTG-Motiv, so wird dieses gebunden (ii) und dann die Peptidbindung zwischen dem Threonin und Glycin des Motivs gespalten (iii), wobei ein Acyl-Enzym-Intermediat entsteht. Das Threonin des LPXTG-Motivs ist hierbei kovalent über einen Thioester an das Cystein¹⁸⁴ des aktiven Zentrums der SrtA gebunden. Die Auflösung des Acyl-Enzym-Intermediates erfolgt durch den nukleophilen Angriff der Aminogruppe des

Pentaglycins von Lipid II, dem Vorläufermolekül für die Zellwandbiosynthese (iv). Das Resultat des nukleophilen Angriffs ist eine Peptidbindung zwischen dem Carboxyende des Threonins des LPXTG-Motivs und dem Aminoende des Pentaglycins des Lipid II. Die SrtA kann nun wieder einen neuen katalytischen Zyklus starten. Das Oberflächenprotein tragende Lipid II-Molekül wird in die Zellwand eingebaut (v) (reviewed in Maresso und Schneewind, 2008). Die SrtA entfaltet ihre Aktivität auch unter extrem vereinfachten *in vitro*-Bedingungen. Der N-Terminus der SrtA kann entfernt werden, um ein lösliches Enzym zu erhalten. Das erste SrtA-Substrat, das Oberflächenprotein, kann im Prinzip auf die Erkennungssequenz LPXTG beschränkt werden und das zweite Substrat, Lipid II, auf z.B. NH₂Gly₃. So spaltet SrtA_{ΔN59} das für einen FRET-Aktivitätsassay entwickelte Substrat abz-LPETG-dnp und setzt die Produkte G-dnp und LPET-Gly₃ frei. Abz(o-Aminobenzoesäure) dient als Donorfluorophor und dnp (2,4-Dinitrophenol) als Akzeptor des FRET-Assays (Ton-That et al., 2002). Die Aktivität von SrtA wird durch die Zugabe von Ca²⁺-Ionen in den Reaktionspuffer um das 8 fache gesteigert. Die dazu notwendige Ca²⁺-Konzentration von ca. 2 mM entspricht ungefähr der Ca²⁺-Konzentration in menschlichen Geweben (Ilangovan et al., 2001).

Kruger und Mitarbeiter tauschten jeweils eine Aminosäure des SrtA-Substratmotivs LPETG durch 18 Aminosäuren (alle kanonischen außer Cystein und Tryptophan) aus und quantifizierten die Umsetzung entsprechender Substratpeptide durch SrtA. Die Endpunktanalyse ergab, dass MPXTG und LAETG in geringem Maße von SrtA umgesetzt werden. Der Austausch der mittleren Position des LPETG-Motivs durch jede der getesteten Aminosäuren verringerte die Umsatzrate durch SrtA kaum. In geringerem Maße als LPETG konnten auch LPESG, LPEAG, LPEVG und LPELG durch SrtA umgesetzt werden. An letzter Position des LPETG-Motivs muss notwendiger Weise ein Glycin stehen um eine Produktformation zu beobachten (Kruger et al., 2004c).

Die Aufklärung der Kristallstrukturen nativer SrtA_{ΔN59} und SrtA_{ΔN59Cys184Ala} aus *S. aureus*, sowie eines SrtA_{ΔN59Cys184Ala}:LPETG-Peptid-Komplexes (Abb. 3) (Zong et al., 2004), ermöglichte detailliertere Einblicke. Der Kern der SrtA wird von einem 8-strängigen β-Barrel gebildet. Die β-Stränge β₄, β₇ und β₈ bilden ein konkaves β-Faltblatt. In der Mitte dieses Faltblattes befinden sich die drei, in allen SrtA grampositiver Bakterien konservierten, Aminosäurereste His¹²⁰, Cys¹⁸⁴ und Arg¹⁹⁷. Die Prolin- und die Leucinseitenkette der Erkennungssequenz LPXTG wird durch hydrophobe Wechselwirkungen fixiert, während die zu spaltende Peptidbindung zwischen Threonin und Glycin sich zwischen den Aminosäureresten His¹²⁰, Cys¹⁸⁴ und Arg¹⁹⁷ befindet. Da His¹²⁰ eine zu große räumliche Entfernung aufweist, wird vermutet, dass Cys¹⁸⁴ und Arg¹⁹⁷ als katalytische Cystein-Arginin-Dyade fungieren (Zong et al., 2004). Hingegen herrschte zuvor die Vermutung, Cys¹⁸⁴ und

His¹²⁰ formten eine katalytische Dyade, da eine SrtA_{ΔN59,H120A}-Mutante keine Aktivität aufweist (Ton-That et al., 2002).

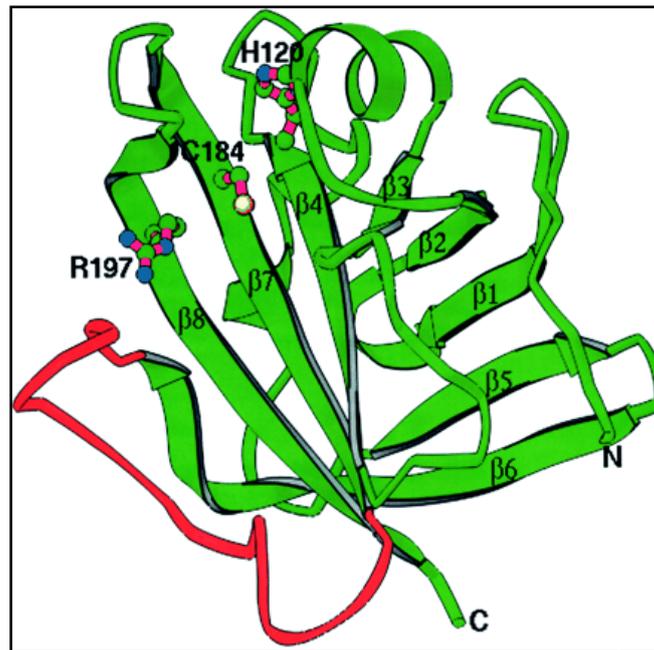


Abb. 3: Struktur von SrtA_{ΔN59} aus *S. aureus*. Erläuterung siehe Text. (Zong et al., 2004)

Ein weiteres Mitglied der Sortase-Familie ist die membranassoziierte Transpeptidase Sortase B (SrtB). Sie erkennt das C-terminale Motiv NPQTN, welches sie zwischen dem Threonin und dem Asparagin spaltet. Das einzige bekannte von SrtB an der Zelloberfläche verankerte Protein ist das Häm-Bindeprotein IsdC (Mazmanian et al., 2002). Tauscht man den $\beta 6/\beta 7$ -Loop in SrtA gegen die korrespondierende Domäne aus SrtB aus, so bindet die resultierende SrtA-Chimäre das SrtB-Substrat NPQTN (Bentley et al., 2007).

2.1.7 SrtA als Zielprotein neuer antimikrobieller Wirkstoffe

Ein Unterbinden der SrtA-Aktivität in einem Bakterium würde zu einer Zellhülle führen, der fast sämtliche Virulenzfaktoren fehlen. SrtA stellt ein vielversprechendes, selektives Ziel für antimikrobielle Wirkstoffe dar. Es existieren SrtA-Homologe in vielen grampositiven pathogenen Bakterien aber nicht im Menschen. Außer in Staphylokokken finden sich SrtA-Homologe z.B. auch in *Actinomyces naeslundii*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae* und *Streptococcus pyogenes* (Mazmanian et al., 1999). Die Wichtigkeit der SrtA für die Virulenz wurde *in vivo* bestätigt. SrtA-defiziente knock-out-Mutanten zeigen in Infektionsmodellen eine signifikante Verringerung der Pathogenität. Wird z.B. Mäusen *S. aureus* in den Blutstrom injiziert, und nach drei bis vier Tagen die Bakteriendichte in Geweben und Organen bestimmt, so ist die

Bakteriendichte von SrtA-defizienten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Stamm um zwei Zehnerpotenzen verringert. Der Verlust der SrtA hemmt also die Ausbreitungsfähigkeit der Staphylokokken im Wirtsorganismus beträchtlich. Entsprechend ist in diesem Infektionsmodell die lethale Dosis (LD_{50}) für die SrtA-defizienten Mutanten ca. 200-fach höher als die des Wildtyps (Mazmanian et al., 2000). Auch in anderen Infektionsmodellen z.B. für septische Arthritis oder Endocarditis zeigten SrtA-defiziente *S. aureus*-Mutanten eine wesentlich geringere Pathogenität als der Wildtyp (Jonsson et al., 2002, 2003, Weiss et al., 2004). Aufgrund dieser Erkenntnisse wird seit ca. einem Jahrzehnt SrtA als Zielmolekül in Wirkstoffscreenings eingesetzt.

2.1.8 SrtA-Inhibitoren

Wie die Zusammenfassung der bisherigen SrtA-Inhibitorstudien in Tabelle 10 (Seite 77) zeigt, war der erste publizierte SrtA-Inhibitor ein Substratanalogon, welches einen K_i -Wert von ca. 200 nM aufweist (Scott et al., 2002). Ein Jahr später wurde der Pflanzenwirkstoff β -Sisterol-3-3-O-glucopyranosid mit einem *in vitro* IC_{50} -Wert von 32 μ M identifiziert. Die hierfür vorgestellten *in vitro* IC_{50} -Assaybedingungen von 10 μ M SrtA und 1,3 μ M des Substrates dabcyI-QALPETGEE-edans (Oh et al., 2003) wurden am häufigsten in den nachfolgenden Studien genutzt. Die Pflanzenwirkstoffe Berberinchlorid und Curcumin zeigen IC_{50} -Werte von 24 μ M und 37 μ M (Kim et al., 2004, Park et al., 2005). Basierend auf einem HTS-Screening-Hit mit einem IC_{50} -Wert von 231 μ M wurde anhand von SAR-Studien der bisher vielversprechendste SrtA-Inhibitor, DMMA ((Z)-3-(2,5-dimethoxyphenyl)-2-(4-methoxyphenyl) acrylonitrile), mit einem IC_{50} -Wert von 9,2 μ M identifiziert (Oh et al., 2004). Eine andere Studie, die HTS und SAR kombinierte, identifizierte ein Dihydro- β -Carbolin als SrtA-Inhibitor mit einem IC_{50} -Wert von 25 μ M (Lee et al., 2010). Den niedrigsten IC_{50} -Wert von 6,5 μ M weist Discorhabdin aus einem Schwamm auf (Jeon et al., 2010). Weitere SrtA-Inhibitoren aus Schwämmen sind Aptamin mit einem IC_{50} -Wert von 17 μ M (Jang et al., 2007) und Dihydroxystyrene mit einem IC_{50} -Wert von 55 μ M (Chang et al. 2008). Die IC_{50} -Werte 6 weiterer identifizierter SrtA-Inhibitoren sind nicht untereinander oder mit den bisher genannten IC_{50} -Werten vergleichbar, da abweichende Substrat- und / oder SrtA-Konzentrationen und zum Teil ein anderes Substrat für die IC_{50} -Assays verwendet wurden. Ein IC_{50} -Wert ist keine Konstante sondern hängt von den gewählten Assay-Bedingungen ab. Daher können nur IC_{50} -Werte miteinander verglichen werden, die unter exakt den gleichen Bedingungen ermittelt wurden. Bei den 6, bezüglich ihres IC_{50} -wertes nicht vergleichbaren, SrtA-Inhibitoren handelt es sich um ein synthetisches Vinylsulfon (Frankel et al., 2004), ein Transition state Analogon (Kruger et al., 2004a), ein Flavonol aus einem HTS-Screening

(Kang et al., 2006), dem Pflanzenwirkstoff Kuranol (Oh et al., 2011) und zwei Verbindungen, die mittels SAR basierend auf einem virtuellen Screening-Hit (Chenna et al., 2008, 2010) und einem HTS Screening-Hit (Suree et al. 2009) identifiziert wurden. Von den 15 genannten SrtA-Inhibitoren wurden 7 *in vivo*-Tests unterzogen. Hierbei wurde untersucht, ob die Substanzen die Adhesion von *S. aureus*-Zellen an fibronectinbeschichtete Mikrotiterplatten (Frankel et al., 2004), oder die fibrinogenvermittelte *S. aureus*-Zellaggregatbildung (Kang et al., 2006) verringern. Da die fibrinogen- und fibronectinbindenden Oberflächenproteine von *S. aureus* durch SrtA an der Zelloberfläche verankert werden, sollte eine *in vivo* SrtA-Inhibition das Bindungsvermögen von *S. aureus*-Zellen an Fibrinogen und Fibronectin verringern. Einer der identifizierten SrtA-Inhibitoren, DMMA, wurde in einem Infektionsmodell getestet. Eine Konzentration von 4 µg/ml DMMA verringerte in einem Maus-Infektionsmodell das Infektionsausbreitungsvermögen eines *S. aureus* Wildtyp-Stammes auf das eines Sortase-defizienten knock-out Mutanten (Oh et al., 2010). Bisher wurde kein weiterer SrtA-Inhibitor außer DMMA einem Infektionsmodelltest unterzogen.

2.2 Zielsetzung

Aus einem gegen SrtA gerichteten mRNA Display gingen als mögliche SrtA-Binder zyklische Peptidsequenzen hervor, die Variationen des SrtA-Erkennungsmotivs LPXTG beinhalteten (Seebeck, unpublizierte Daten). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bindungs- und Inhibitionseigenschaften dieser Peptidsequenzen bezüglich SrtA zu charakterisieren. Bisher entstammen keine publizierten SrtA-Inhibitoren einem mRNA-display oder gehören der Peptid-Klasse an. Durch die Charakterisierung der Interaktion der erhaltenen Peptidsequenzen mit SrtA sollte die Potenz eines mRNA-displays im Vergleich zu den bisher gegen SrtA verwendeten Naturstoff- und Substanzbibliothek- sowie virtuellen und SAR-Screenings eingeordnet werden. Des Weiteren sollte die Relevanz der Peptidzyklisierung untersucht werden. Da zyklische Peptidsequenzen in antimikrobiellen Naturstoffen wie z.B. Vancomycin verbreitet sind, scheinen sie Vorteile, z.B. Protease-Resistenzen (Bierbaum et al., 1996, Chatterjee et al., 2005), gegenüber linearen Peptidsequenzen mit sich zu bringen. Es sollten geeignete Methoden entwickelt werden, um die genannten Charakterisierungen der putativen SrtA-Binder zu ermöglichen.

2.3. Ergebnisse

2.3.1 Proteinherstellung

Es wurden 7 Proteine in *E. coli* exprimiert und über Affinitätschromatographie aufgereinigt. SrtA aus *S. aureus* wurde in zwei Varianten hergestellt. Beide wurden zur Verbesserung der Löslichkeit um den N-terminalen Membrananker verkürzt. Die vorwiegend verwendete Variante SrtA_{ΔN59} besitzt N-terminal einen His₆-Tag. Die zweite Variante SrtA_{bio} besitzt ebenfalls einen N-terminalen His₆-Tag, der gefolgt wird von der Erkennungssequenz der Biotin Ligase BirA aus *E. coli*. Durch die Koexpression von BirA und SrtA_{bio} in Gegenwart von 50 μM Biotin im Wachstumsmedium wurde biotinylierte SrtA_{bio} erhalten, welche Heteromere mit Avidin ausbilden kann. Zudem wurden die Sortase A-Substratsequenz LPETG und die Sequenz des Peptidinhibitors P1 als GFP-Fusionsproteine hergestellt. Diese wurden für einen *in vivo*-Bindungstest eingesetzt, für den P1 in Peptidform nicht die gewünschte Löslichkeit in Wachstumsmedium zeigte. Die P1-Sequenz wurde sowohl mit korrekter, als auch mit zufällig vertauschter („scrambled“) Aminosäurereihenfolge an GFP fusioniert. Diese drei Proteine, bezeichnet als LPETG-GFP, P1-GFP und P1_{scrambled}-GFP besitzen einen His₆-Tag zwischen der N-terminal fusionierten Substrat / P1-Sequenz und GFP. Die P1-Sequenz wurde außerdem C-terminal an das Maltose-Binding-Protein (MBP) aus *E. coli* fusioniert. MBP als Fusionspartner vermittelt, im Vergleich zu P1 in Peptidform, eine sehr hohe Löslichkeit in wässrigem Puffer. Diese war erforderlich, um Bindungsstudien mittels Isothermaler Titrations Kalorimetrie (ITC) durchführen zu können. MBP besitzt nicht nur eine Affinität zu Maltose, sondern auch zu andern α(1→4) Maltodextrinen wie z.B. Amylose, weshalb die MBP-Fusionsproteine mittels Amyloseharz aufgereinigt wurden. Das als MBP-P1 bezeichnete Fusionsprotein besitzt C-terminal die Aminosäurefolge PSR. Es wurde zunächst entdeckt, dass die C-terminale Aminosäurefolge PCR die Expressionsrate und die Proteinstabilität des Fusionsproteins erheblich steigerte. Dies könnte z.B. darauf beruhen, dass Carboxypeptidasen A keine Proteine mit C-terminalem Lysin oder Arginin binden und abbauen können (Bruce, 2011). Der PCR-Tag wurde, ohne Verminderung der Expressionsrate und der Proteinstabilität, durch einen PSR-Tag ersetzt, da ein zusätzliches Cystein unerwünscht war. Als Kontrolle für die ITC-Messungen wurde außerdem MBP hergestellt, indem der Leervektor pMAL-c5E exprimiert wurde. Für SrtA_{ΔN59}, SrtA_{bio}, BirA und LPETG-GFP lagen bereits Expressionskonstrukte im pET28a-Vektor vor. Die Expressionskonstrukte P1-GFP (pET28a), P1_{scrambled}-GFP (pET28a) und MBP-P1 (pMAL-c5E) wurden kloniert. Mittels DNA-Sequenzierung wurde die korrekte Einklonierung der Inserts in die Vektoren überprüft. Die Aminosäuresequenzen der 7 hergestellten Proteine

2.3.1 Ergebnisse: Proteinherstellung

sind im Anhang aufgeführt. Die Proteinexpression erfolgte in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen. Der Erfolg der Proteinexpression / -Aufreinigung wurde über SDS-Page und / oder ESI-MS (positiver Modus) und die Proteinausbeute / Konzentrationen über die Absorption des gewonnenen Proteindialysats bei 280 nm und den entsprechenden Extinktionskoeffizienten (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) überprüft.

SrtA_{ΔN59} konnte in einem hohen Reinheitsgrad isoliert werden. Mittels ESI-MS wurde eine Molmasse von 18762 Da detektiert (kalkulierte Masse ohne N-terminales Methionin 18760 Da), die SDS-PAGE zeigt nur eine Proteinbande (Abb. 4). Die Ausbeute betrug 18 mg SrtA_{N59} pro Liter BL21(DE3)-Kultur.

SrtA_{bio} konnte in einem hohen Reinheitsgrad isoliert werden. Die SDS-PAGE zeigt nur eine Proteinbande (Abb. 5). Die Ausbeute betrug 12 mg SrtA_{bio} pro Liter BL21(DE3)-Kultur.

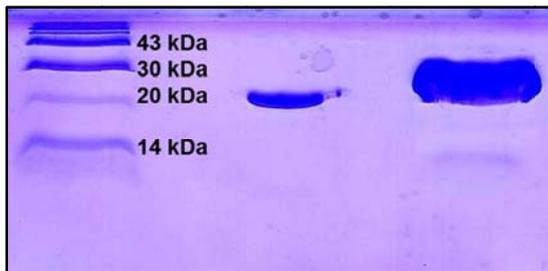


Abb. 4: SDS-PAGE für SrtA_{ΔN59}: in der linken Spur wurde Marker, in der mittleren Spur 1 μg und in der rechten Spur 10 μg aufgereinigte SrtA_{ΔN59} aufgetragen

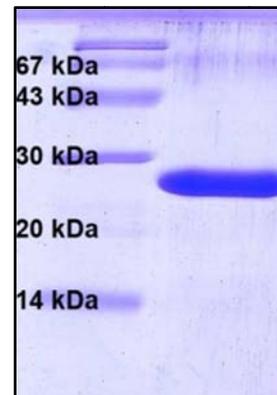


Abb. 5: SDS-PAGE für SrtA_{bio}: in der linken Spur wurde Marker und in der rechten Spur 2 μg SrtA_{bio} aufgetragen.

Die Biotinylierung von SrtA_{bio} durch die koexprimierte BirA war nicht vollständig. Sowohl die Molmasse der unbiotinylierten SrtA_{bio} von 19587 Da (kalkulierte Masse ohne N-terminales Methionin 19586 Da) als auch die der biotinylierten SrtA_{bio} von 19813 Da (kalkulierte Masse ohne N-terminales Methionin 19812 Da) wurden in dem gewonnenen Proteindialysat mittels ESI-MS detektiert. Avidin liegt unter nativen Bedingungen als Tetramer vor, welches 4 Biotinbindungstaschen besitzt (Green, 1975). Zur Gewinnung des benötigten (SrtA_{bio}:Avidinmonomer)₄-Komplexes wurde die aufgereinigte SrtA_{bio} mit Avidin inkubiert und anschließend eine Gelfiltration des Ansatzes durchgeführt. Es wurden dabei drei Peaks verzeichnet. Dem Peak mit dem geringsten Elutionsvolumen wurde ein (SrtA_{bio}:Avidinmonomer)₄-Komplex zugeordnet, da eine SDS-PAGE zeigte, dass dieser Peak in einer 1:1-Stöchiometrie aus Avidinmonomeren und SrtA_{bio} bestand. Die zu diesem Peak gehörenden Fraktionen wurden vereinigt und für die vorgesehenen Bindungsstudien mit dem Peptidinhibitor P1 verwendet. Die SrtA_{bio}-Konzentration dieser Komplexlösung wurde über

2.3.1 Ergebnisse: Proteinherstellung

die Absorption bei 280 nm und dem entsprechenden Extinktionskoeffizienten eines SrtA_{bio}:Avidinmonomer-Heterodimers bestimmt (<http://expasy.org/tools/protparam.html>). Dem Gelfiltrations-Peak mit dem mittleren Elutionsvolumen wurden per SDS-PAGE ausschließlich Avidinmonomere zugeordnet. Anscheinend lag Avidin gegenüber biotinylierter SrtA_{bio} im Überschuss vor. Dem Peak mit dem geringsten Elutionsvolumen wurde per SDS-PAGE ausschließlich SrtA_{bio} zugeordnet. Hierbei muss es sich um unbiotinylierte SrtA_{bio} handeln, welche keine Bindungsaffinität zu Avidin besitzt.

Für die aufgereinigten GFP-Fusionsproteine P1-GFP und P1_{scrambled}-GFP wurden mittels ESI-MS die Molmassen 29748 Da und 29882 Da ermittelt, welche um 16-19 Da unter der kalkulierten Molmasse ohne Methionin (29767 Da) bzw. mit Methionin (29898 Da) liegen. Diese Massendifferenz könnte auf einer Wasserabspaltung beruhen. Auf das erste Methionin folgt bei P1-GFP ein Glycin, wohingegen bei P1_{scrambled}-GFP die zweite Aminosäure ein Tyrosin ist. Dies könnte erklären, weshalb bei P1-GFP, nicht aber bei P1_{scrambled}-GFP, Methionin während der Expression abgespalten wird. Für LPETG-GFP wurde mittels ESI-MS eine Molmasse von 28712 Da detektiert (kalkulierte Masse 28711 Da). Die Ausbeuten betragen 53 mg (P1-GFP), 45 mg (P1_{scrambled}-GFP) und 35 mg (LPETG-GFP) pro Liter BL21(DE3)-Kultur.

MBP-P1 wird im Folgenden als MBP-P1_{nativ} bezeichnet, sofern es nach der Isolation nicht weiter behandelt wurde. MBP-P1_{nativ} konnte in einem hohen Reinheitsgrad isoliert werden. Die SDS-PAGE zeigt nur eine Proteinbande (Abb. 6). Und mittels ESI-MS konnte eine Molmasse von 45455 Da (kalkulierte Masse 45453 Da) detektiert werden (Abb. 7). Die in

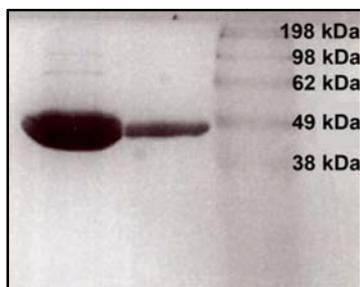


Abb. 6: SDS-PAGE von MBP-P1_{nativ}.
Links: 10 µg, Mitte: 2 µg,
Rechts: Marker

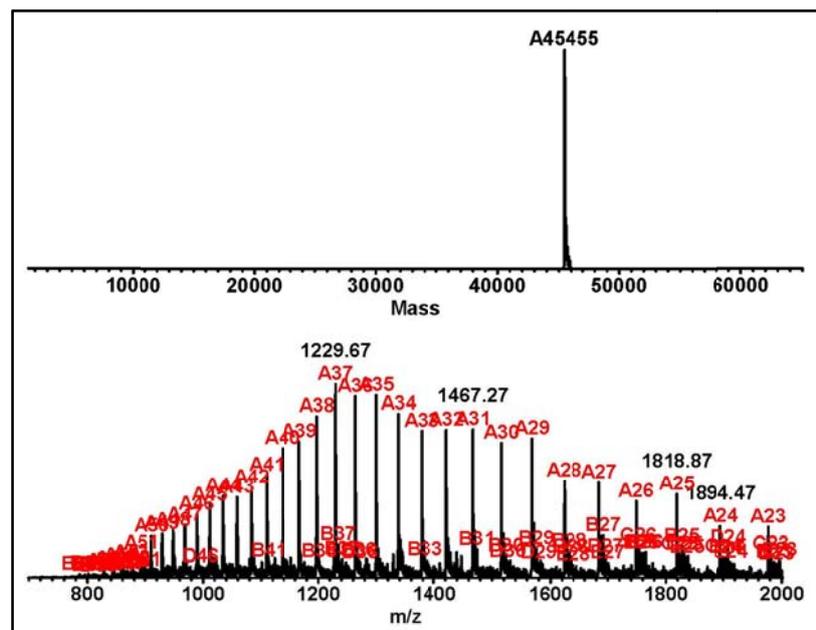


Abb. 7: ESI-MS-Spektrum von MBP-P1_{nativ} und dekonvolutierte Masse

2.3.1 Ergebnisse: Proteinherstellung

wesentlich geringerer Intensität detektierte B-Reihe des in Abb. 7 gezeigten m/z -Spektrums ergibt nach Dekonvolution eine Molmasse von 45558 Da. Die Herkunft dieses Addukts / dieser Modifikation von ca. +100 Da ist unbekannt. Durch den TCEP-Gehalt von 1mM im verwendeten Puffer wurde die Dimerisierung der MBP-P1-Moleküle über Disulfidbrücken unterbunden. Wurde auf TCEP im Puffer verzichtet, konnte mittels ESI-MS ausschließlich die Molmasse des MBP-P1-Dimers detektiert werden. Die Ausbeute an MBP-P1_{nativ} betrug 31 mg pro Liter BL21-DE3-Kultur.

Das aufgereingte MBP-P1_{nativ} wurde mittels Inkubation mit α,α' -Dibromo-*m*-xylene (DBX) zyklisiert. Ein DBX-Molekül verbrückt hierbei die beiden Cysteine der P1-Sequenz mittels der Ausbildung zweier Thioether (Abb. 8). Diese beiden Cysteine sind die einzigen Cysteine des Fusionsproteins MBP-P1. Das resultierende zyklisierte Fusionsprotein wird im Folgenden als MBP-P1_{zyklisch} bezeichnet.

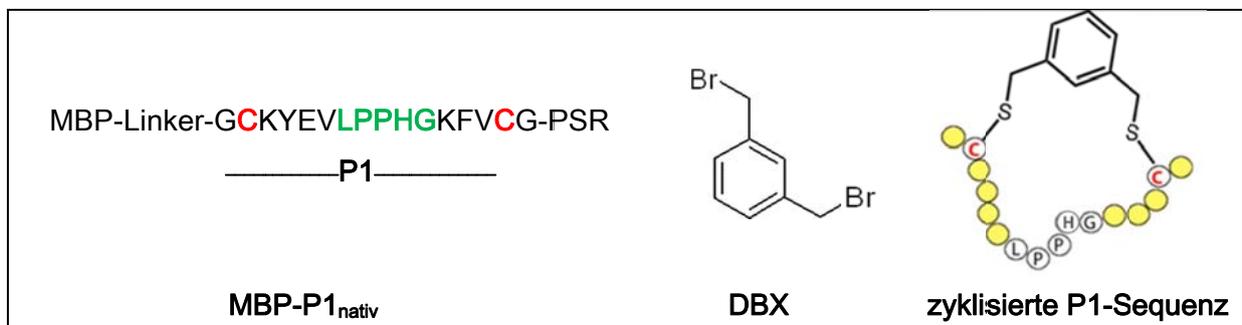


Abb. 8: schematische Darstellung von MBP-P1_{nativ}, DBX und der P1-Sequenz nach Zyklisierung

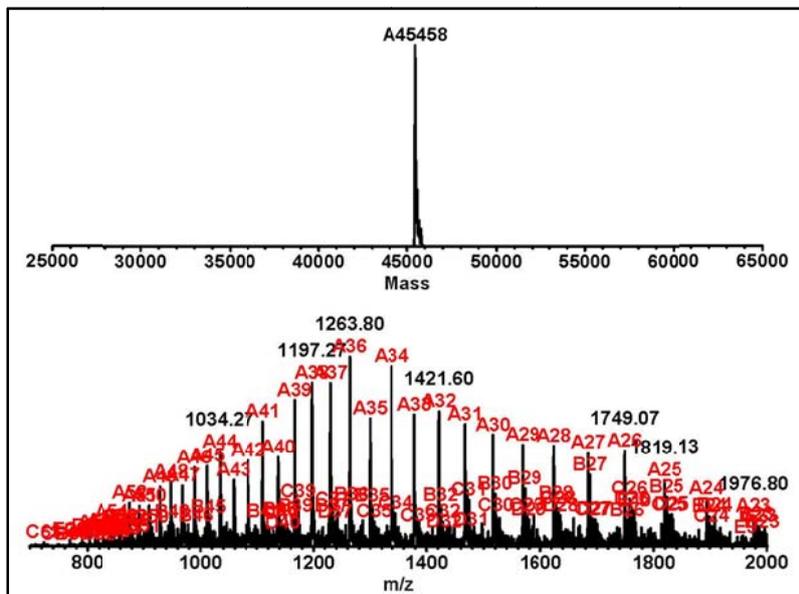


Abb. 9: ESI-MS-Spektrum von MBP-P1_{Kontrolle} und dekonvolutierte Masse

Nach der Inkubation mit DBX wurde MBP-P1 in SrtA-Bindungspuffer zurückgepuffert. Die Zyklisierung wurde mittels ESI-MS überprüft. Die gewünschte Verbrückung verursacht eine kalkulierte Modifikation von +102 Da. Als Nebenreaktionen konnten P1-Zyklisierungen über DBX-Polymere, und die Ausbildung von Thioethern zwischen einem MBP-P1

und je zwei DBX-Molekülen per ESI-MS identifiziert werden. Durch Variationen der DBX-Konzentration und der Inkubationszeit der Zyklisierungsreaktion konnte diese soweit

2.3.1 Ergebnisse: Proteinherstellung

optimiert werden, dass die Molmassen sowohl der Nebenprodukte als auch des Eduktes MBP-P1_{nativ} nicht mehr mittels ESI-MS detektiert werden konnten. Als Kontrolle wurde MBP-P1_{nativ} der Zyklisierungsprozedur in Abwesenheit von DBX unterzogen. Das anschließend zurückgepufferte Protein wird im Folgenden als MBP-P1_{Kontrolle} bezeichnet. MBP-P1_{Kontrolle} erfährt keine Modifikation durch die Zyklisierungsprozedur-Bedingungen. Mittels ESI-MS wurde für MBP-P1_{Kontrolle} eine Molmasse von 45460 Da (Molmasse MBP-P1_{nativ}: 45458) detektiert. Wie für MBP-P1_{nativ} wurde auch für MBP-P1_{Kontrolle} mit vergleichsweise geringer Intensität ein Addukt / eine Modifikation unbekannter Herkunft von ca. +100 Da ermittelt (Abb. 9).

MBP-P1_{zyklisch} konnte erfolgreich, ohne detektierbare Nebenprodukte oder Eduktüberschuss, hergestellt werden. Mittels ESI-MS für MBP-P1_{zyklisch} eine Molmasse von 45560 Da bestimmt, welche 102 Da über der Molmasse von MBP-P1_{Kontrolle} liegt (Abb. 10). In geringerer Intensität wurde eine weitere Molmasse von 45660 Da detektiert. Auch für MBP-P1_{zyklisch} existiert ein Addukt / eine Modifikation unbekannter Herkunft von +100 Da, wie dies auch für MBP-P1_{nativ} und MBP-P1_{Kontrolle} der Fall ist. Eine SDS-PAGE von MBP-P1_{zyklisch} zeigt weder durch intermolekulare Verbrückungen verursachte MBP-P1-Multimere, noch Abbauprodukte in beachtenswertem Maße. Die Proteinbande befindet sich dem Molgewicht von MBP-P1_{zyklisch} (45560 Da) entsprechend auf ähnlicher Höhe des Gels wie die 43 kDa-Bande des Proteingrößenstandards (Abb. 11).

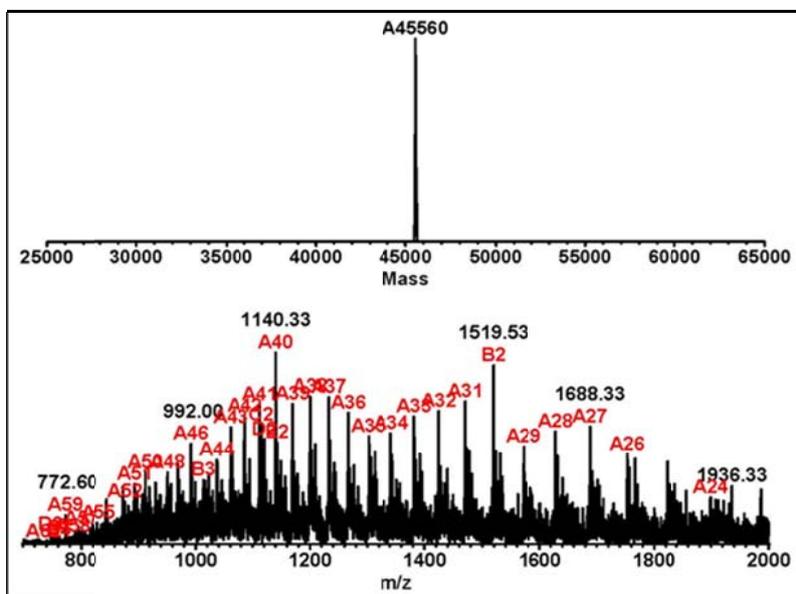


Abb. 10: : ESI-MS-Spektrum von MBP-P1_{zyklisch} und dekonvolutierte Masse

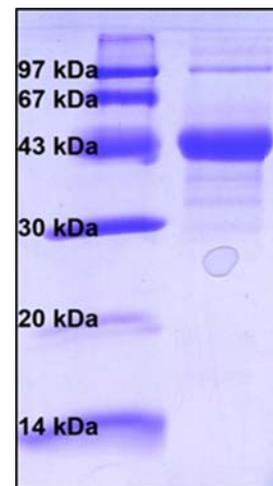


Abb. 11: SDS-PAGE von MBP-P1_{zyklisch}: Links: LMW-Marker, Rechts: 2 µg MBP-P1_{zyklisch}

MBP wurde durch die Expression des Leervektors pMAL-c5E erhalten. Dem aufgereinigten Protein wurde mittels ESI-MS eine Molmasse von 44796 Da zugeordnet (kalkulierte Masse 44798,4 Da). Die Ausbeute betrug 25 mg pro Liter BL21(DE3)-Kultur.

2.3.2 Peptidherstellung

Tabelle 1 (Seite 29) zeigt eine Übersicht der 13 hergestellten Peptide, welche mittels Fmoc-Festphasenpeptidsynthese (Merrifield, 1963, Kent, 1988) in Zusammenarbeit mit Sascha Gentz produziert wurden. Abbildung 12 zeigt schematisch die Struktur der mit DBX und mit TBX zyklisierten Peptide sowie der Peptide P1_{5FAM} (linear) und P1_{unmarkiert} (linear). Blau hervorgehoben in Tabelle 1 sind die der SrtA-Substratsequenz LPXTG ähnelnden Sequenzabschnitte. Pink hervorgehoben sind die Cysteine, die, wie in Abbildung 12 dargestellt, modifiziert wurden. Abbildung 13 (Seite 30) zeigt die analytischen HPLC-Diagramme der 13 aufgereinigten Peptide. Die durch ESI-MS (positiver Modus) ermittelten Molmassen der HPLC-Peaks aus Abbildung 13 im Vergleich zu den kalkulierten Molmassen der entsprechenden Peptide sind in Tabelle 2 (Seite 29) aufgeführt. Wie aus Tabelle 2 und Abbildung 13 hervorgeht, war die Synthese und Aufreinigung der 13 in der vorliegenden Arbeit verwendeten Peptide erfolgreich. Die HPLC-Diagramme (Abb. 13) zeigen jeweils nur einen Hauptpeak und die ermittelten Molmassen der Peaks stimmen mit den kalkulierten Molmassen der entsprechenden Peptide im Rahmen der zu erwartenden Nachweisgenauigkeit überein (Tabelle 2). Die Peptide 1-10 besitzen einen C-terminalen PEG₃-Linker, um ihre Löslichkeit in den für alle Messungen verwendeten wässrigen Puffern / Medien auf das notwendige Maß zu erhöhen (Becker et al., 2004).

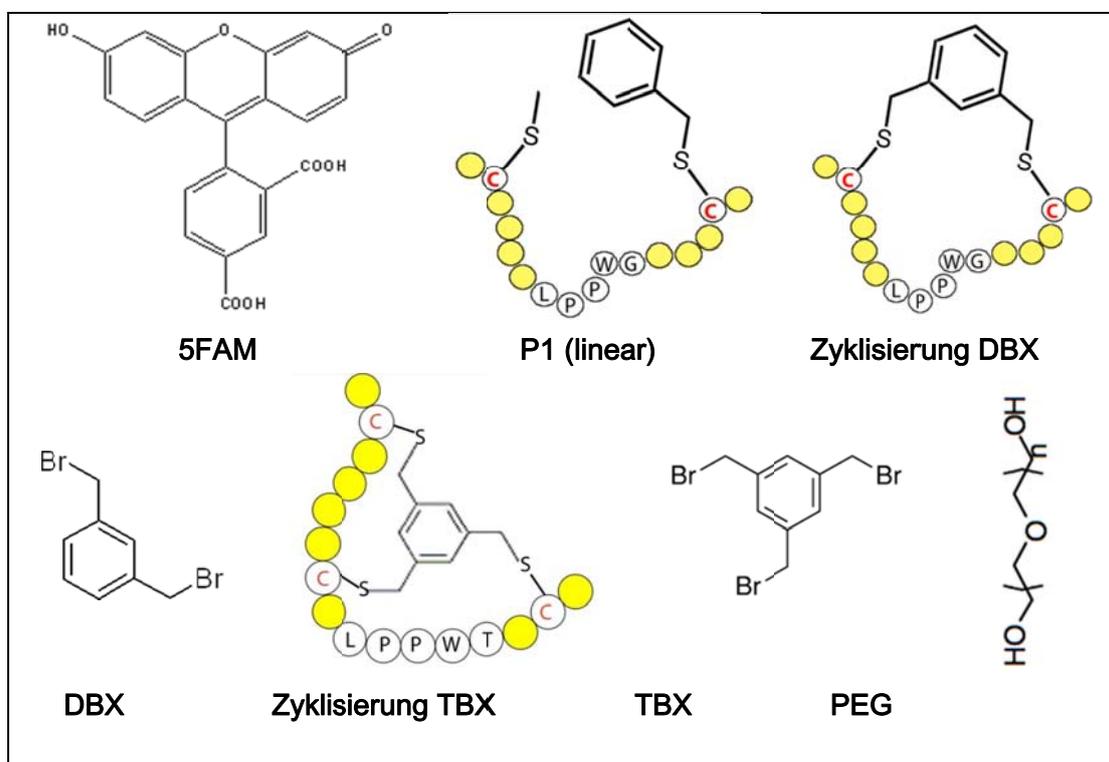


Abb. 12: Schematische Darstellung der Peptidzyklisierung mittels DBX und TBX sowie der Struktur von P1 (linear) und Darstellung von DBX, TBX, 5FAM und PEG

2.3.2 Ergebnisse: Peptidherstellung

Tabelle 1: Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Peptide

Peptidname	Peptidnummer	Peptidsequenz	Zyklisierung
P1 _{5FAM} (linear)	1	5-FAM-GCKYEVLPPHGKFVCG-PEG ₃ -A	nein*
P1 _{5FAM} (zyklisch)	2	5-FAM-Ahx-GCKYEVLPPHGKFVCG-PEG ₃ -A	DBX
P1 _{unmarkiert} (linear)	3	GCKYEVLPPHGKFVCG-PEG ₃ -A	nein*
P1 _{unmarkiert} (zyklisch)	4	GCKYEVLPPHGKFVCG-PEG ₃ -A	DBX
P2 _{5FAM}	5	5-FAM-GCVDVNGRWLILPPCG-PEG ₃ -A	DBX
P2 _{unmarkiert}	6	GCVDVNGRWLILPPCG-PEG ₃ -A	DBX
P2 _{5FAM,scrambled}	7	5-FAM-GCPIWGVPLDLNVGCR-PEG ₃ -A	DBX
P2 _{unmarkiert,scrambled}	8	GCPIWGVPLDLNVGCR-PEG ₃ -A	DBX
P3 _{5FAM}	9	5-FAM-GCKCDLLPPWTLKQCG-PEG ₃ -A	TBX
P3 _{unmarkiert}	10	GCKCDLLPPWTLKQCG-PEG ₃ -A	TBX
P4 _{5FAM}	11	5FAM- GHEHGLQQGGAVKDKAQ	nein
P5 _{5FAM}	12	5-FAM-FQQRHESLRP	nein
LPETGKG _{5FAM,Biotin}	13	5-FAM-LPETGKBiotin-G	nein

*Modifikation der Cysteine: siehe Abb. 12 unter „P1 (linear)“.

Tabelle 2: Vergleich der theoretischen und ESI-MS ermittelten Molmassen der Peptide

Peptidname	kalkulierte Molmasse (Da)	ESI-MS ermittelte Molmasse (Da)
P1 _{5FAM} (linear)	3177,1	3174,4
P1 _{5FAM} (zyklisch)	3286,1	3286,3
P1 _{unmarkiert} (linear)	2810,1	2816,0
P1 _{unmarkiert} (zyklisch)	2814,1	2814,3
P2 _{5FAM}	3139,1	3137,2
P2 _{unmarkiert}	2779,1	2779,9
P2 _{5FAM,scrambled}	3139,1	3135,8
P2 _{unmarkiert,scrambled}	2779,1	2779,2
P3 _{5FAM}	3214,2	3212,7
P3 _{unmarkiert}	2854,2	2854,1
P4 _{5FAM}	2048,7	2047,0
P5 _{5FAM}	1744,5	1742,9
LPETGKG _{5FAM,Biotin}	1286,8	1284,8

2.3.2 Ergebnisse: Peptidherstellung

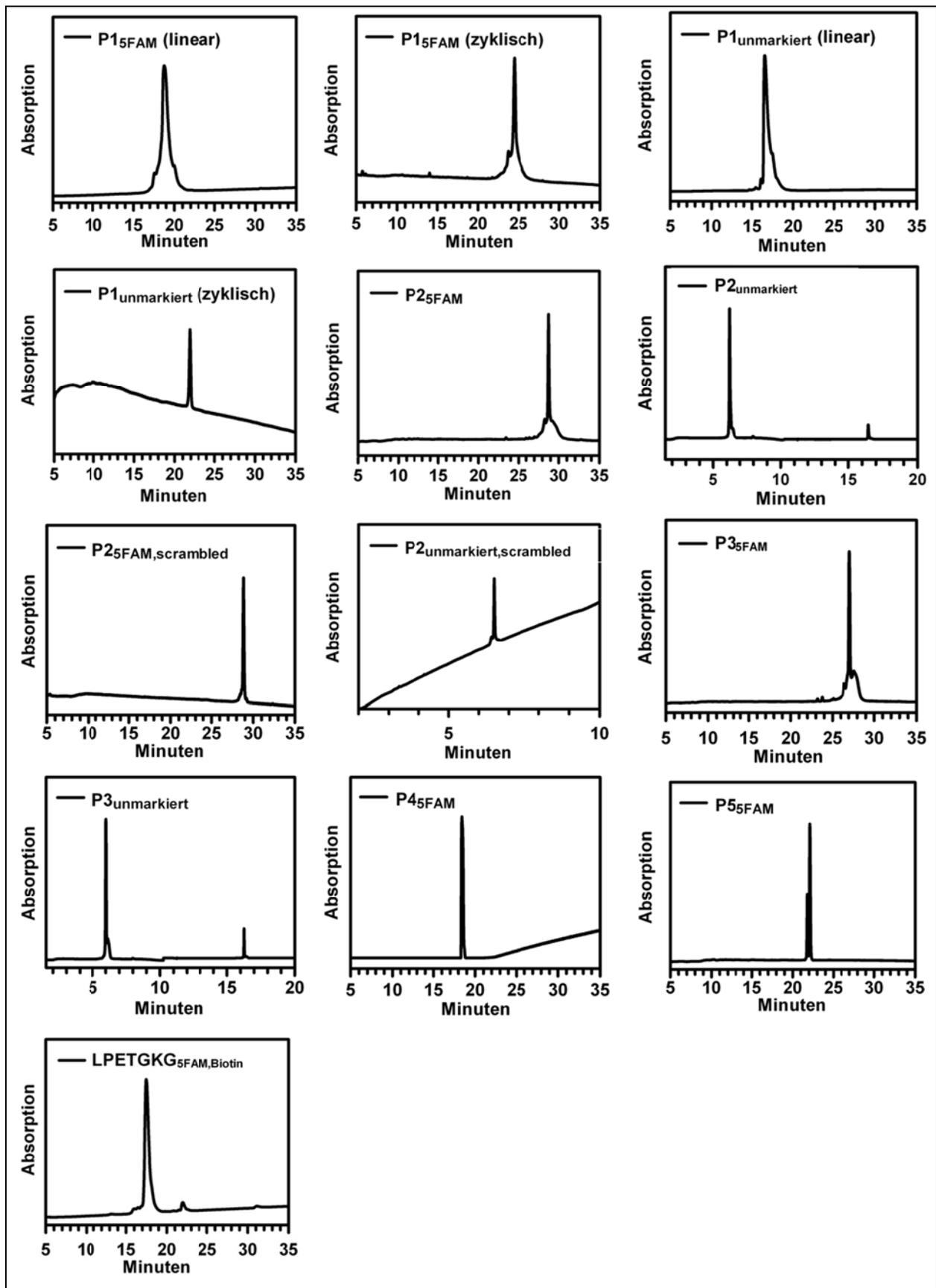


Abb.13 analytische HPLC-Spektren der 13 verwendeten Peptide. Die Spektren zeigen die Absorption bei 214 nm.

2.3.3 Ergebnisse: K_d -Werte

2.3.3. K_d -Werte der Peptidinhibitoren und SrtA

Die Dissoziationskonstanten der Peptidsequenzen / Fusionsproteine und SrtA $_{\Delta N59}$ lagen im niedrigen nanomolaren Bereich. Sie wurden mittels Fluoreszenzpolarisation bestimmt (Erläuterung des Messprinzips siehe 6.1). Hierbei lässt sich eine Komplex-Bildung oder -Dissoziation zwischen einem fluorophormarkiertem Molekül und einem wesentlich größeren Bindungspartner messen, da der Komplex höhere Fluoreszenzpolarisationswerte erzeugt, als das freie fluorophormarkierte Molekül.

2.3.3.1. K_d -Werte der fluoresceinmarkierten Peptidinhibitoren und SrtA

Die fluoresceinmarkierten Peptide zeigten an SrtA $_{\Delta N59}$ K_d -Werte zwischen 12 nM und 94 nM. Sie konnten direkten K_d -Messungen unterzogen werden. Sie wurden in konstanter Konzentration vorgelegt und SrtA $_{\Delta N59}$ hinzutitriert. Die mit zunehmender SrtA $_{\Delta N59}$ -Konzentration zunehmende Peptid:SrtA $_{\Delta N59}$ -Komplexkonzentration konnte anhand zunehmender Fluoreszenzpolarisationswerte verfolgt werden. Zur Erhöhung der Datenqualität wurde die eingesetzte Peptidkonzentration für jedes Peptid separat optimiert. Die Bindungskurven beruhen auf einer spezifischen Bindung zwischen dem jeweiligen Peptid und SrtA $_{\Delta N59}$. Kontrolltitrationen von sowohl Sortase B (SrtB $_{\Delta N27}$), als auch SrtA $_{\Delta N59}$ -Puffer zu den Peptiden zeigten in entsprechenden Konzentrationen keinen Einfluss auf die gemessenen Fluoreszenzpolarisationswerte. Die Bindungskurven der fluoresceinmarkierten Peptide an SrtA $_{\Delta N59}$ sind in Abb. 14 dargestellt. Gleichung [2] (siehe Anhang) wurde an die Datenpunkte angepasst, um die jeweiligen K_d -Werte zu erhalten. Zum Teil war diese Anpassung nur möglich, wenn die jeweilige Peptidkonzentration als Variable, statt als Konstante entsprechend Tabelle 20 (Seite 126), definiert war (Abb. 14). Dies könnte auf einer Differenz zwischen der ermittelten Peptidkonzentration und der tatsächlichen

Tabelle. 3: Ergebnisse der Anpassungen von Gleichung [2] (siehe Anhang) an die Bindungskurven der fluoresceinmarkierten Peptide an SrtA $_{\Delta N59}$ (Abb. 14). Die Peptidkonzentration wurde entweder als Variable oder als Konstante entsprechend Tabelle 20 (Seite 126) definiert.

Peptid	[Peptid] konstant		[Peptid] variabel		gemittelter K_d -Wert
	[Peptid]	K_d -Wert	[Peptid]	K_d -Wert	
P1 _{5FAM} (linear)	46 nM	11 ± 1 nM	37 ± 1 nM	13 ± 2 nM	12 ± 1 nM
P1 _{5FAM} (zyklisch)	506 nM	1 ± 3 nM	240 ± 18 nM	19 ± 1 nM	10 ± 9 nM
P2 _{5FAM}	100 nM	55 ± 16 nM	10 nM*	94 ± 11 nM	75 ± 20 nM
P3 _{5FAM}	100 nM	37 ± 9 nM	10 nM*	63 ± 6 nM	50 ± 13 nM

* Es wurde die [Peptid] als Konstante definiert, für die sich Gleichung [2] (siehe Anhang) am besten an die Datenpunkte anpassen ließ. War [Peptid] als Variable definiert, resultierten negative [Peptid]-Werte.

2.3.3 Ergebnisse: K_d -Werte

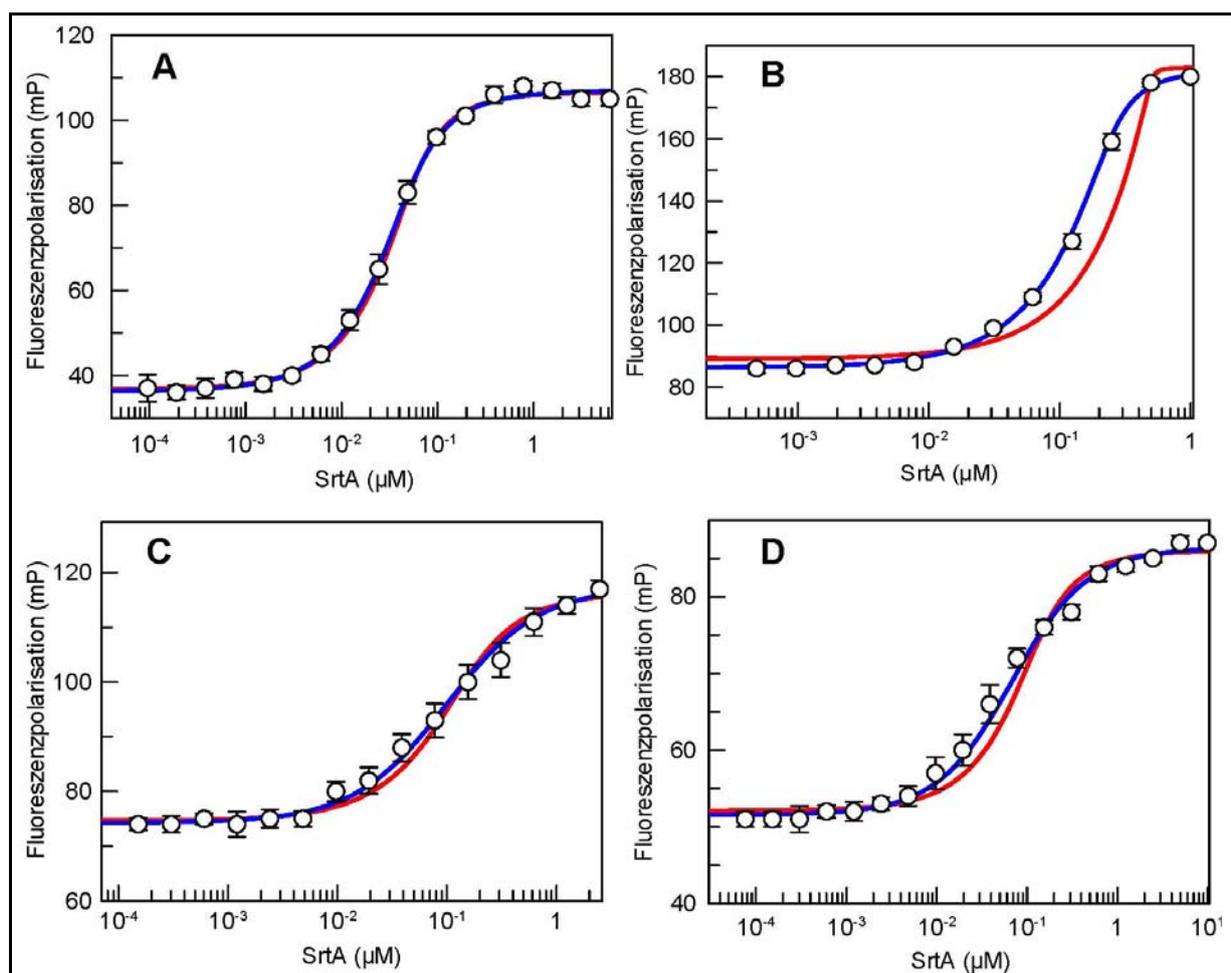


Abb. 14: Bindungsmessungen der fluoresceinmarkierten Peptide an SrtA_{ΔN59} mittels Fluoreszenzpolarisierung.

SrtA_{ΔN59} wurde zu 46 nM P1_{5FAM} (linear) (A), 506 nM P1_{5FAM} (zyklisch) (B), 100 nM P2_{5FAM} (C) oder 100 nM P3_{5FAM} (D) titriert. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten aus jeweils drei unabhängigen Titrations und deren Standardabweichungen. Die K_d -Werte wurden durch Anpassung von Gleichung [2] (siehe Anhang) an die Datenpunkte (durchgezogene Linien) erhalten. Die Funktionsanpassungen wurden mit variabler Peptidkonzentration (blaue Linien) oder mit entsprechend Tabelle 20 (Seite 126) fixierter Peptidkonzentration (rote Linien) durchgeführt.

Konzentration an aktivem, gelöstem Peptid beruhen. Untersuchungen hierzu sind unter 2.3.4 aufgeführt. Da die erhaltenen K_d -Werte aus den Fits mit entweder variabler oder konstanter Peptidkonzentration keine signifikanten Unterschiede aufweisen, wurden sie gemittelt (Tabelle 3, Seite 31).

Die Bindungsaffinitäten von P1_{5FAM} (linear) und P1_{5FAM} (zyklisch) zu dem Komplex (SrtA_{bio}:Avidinmonomer)₄ entsprechen denen zur freien SrtA_{ΔN59}. Für den mRNA Display, aus dem die untersuchten Peptidsequenzen P1, P2 und P3 hervorgingen, wurde als Zielkonstrukt (SrtA_{bio}:Avidinmonomer)₄ genutzt. SrtA bildet in Lösung, bei zweistellig mikromolaren Konzentrationen, Dimere aus, welche eine höhere Substrataffinität aufweisen als SrtA-Monomere (Zhu et al., 2007). Es wurden exemplarisch für P1_{5FAM} (linear) und P1_{5FAM} (zyklisch) K_d -Werte an (SrtA_{bio}:Avidinmonomer)₄ ermittelt (Abb. 15, Tab. 4), und

2.3.3 Ergebnisse: K_d -Werte

ausgeschlossen, dass an den Avidintetrameren, aufgrund der hohen lokalen Konzentration, SrtA-Dimere mit höherer Affinität zur P1-Sequenz als freie SrtA $_{\Delta N59}$ vorliegen.

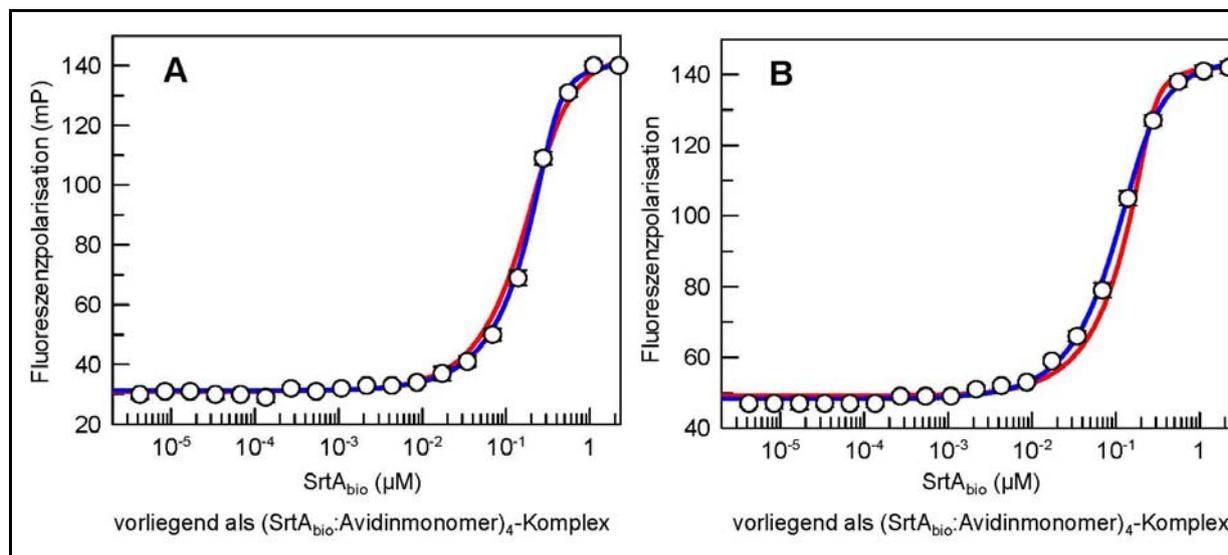


Abb. 15: Bindungsmessungen fluoresceinmarkierter Peptide an den Komplex (SrtA_{bio}:Avidinmonomer)₄ mittels Fluoreszenzpolarisierung. (SrtA_{bio}:Avidinmonomer)₄ wurde zu 228 nM P1_{5FAM} (linear) (A), oder zu 253 nM P1_{5FAM} (zyklisch) (B) titriert. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten aus jeweils drei unabhängigen Titrationen und deren Standardabweichungen. Die K_d -Werte wurden durch Anpassung von Gleichung [2] (siehe Anhang) an die Datenpunkte (durchgezogene Linien) erhalten. Die Funktionsanpassungen wurden mit variabler Peptidkonzentration (blaue Linien) oder mit entsprechend Tabelle 20 (Seite 126) fixierter Peptidkonzentration (rote Linien) durchgeführt.

Tabelle. 4: Ergebnisse der Anpassungen von Gleichung [2] (siehe Anhang) an die Bindungskurven der fluoresceinmarkierten Peptide an (SrtA_{bio}:Avidinmonomer)₄ (Abb. 15). Die Peptidkonzentration wurde entweder als Variable oder entsprechend Tabelle 20 (Seite 126) als Konstante definiert.

Peptid	[Peptid] konstant		[Peptid] variabel		gemittelter K_d -Wert
	[Peptid]	K_d -Wert	[Peptid]	K_d -Wert	
P1 _{5FAM} (linear)	228 nM	64 ± 11 nM	343 ± 20 nM	21 ± 7 nM	43 ± 22 nM
P1 _{5FAM} (zyklisch)	253 nM	10 ± 6 nM	143 ± 15 nM	37 ± 8 nM	24 ± 13 nM

2.3.3.2. K_d -Werte der unmarkierten Peptidinhibitoren und SrtA

Die unmarkierten Peptide / MBP-Fusionsproteine zeigen an SrtA $_{\Delta N59}$ K_d -Werte zwischen 10 nM und 81 nM, welche denen der fluoresceinmarkierten Peptide (2.3.3.1) entsprechen. Die unmarkierten Peptide wurden für IC₅₀-Messungen der Peptidsequenzen an SrtA $_{\Delta N59}$ mittels Fluoreszenzpolarisierung (2.3.5.2) benötigt. Der Inhibitionsassay beruht auf einem fluoresceinmarkierten Substratmolekül, deshalb würde eine Fluoresceinmarkierung des hinzutitrierten Inhibitors die Daten erheblich verfälschen. Die MBP-Fusionsproteine wurden für die Bestimmung von ΔH , ΔS und N mittels ITC benötigt (2.3.4). Diese Methode erfordert

2.3.3 Ergebnisse: K_d -Werte

wesentlich größere Mengen und höhere Konzentrationen an Bindungs-partnern als die Messung der Fluoreszenzpolarisation. Daher wurde das gut lösliche, leicht zu exprimierende und aufzureinigende MBP-P1_{nativ} hergestellt, welches über DBX zu MBP-P1_{zyklisch} zyklisiert werden konnte. Aus einem Zyklisierungskontrollansatz ohne DBX resultierte MBP-P1_{Kontrolle}. Zur Bestimmung der K_d -Werte der unmarkierten Peptide / MBP-Fusionsproteine mittels Fluoreszenzpolarisation wurden Verdrängungstitrationen vorgenommen (Mathias und Jung, 2007). Hierzu wurde von dem jeweiligen unmarkierten Peptid / Fusionsprotein eine Verdünnungsreihe (1:2) angefertigt und das entsprechende fluoresceinmarkierte Peptid in konstanter, seinem unter 2.3.3.1 ermittelten K_d -Wert näherungsweise entsprechender Konzentration zugegeben. Als letztes wurde SrtA_{ΔN59} in ca. 20-fachem molaren Überschuss gegenüber dem fluoresceinmarkierten Peptid hinzugefügt (Tab. 5). Die Verdrängung des fluoresceinmarkierten Peptids durch das unmarkierte Peptid / Fusionsprotein aus der Bindung an SrtA_{ΔN59} konnte hierbei als eine Abnahme der Fluoreszenzpolarisationswerte verfolgt werden. Die Verdrängungskurven sind in Abb. 16 dargestellt. Die K_d -Werte der unmarkierten Peptide / MBP-Fusionsproteine (Tabelle 5) ergeben sich nach Kenakin (Kenakin, 1993) unter Verwendung der Gleichungen [4] und [5] (siehe Anhang) aus dem K_d -Wert des eingesetzten fluoresceinmarkierten Peptides (siehe 2.3.3.1), dessen Konzentration, der Konzentration an SrtA_{ΔN59} und dem Wendepunkt (EC_{50}) der jeweiligen Verdrängungskurve. Die EC_{50} -Werte der Verdrängungskurven wurden durch Anpassungen von Gleichung [3] (siehe Anhang) an die Datenpunkte ermittelt (Tab. 5). Als Kontrollen wurden entsprechende Verdünnungsreihen des Lösemittels DMSO bzw. des Fusionsproteinpuffers vermessen. In den eingesetzten Konzentrationen beeinflussten weder DMSO noch der Fusionsproteinpuffer die mP-Werte.

Tabelle. 5: K_d -Werte der unmarkierten Peptide / Fusionsproteine an SrtA_{ΔN59}, die für deren Berechnung eingesetzten EC_{50} -Werte und Konzentrationen an SrtA_{ΔN59} und 5FAM-markierten Peptiden. *siehe Text, S. 34, Z. 4

unmarkiertes Peptid / Fusionsprotein	verdrängtes 5FAM-markiertes Peptid	[5FAM-markiertes Peptid]	[SrtA _{ΔN59}] (nM)	Wendepunkt der Verdrängungskurve	K_d -Wert des unmarkierten Peptids / Fusionsproteins
P1 _{unmarkiert} (linear)	P1 _{5FAM} (linear)	18,24 nM	400	359 ± 12 nM	10 ± <1 nM
P1 _{unmarkiert} (zyklisch)	P1 _{5FAM} (zyklisch)	20,24 nM	400	3,48 ± 2,47 μM	81 ± 57 nM
P2 _{unmarkiert}	P2 _{5FAM}	50 nM	1000	229 ± 99 nM	18 ± 8 nM
P3 _{unmarkiert}	P3 _{5FAM}	40 nM	800	1,18 ± 0,15 μM	76 ± 10 nM
MBP-P1 _{nativ}	P1 _{5FAM} (linear)	18,24 nM	400	301 ± 19 nM	9 ± 1 nM
MBP-P1 _{zyklisch}	P1 _{5FAM} (linear)	18,24 nM	400	3,41 ± 0,11 μM	40 ± 1 nM
MBP-P1 _{Kontrolle} *	P1 _{5FAM} (linear)	18,24	400	407 ± 12 nM	12 ± <1 nM

2.3.3 Ergebnisse: K_d -Werte

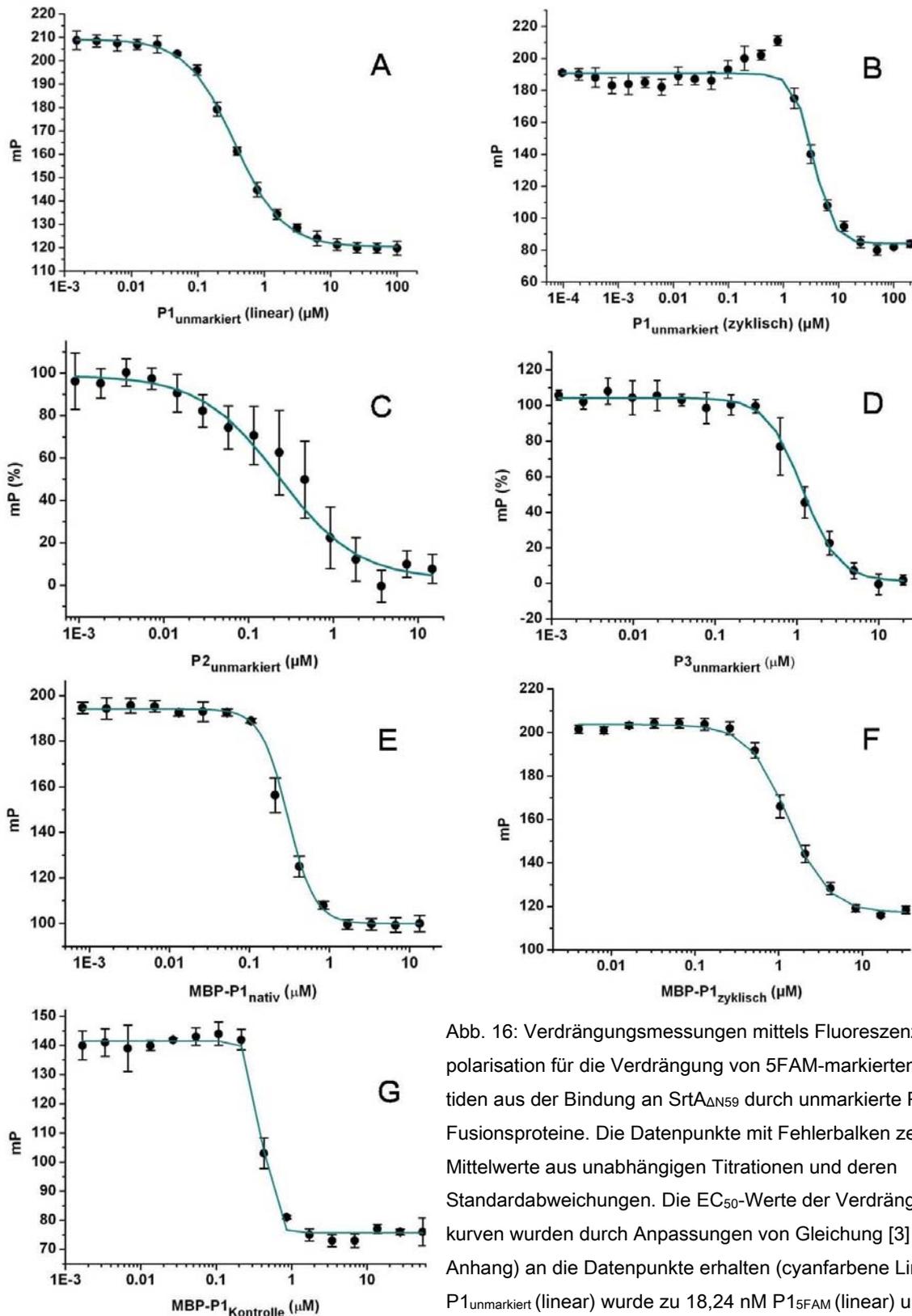


Abb. 16: Verdrängungsmessungen mittels Fluoreszenz-polarisation für die Verdrängung von 5FAM-markierten Peptiden aus der Bindung an SrtA $_{\Delta N59}$ durch unmarkierte Peptide / Fusionsproteine. Die Datenpunkte mit Fehlerbalken zeigen die Mittelwerte aus unabhängigen Titrations und deren Standardabweichungen. Die EC_{50} -Werte der Verdrängungskurven wurden durch Anpassungen von Gleichung [3] (siehe Anhang) an die Datenpunkte erhalten (cyanfarbene Linie).

P1 $_{unmarkiert}$ (linear) wurde zu 18,24 nM P1 $_{5FAM}$ (linear) und 400 nM SrtA $_{\Delta N59}$ titriert, n=4 (A). P1 $_{unmarkiert}$ (zyklisch) wurde zu 20,24 nM P1 $_{5FAM}$ (zyklisch) und 400 nM SrtA $_{\Delta N59}$ titriert, n=3 (B). P2 $_{unmarkiert}$ wurde zu 50 nM P2 $_{5FAM}$ und 1000 nM SrtA $_{\Delta N59}$ titriert. Die mP-Werte wurden normalisiert, da sie aus verschiedenen Mikrotiterplatten stammen, n=6 (C). P3 $_{unmarkiert}$ wurde zu 40 nM P3 $_{5FAM}$ und 800 nM SrtA $_{\Delta N59}$ titriert. Die mP-Werte wurden normalisiert, da sie aus verschiedenen Mikrotiterplatten stammen, n=4 (D). MBP-P1 $_{nativ}$ (E), MBP-P1 $_{zyklisch}$ (F) und MBP-P1 $_{Kontrolle}$ (G) wurden zu 18,24 nM P1 $_{5FAM}$ (linear) und 400 nM SrtA $_{\Delta N59}$ titriert, n=3 (E), n=4 (F) und n=3 (G).

2.3.4 Enthalpie, Entropie und Stöchiometrie (N) der Bindung zwischen linearer oder zyklischer P1-Peptidsequenz und SrtA $_{\Delta N59}$

Die Bindungsstöchiometrie für sowohl die zyklische P1-Sequenz als auch die lineare P1-Sequenz an SrtA $_{\Delta N59}$ ist 1. Beide Bindungskurven zeigen das gleiche Reaktionsprofil. Sie sind Enthalpiegetrieben, wobei die Entropie nur eine geringe Änderung erfährt. Dies konnte mittels Isothermaler Titrations Kalorimetrie (ITC) gezeigt werden. Die ITC-Messungen wurden mit MBP-P1-Fusionsproteinen durchgeführt, da die Peptide nicht die erforderliche Löslichkeit in wässrigem Puffer aufwiesen. Unter 2.3.3.1 zeigte sich, dass sich Gleichung [2] an die Bindungskurven für die fluoresceinmarkierten Peptide und SrtA mit geringeren angenommenen Peptidkonzentrationen, als den experimentell eingesetzten, besser anpassen ließ. Dieser Effekt war für die zyklischen Peptidsequenzen (P1 $_{5FAM}$ (zyklisch), P2 $_{5FAM}$ und P3 $_{5FAM}$) ausgeprägter als für die Lineare (P1 $_{5FAM}$ (linear)). Hierfür könnten inhomogene Peptidlösungen verantwortlich sein. Es war aber auch vorstellbar, dass die Peptidzyklisierung die Cis- / Trans-Isomerie der Peptide beeinflusst und dadurch den Anteil bindungsaktiver Peptidmoleküle senkt. Diese Vermutung kann durch die hier ermittelten N-Werte für P1 widerlegt werden. Die ermittelten Enthalpie getriebenen Reaktionsprofile zeigen, dass die Bindung zwischen der P1-Sequenz und SrtA $_{\Delta N59}$ auf der Ausbildung von Salz- und / oder Wasserstoffbrücken beruht, wobei die Entropiestrafe durch die Freisetzung von Lösemittelmolekülen ausgeglichen wird. Das Vorhandensein oder Fehlen einer Zyklisierung hat keinen Einfluss auf die Reaktionsprofile.

Isothermaler Titrations Kalorimetrie (Ausführliche Erläuterung siehe 6.2):

Aus einer ITC-Messung erhält man die Wärmeänderung oder Enthalpie ΔH , die während der Titration zweier Bindungspartner auftritt. Trägt man die integrierte Reaktionswärme gegen das molare Verhältnis der Bindungspartner auf, so lässt sich aus dem Kurvenverlauf ΔH , die Entropie ΔS , die Stöchiometrie N und der K_d -Wert bei geeigneter Kurvensteilheit bestimmen. Die Kurvensteilheit wird von der Relation [Rezeptor] / K_d -Wert (= C-Wert) bestimmt. Liegt der C-Wert unter 10, ist die Kurve derart flach, dass sie nicht charakterisiert werden kann. Ein C-Wert zwischen 10 und 100 führt zu mittelsteilen Kurven, aus denen der K_d -Wert gut bestimmt werden kann. C-Werte über 5000 sind gut geeignet um ΔH und N genau zu bestimmen, der K_d -Wert hingegen kann bei hohen C-Werten nicht bestimmt werden.

Durchgeführte ITC-Experimente:

Eine K_d -Bestimmung für SrtA $_{\Delta N59}$ und die P1-Sequenz mittels ITC ist nicht durchführbar, da ein C-Wert zwischen 10 und 100 einer SrtA $_{\Delta N59}$ -Konzentration von 0,1 - 1 μM entspricht,

welche nicht für eine detektierbare Enthalpieänderung ausreicht. Da die entsprechenden K_d -Werte unter 2.3.3.2 bereits bestimmt wurden, werden hier ITC-Experimente mit sehr hohen C-Werten durchgeführt, womit die Enthalpie ΔH und Stöchiometrie N gut charakterisiert werden können. Mittels Gleichung [17] (siehe Anhang) und der bekannten K_d -Werte lässt sich die freie Energie ΔG und somit Anhand von Gleichung [18] (siehe Anhang) die Entropie ΔS bestimmen. Eine wichtige Voraussetzung für ITC-Messungen ist, dass die beiden Bindungspartner in möglichst gleichem Puffer vorliegen, da durch die Mischung ungleicher Lösungen Wärme umgesetzt wird, wodurch die Bestimmung der Bindungswärme erschwert wird. Die Puffereffekte lassen sich am effektivsten durch Dialyse beider Bindungspartner gegen ein gemeinsames Pufferreservoir vermeiden. Da für die hier durchgeführten ITC-Experimente hohe Konzentrationen der Peptidsequenzen in wässrigem Puffer benötigt wurden, wurden statt der Peptide die erheblich besser löslichen MBP-P1-Fusionsproteine verwendet. Dies wurde exemplarisch für die P1-Sequenz durchgeführt und MBP-P1 wurde mittels DBX zyklisiert. MBP-P1_{nativ} entspricht unbehandeltem (linearem) Fusionsprotein, MBP-P1_{zyklisch} dem zyklisierten Fusionsprotein und MBP-P1_{Kontrolle} entspricht linearem Fusionsprotein, welches der Zyklisierungsprozedur in Abwesenheit von DBX unterzogen wurde (Herstellung siehe 2.3.1). MBP, die MBP-P1-Varianten und SrtA Δ N59 wurden gegen ein gemeinsames Pufferreservoir dialysiert und anschließend die ITC-Experimente bei 25°C durchgeführt. Die beiden Kontrollexperimente (Abb. 17 und 18) zeigen erstens, dass bei der Titration von SrtA Δ N59 in Puffer keine, im Vergleich zu den in Abb. 19 - 21 gezeigten Messungen, signifikanten Änderungen der Enthalpie auftreten, die gewählten Dialysebedingungen also hinreichend sind, und zweitens, dass das MBP selbst keine relevante Bindungsaffinität zu SrtA Δ N59 aufweist.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Titrations von ca. 500 μ M SrtA Δ N59 zu ca. 30 μ M MBP-P1_{nativ}, MBP-P1_{zyklisch} und MBP_{Kontrolle}. Da hier das Verhältnis Rezeptorkonzentration / K_d (= C-Wert) sehr hoch liegt, erhält man annähernd rechtwinklige Datenkurven aus denen sich die Bindungsenthalpie ΔH und die Stöchiometrie N am genauesten bestimmen lassen. Passt man Gleichung [3] (siehe Anhang) an die Daten an, so ergibt sich aus der Differenz zwischen A1 und A2 die Enthalpie ΔH der Bindung, und man erhält den Wendepunkt (EC₅₀-Wert bzw. x0) der Bindungskurve. Die Stöchiometrie N entspricht dem molaren Verhältnis, bei welchem die Bindungskurve abfällt, graphisch also dem x-Wert, für den die Funktion der am Wendepunkt angelegten Tangente den Wert A2 annimmt (Gleichungen [13] - [15], siehe Anhang). Die Entropie ΔS wurde mit Hilfe von Gleichungen [17] und [18] (siehe Anhang) berechnet, wobei die K_d -Werte aus 2.3.3.2 eingesetzt wurden.

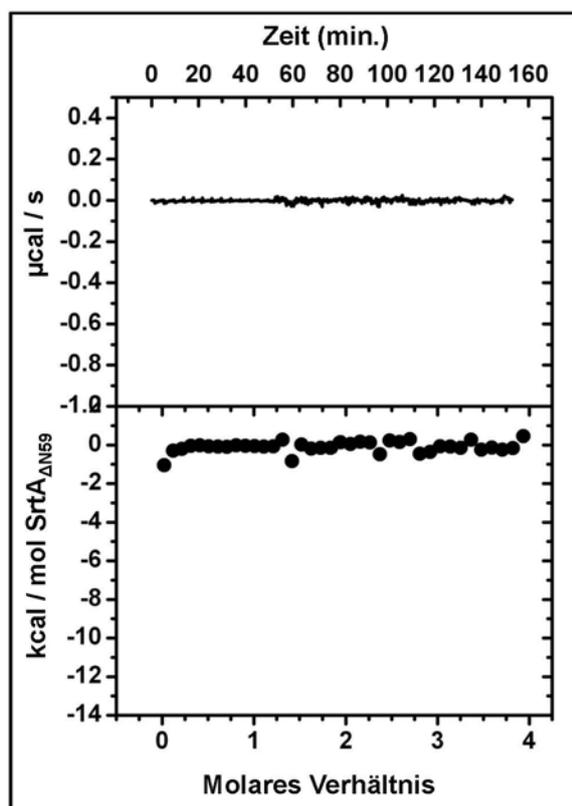


Abb. 17: ITC-Kontrollexperiment: Titration von 515 μM SrtA ΔN59 zu Puffer

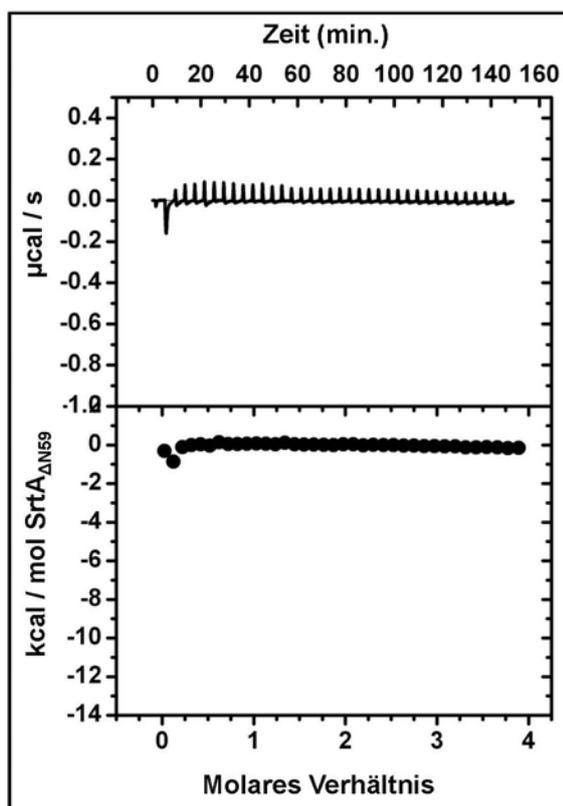


Abb. 18: ITC-Kontrollexperiment: Titration von 1,4 mM SrtA ΔN59 zu 75 μM MBP

Abb. 19 (Seite 39) zeigt das Ergebnis eines ITC-Experimentes bei welchem 515 μM SrtA ΔN59 zu 30 μM MBP-P1_{nativ} titriert wurden. Anhand der Ergebnisse der Anpassung von Gleichung [3] an die integrierten Reaktionswärmern und den Gleichungen [13] - [15] lassen sich ΔH und N berechnen. Für N ergibt sich ein Wert von 0,976 und für ΔH ein Wert von -10,797 kcal / mol. Anhand des K_d -Wertes für SrtA ΔN59 und MBP-P1_{nativ} aus 2.3.3.2 von 9 nM ergibt sich aus Gleichungen [17] und [18] für die freie Energie ΔG ein Wert von -10,976 kcal / mol und für den Term $-T\Delta S$ ein Wert von -0,179 kcal / mol.

Abb. 20 (Seite 39) zeigt das Ergebnis eines ITC-Experimentes bei welchem 507 μM SrtA ΔN59 zu 29 μM MBP-P1_{zyklisch} titriert wurden. Anhand der Ergebnisse der Anpassung von Gleichung [3] an die integrierten Reaktionswärmern und den Gleichungen [13] - [15] lassen sich ΔH und N berechnen. Für N ergibt sich ein Wert von 0,916 und für ΔH ein Wert von -9,613 kcal / mol. Anhand des K_d Wertes für SrtA ΔN59 und MBP-P1_{nativ} aus 2.3.3.2 von 40 nM ergibt sich nach Gleichungen [17] und [18] für die freie Energie ΔG ein Wert von -10,093 kcal / mol und für den Term $-T\Delta S$ ein Wert von -0,477 kcal / mol.

Abb. 21 (Seite 39) zeigt das Ergebnis eines ITC-Experimentes bei welchem 524 μM SrtA ΔN59 zu 32 μM MBP-P1_{Kontrolle} titriert wurden. Anhand der Ergebnisse der Anpassung von Gleichung [3] an die integrierten Reaktionswärmern und den Gleichungen [13] - [15] lassen

2.3.4 Ergebnisse: ΔH , ΔS und N

sich ΔH und N berechnen. Für N ergibt sich ein Wert von 0,969 und für ΔH ein Wert von -11,731 kcal / mol. Anhand des K_d Wertes für $SrtA_{\Delta N59}$ und $MBP-P1_{nativ}$ aus 2.3.3.2 von 12 nM ergibt sich nach Gleichungen [17] und [18] für die freie Energie ΔG ein Wert von -10,809 kcal / mol und für den Term $-T\Delta S$ ein Wert von +0,924 kcal / mol.

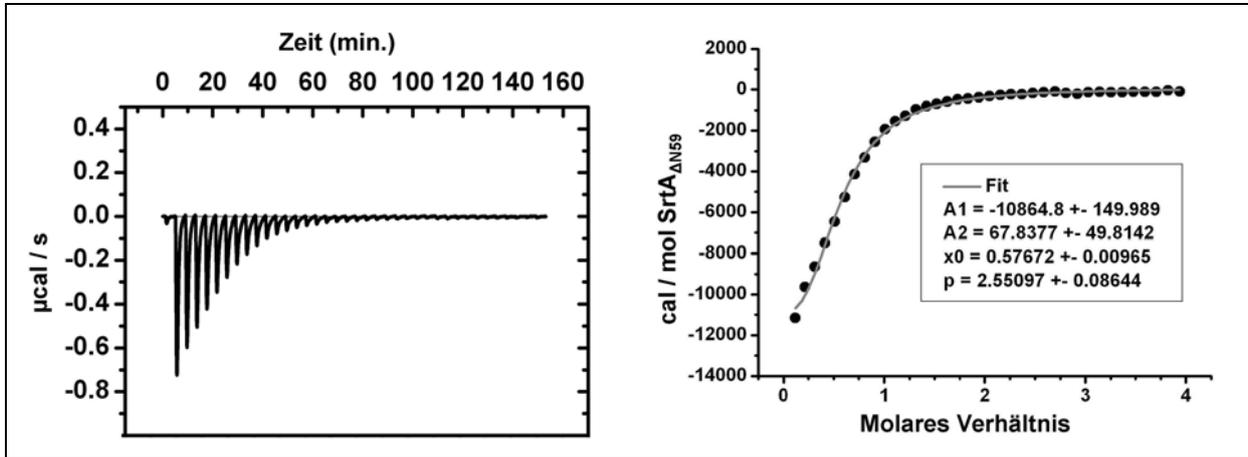


Abb. 19: ITC-Experiment: Titration von 515 μM $SrtA_{\Delta N59}$ zu 30 μM $MBP-P1_{nativ}$ und Anpassung („Fit“) von Gleichung [3] (siehe Anhang) an die integrierten Reaktionswärmen

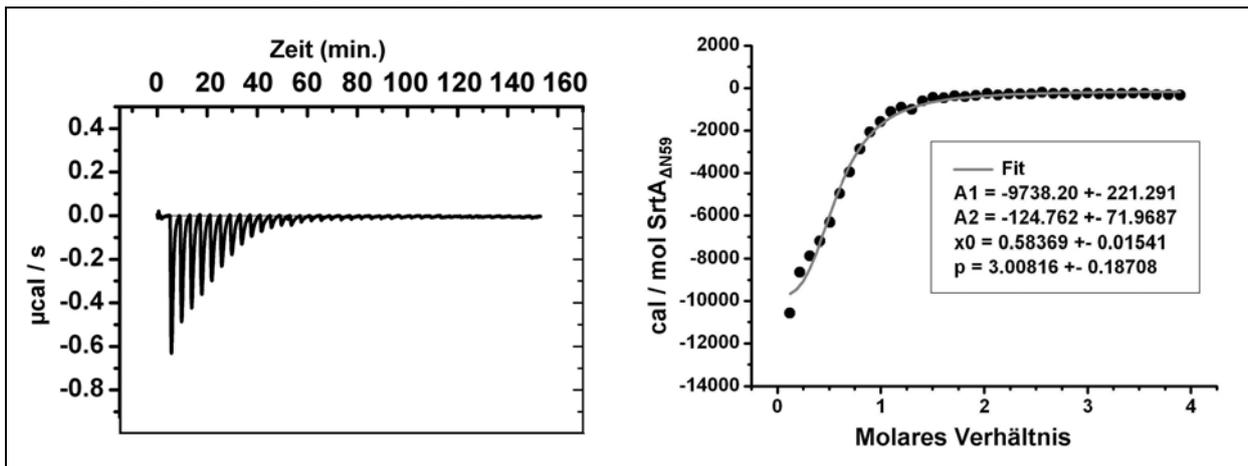


Abb. 20: ITC-Experiment: Titration von 507 μM $SrtA_{\Delta N59}$ zu 29 μM $MBP-P1_{zyklisch}$ und Anpassung („Fit“) von Gleichung [3] (siehe Anhang) an die integrierten Reaktionswärmen

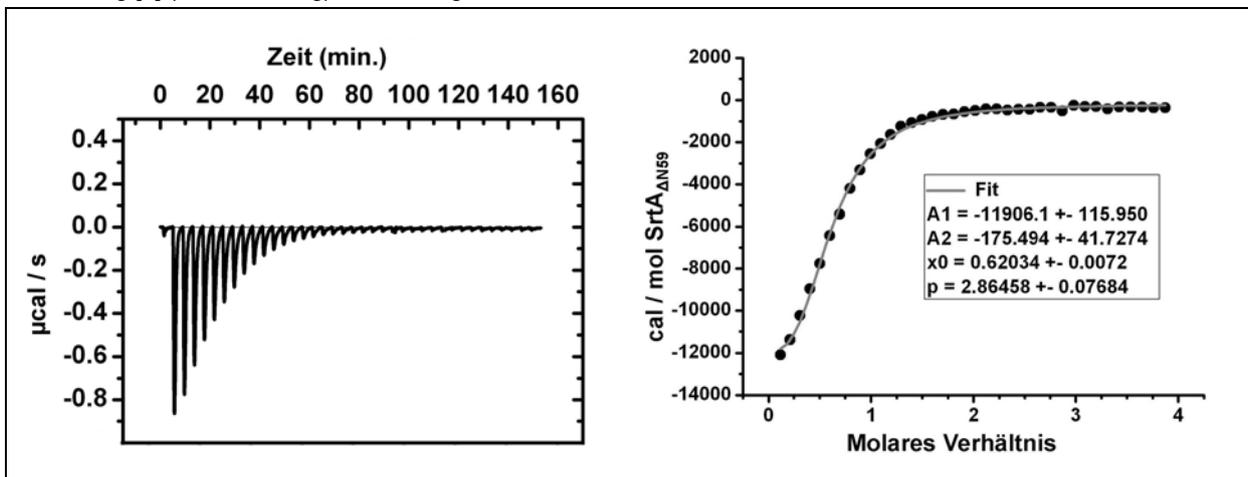


Abb. 21: ITC-Experiment: Titration von 524 μM $SrtA_{\Delta N59}$ zu 32 μM $MBP-P1_{Kontrolle}$ und Anpassung („Fit“) von Gleichung [3] (siehe Anhang) an die integrierten Reaktionswärmen

2.3.4 Ergebnisse: ΔH , ΔS und N

Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse der Bindungscharakterisierung von $SrtA_{\Delta N59}$ und $MBP-P1_{nativ}$, $MBP-P1_{zyklisch}$ bzw. $MBP-P1_{Kontrolle}$ mittels ITC. *1 Werte übernommen aus 2.3.3.2 *2 bezogen auf ΔH

Ligand	N	ΔH (kcal / mol)	K_d (nM)	ΔG (kcal / mol)	$-T\Delta S$ (kcal / mol) T = 298°K	Fehler der Funktionsanpassung (%)			
						A1 *2	A2 *2	x0	p
$MBP-P1_{nativ}$	0,976	-10,797	9 *1	-10,976	-0,179	1,4	0,5	1,7	3,4
$MBP-P1_{zyklisch}$	0,916	-9,613	40 *1	-10,093	-0,477	2,3	0,8	2,6	6,2
$MBP-P1_{Kontrolle}$	0,969	-11,731	12 *1	-10,806	+0,924	1,0	0,4	1,2	2,7

Tabelle 6 zeigt zusammenfassend die Ergebnisse der in diesem Unterpunkt aufgeführten ITC-Experimente. Die ermittelten Stöchiometrien N für die Bindungen zwischen $SrtA_{\Delta N59}$ und den drei Liganden $MBP-P1_{nativ}$, $MBP-P1_{zyklisch}$ und $MBP-P1_{Kontrolle}$ weichen nur um ca. 6 % voneinander ab, was nicht als signifikant betrachtet werden kann. Die Zyklisierung von $MBP-P1$ beeinflusst also nicht den Anteil der in Bezug auf $SrtA_{\Delta N59}$ bindungsfähigen $MBP-P1$ -Moleküle. N weicht außerdem unter 10% von dem zu erwartenden Ergebnis von 1 ab, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Konzentration der Bindungspartner hinreichend genau bestimmt war und praktisch alle Proteine in einer bindungsaktiven Form vorlagen. Da aus der Anpassung von Gleichung [3] (siehe Anhang) an die integrierten Reaktionswärmen die Parameter A1, A2, x0 und p mit prozentualen Fehlern von 0,4 – 6,2 % (siehe Tabelle 6) hervorgingen, liegt der Fehler der aus diesen Parametern berechneten Werte für ΔH , $-T\Delta S$ und N schätzungsweise unter 10 %. Betrachtet man die ermittelten thermodynamischen Größen, so ist festzustellen, dass die Bindungen aller drei hier untersuchten Liganden an $SrtA_{\Delta N59}$ enthalpiegetrieben sind, während die Entropie nur eine sehr geringe Änderung erfährt. Da die ermittelten thermodynamischen Größen für die Bindungen aller drei Liganden an $SrtA_{\Delta N59}$ ähnliche Werte annehmen, hat die Zyklisierung von $MBP-P1$ keinen Einfluss auf das Bindungsgeschehen (Abb. 22).

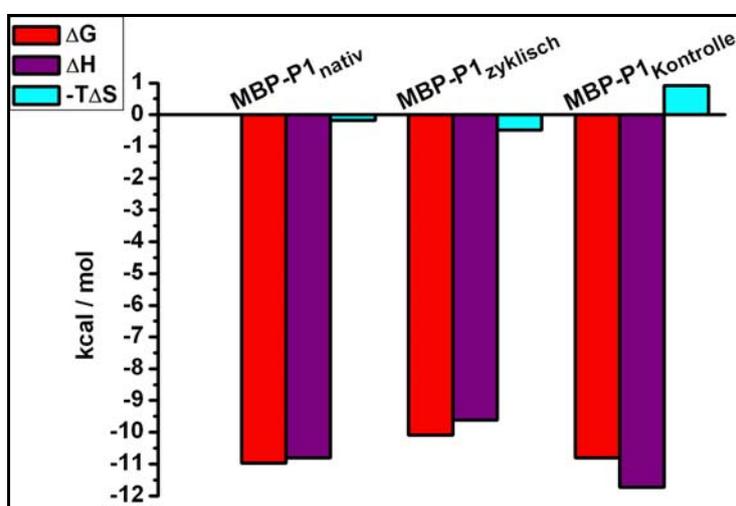


Abb. 22: Reaktionsprofile der Bindungen von $MBP-P1_{nativ}$, $MBP-P1_{zyklisch}$ bzw. $MBP-P1_{Kontrolle}$ an $SrtA_{\Delta N59}$

2.3.5 *In vitro* Bestimmung der Inhibition von SrtA_{ΔN59} durch die Peptidinhibitoren

2.3.5.1 Entwicklung eines SrtA-Aktivitätsassays

Es wurde ein auf Fluoreszenzpolarisation beruhender SrtA-Aktivitätsassay entwickelt, mit welchem die IC₅₀-Werte für die Peptidinhibitoren an SrtA_{ΔN59} bestimmt werden konnten. Die publizierten SrtA-Aktivitätsassays erwiesen sich als zu störungsanfällig bzw. zu wenig sensitiv. Die Literatur beschreibt zwei SrtA-Assays. Der ältere FRET-Assay beruht auf dem Einsatz von Varianten eines SrtA-Substrates (LPXTG-Peptid), welche einen Fluorophor enthalten, der über die SrtA-Erkennungspeptidsequenz an einen Fluoreszenzquencher gekoppelt ist. Durch die SrtA-Aktivität wird der Fluorophor räumlich von seinem Quencher entfernt und folglich kann die SrtA-Aktivität als Anstieg der Fluoreszenz verfolgt werden (Ton-That et al., 1999, 2000, 2002). Der neuere, auf HPLC basierende, SrtA-Assay nutzt eine Substrat-Variation des älteren FRET-Assays, verfolgt aber den Substratumsatz anhand der Lichtabsorption. Da Substrat und Produkte eindeutig voneinander getrennt werden können, kann hier die SrtA-Aktivität anhand der Integration der Substratpeakflächen quantitativ und unabhängig von Fluoreszenzlöschung bestimmt werden (Kruger et al., 2004b). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst versucht, die IC₅₀-Werte der zu untersuchenden Peptidinhibitoren durch den oben beschriebenen HPLC-Assay zu ermitteln. Die Lichtabsorptionsmessung zeigte jedoch nicht die gewünschte Sensitivität. Aufgrund der sogar in DMSO geringen Löslichkeit der Peptidinhibitoren wurden diese nur in geringen Konzentrationen eingesetzt, da davon ausgegangen wurde, dass DMSO-Konzentrationen von über 5% (v/v) die SrtA-Aktivität beeinträchtigen. Entsprechend mussten geringe Substratkonzentrationen eingesetzt werden und es gelang nicht, die Lichtabsorption des Substrates zu detektieren. So wurde die besser detektierbare Fluoreszenz des Substrates zur Peakflächenintegration herangezogen. Zwar konnte der Substratumsatz durch SrtA_{ΔN59} so verfolgt werden, jedoch führte die Zugabe von Peptidinhibitoren zu den Ansätzen zu einer erheblichen Streuung der Messwerte und eine Auswertung war nicht möglich (die entsprechenden Daten werden in der vorliegenden Arbeit nicht aufgeführt).

Prinzip des entwickelten, auf Fluoreszenzpolarisation beruhenden, SrtA-Aktivitätsassays

Wie bereits für die Bestimmung der Bindungskonstanten wird auch für die Ermittlung der IC₅₀-Werte der hier zu untersuchenden Peptidinhibitoren an SrtA_{ΔN59} auf die Methode der Fluoreszenzpolarisation zurückgegriffen (Erläuterung siehe 6.2). Da der Fluoreszenzpolarisationswert aus den Fluoreszenzintensitäten zwischen zweier zueinander

orthogonaler Polarisationsrichtungen berechnet wird (Gleichung [16], siehe Anhang), beeinflusst eine Veränderung der Gesamtfluoreszenzintensität den ermittelten Polarisationswert nur geringfügig. Daher sind Fluoreszenzpolarisationsmessungen unempfindlich gegenüber Fluoreszenzlöschungen. Der neu entwickelte SrtA-Assay sollte daher eine erheblich geringere Streuung der Messwerte als der getestete HPLC-Assay aufweisen. Mit Hilfe der Fluoreszenzpolarisation lässt sich die Bindung eines fluorophormarkierten Moleküls an einen wesentlich größeren Bindungspartner messen, da das fluorophormarkierte Molekül in gebundener Form höhere Polarisationswerte erzeugt als in freier Form. Ein auf Fluoreszenzpolarisation basierender Protease-Aktivitätsassay ist in der Literatur für die HCMV (human cytomegalievirus) -Protease beschrieben worden (Levine et al., 1997). Das Peptidsubstrat der HCMV-Protease wurde hierbei am C-Terminus fluoresceinmarkiert und am N-Terminus biotinyliert. Nach der Inkubation der HCMV-Protease mit dem Substrat wird die Reaktion mit einem Überschuss an Avidin gestoppt und die Fluoreszenzpolarisation der Ansätze gemessen. Avidin und Biotin zeigen eine sehr hohe Bindungsaffinität zueinander, weshalb von ungeschnittenem Substrat eine vergleichsweise hohe Fluoreszenzpolarisation hervorgerufen wird. Der Fluorophor des 1,8 kDa großen Substrates wird durch die Substratbiotinylierung an das 66 kDa große Avidintetramer gebunden. Sobald das Substrat jedoch proteolytisch gespalten ist, kann der Fluorophor nicht mehr über Biotin an Avidin gebunden werden, und die resultierende Fluoreszenzpolarisation des freien, fluoresceinmarkierten Eduktes ist gering. So kann die Proteaseaktivität als eine Abnahme der Fluoreszenzpolarisation verfolgt werden. Aus den gemessenen Werten kann durch die Gleichungen [6] - [10] (siehe Anhang) die verbliebene Substratkonzentration berechnet werden (Levine et al., 1997). Dementsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit ein auf Fluoreszenzpolarisation basierender SrtA-Aktivitätsassay entwickelt (Abb. 23). Das am N-Terminus fluoresceinmarkierte und am C-terminus biotinylierte neue SrtA Substrat LPETGKG_{5FAM,Biotin} bindet in seiner ungeschnittenen Form an Avidin. Diese Komplexbildung verursacht hohe Fluoreszenzpolarisationswerte. Wird das Substrat von SrtA gespalten, so wird zunächst der C-terminale Teil GKG_{Biotin} freigesetzt, welcher an Avidin binden kann, während der N-terminale Substratteil LPET_{5FAM} zunächst ein Acyl-Enzymintermediat mit der SrtA bildet. Im zweiten Schritt wird eine Peptidbindung zwischen der Carboxygruppe des Threonins und der Aminogruppe des im Reaktionspuffer vorhandenen Glycinamids ausgebildet (detailliertere Erklärung siehe 2.1.6) und LPET-Gly_{5FAM} wird freigesetzt. LPET-Gly_{5FAM} kann keine Bindung mit Avidin eingehen und verursacht niedrige Fluoreszenzpolarisationswerte. Werden also die Reaktionsansätze von SrtA und LPETGKG_{5FAM,Biotin} durch Avidinzugabe gestoppt, so kann die vorangegangene SrtA-Aktivität als Verringerung der Fluoreszenzpolarisation gemessen werden (Abb. 23). Entsprechend

lässt sich, wird SrtA durch den Zusatz zunehmender Konzentrationen an SrtA-Inhibitor zunehmend inhibiert, dies anhand ansteigender Fluoreszenzpolarisationswerte verfolgen.

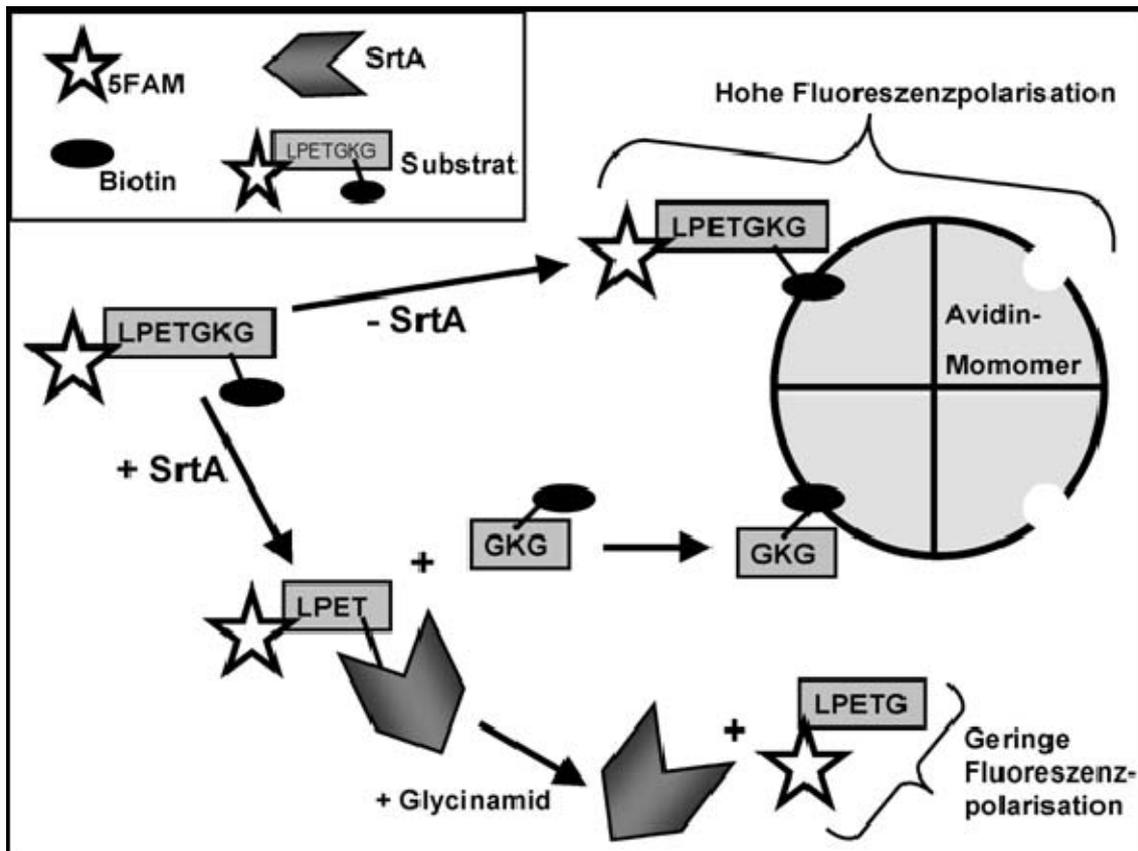


Abb. 23: Schema des entwickelten, auf Fluoreszenzpolarisation basierenden, SrtA-Aktivitätsassays

Möchte man von Fluoreszenzpolarisationswerten quantitativ auf Bindungsereignisse schließen, so muss die Fluorophorkonzentration in allen Reaktionsansätzen konstant sein. Daher darf bei dem hier entwickelten SrtA-Assay der hinzutitrierte SrtA-Inhibitor nicht den gleichen (oder ähnlichen) Fluorophor wie das Substrat tragen. Der Versuch, das Substrat alternativ mit Bodipy zu markieren, um die fluoresceinmarkierten Peptide vermessen zu können, scheiterte, da das Bodipy-Substrat eine hohe Neigung zur unspezifischen Bindung an das Mikrotiterplattenmaterial zeigte. Weitere Fluorophore wurden zur Markierung des Substrates nicht getestet. Es wurde als einfacher erachtet, die Peptidinhibitoren in unmarkierter Form herzustellen, um ihre IC₅₀-Werte an SrtA_{ΔN59} unter Verwendung des Substrates LPETGKG_{5FAM,Biotin} vermessen zu können.

Zunächst wurde das neue SrtA-Substrat LPETGKG_{5FAM,Biotin} charakterisiert, und anschließend, um eine hohe Sensitivität zu erreichen, die Assaybedingungen auf eine möglichst geringe Substrat- und SrtA-Konzentration eingestellt.

Die Arbeitshypothese, dass das Substrat LPETGKG_{5FAM,Biotin} von SrtA_{ΔN59} in das Produkt LPET-Gly_{5FAM} umgesetzt wird, wurde mittels HPLC bestätigt. Hierzu wurde das Substrat mit

1.3.5 Ergebnisse: IC₅₀-Werte

einem SrtA_{ΔN59}-Überschuss über Nacht bei 37°C verdaut, und anschließend der Reaktionsansatz nach Abstoppen und Entfernung der SrtA auf einer C18-Säule über einen Acetonitrilgradienten aufgetrennt. Die Elution wurde mittels der Absorption bei einer Wellenlänge von 445 nm verfolgt, welche dem Absorptionsmaximum von Fluorescein im sauren HPLC-Laufmittel entspricht. Die gesammelten Peaks wurden mittels ESI-MS untersucht. Als Kontrolle diente ein Reaktionsansatz ohne SrtA_{ΔN59}. Die Kontrolle zeigt einen HPLC-Peak (3), dem die Molmasse des Substrates LPETGKG_{5FAM,Biotin} von 1285,5 Da (kalkulierte Molmasse 1286,6 Da) zugeordnet werden konnte. Der Verdau zeigte den Substratpeak (3) nicht mehr, dafür aber einen neuen Peak (1) dem die Molmasse des Produktes LPET-Gly_{5FAM} von 873,3 Da (kalkulierte Molmasse 875,5 Da) zugeordnet werden konnte. Zudem zeigt der Verdau einen zweiten Peak (2), dem die Molmasse des Hydrolyseprodukts LPET_{5FAM} von 817,3 Da (kalkulierte Molmasse 818,4 Da) zugeordnet werden konnte. Die Hydrolyse des Enzym-Acyl-Intermediates ist eine bekannte Nebenreaktion der SrtA (Ton-That et al., 1999). Von der Gesamtfläche der Peaks (1) und (2) fallen 90,2% auf den Transpeptidase-Produkt-Peak (1) und 9,8% auf den Nebenprodukt-Peak (2). Da der Transpeptidase-Produkt-Peak (1) und der Substrat-Peak (3) eine ähnliche Retentionszeit aufweisen, wurde der Verdau- und Kontrollansatz koinjiziert. Dies bestätigte, dass Peak (1) und (2) unterschiedliche Retentionszeiten aufweisen und ein Apparaturfehler wurde ausgeschlossen (Abb. 24).

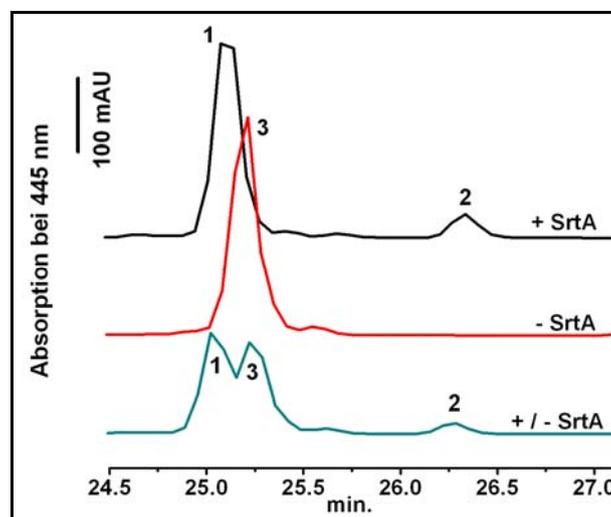


Abb. 24: HPLC-Auftrennungen eines LPETGKG_{5FAM,Biotin}-Verdaus durch SrtA_{ΔN59} (+SrtA), einer Kontrollreaktion ohne SrtA_{ΔN59} (-SrtA) sowie der Koinjektion von Verdau und Kontrollreaktion (+/- SrtA).

1 = LPET-Gly_{5FAM} (873,3 Da), 2 = LPET_{5FAM} (817,3 Da), 3 = LPETGKG_{5FAM,Biotin} (1285,5 Da)

Die biotinvermittelte Bindung des Substrat LPETGKG_{5FAM,Biotin} an Avidin kann mittels Fluoreszenzpolarisation gemessen werden. Avidin wurde zu 360 nM LPETGKG_{5FAM,Biotin} titriert. Die resultierenden Fluoreszenzpolarisationswerte zeigen eine Bindungskurve, wobei

1.3.5 Ergebnisse: IC₅₀-Werte

der steigende Anteil gebundener Substratmoleküle anhand steigender mP-Werte verfolgt werden kann. Durch eine Anpassung von Gleichung [2] (siehe Anhang) an die Datenpunkte ergibt sich ein K_d -Wert für LPETGKG_{5FAM,Biotin} an Avidin von 89 ± 7 nM. Aus der Bindungskurve geht hervor, dass ab einer Avidinmonomerkonzentration von ca. 3 μ M keine freien Substratmoleküle mehr detektierbar sind (Abb. 25).

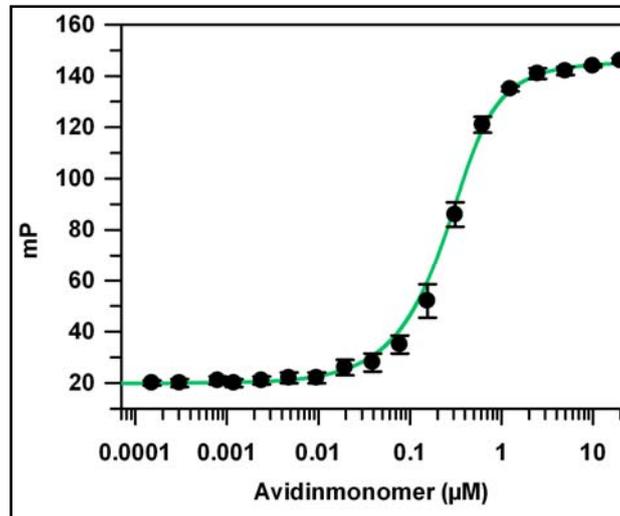


Abb. 25: Bindungsmessung für LPETGKG_{5FAM,Biotin} (360 nM) an Avidin. Die Datenpunkte mit Fehlerbalken repräsentieren die Mittelwerte dreier unabhängiger Titrations und deren Standardabweichungen. Die grüne Linie zeigt die Anpassung von Gleichung [2] (siehe Anhang) an die Datenpunkte, aus welcher ein K_d -Wert von 89 ± 7 nM hervorgeht.

Der Verdau des Substrates LPETGKG_{5FAM,Biotin} durch SrtA Δ N59 kann mittels Fluoreszenz-polarisation gemessen werden. Hierzu wurde SrtA Δ N59 zu 360 nM LPETGKG_{5FAM,Biotin} titriert, und die Reaktionen nach 17 h Inkubation bei 37°C durch die Zugabe von 2 μ M Avidin-Tetramer gestoppt. Anschließend wurde die Fluoreszenz-polarisation der Ansätze gemessen (Abb. 26). Der Komplex aus intaktem Substrat und Avidin verursacht hierbei hohe mP-Werte. Das Spaltungsprodukt LPET-Gly_{5FAM} kann nicht mehr über Biotin an Avidin binden und verursacht daher niedrige mP-Werte. Abb. 26 zeigt, dass die Zunahme der SrtA Δ N59-Konzentration ab einem Schwellenwert von ca. 60 nM zu einer signifikanten Abnahme der Fluoreszenz-polarisation führt, da entsprechend zunehmende Mengen an LPETGKG_{5FAM,Biotin} gespalten sind. Ab einer SrtA Δ N59-Konzentration von ca. 2 μ M wird die Fluoreszenz-polarisation nicht mehr signifikant durch eine Erhöhung der SrtA Δ N59-Konzentration verringert, da bereits nahezu alle LPETGKG_{5FAM,Biotin}-Moleküle umgesetzt wurden. Aus dieser Messung geht hervor, dass 0,5 μ M eine optimale SrtA Δ N59-Konzentration ist, um 360 nM LPETGKG_{5FAM,Biotin} über Nacht mit möglichst wenig SrtA Δ N59 möglichst vollständig umzusetzen.

1.3.5 Ergebnisse: IC₅₀-Werte

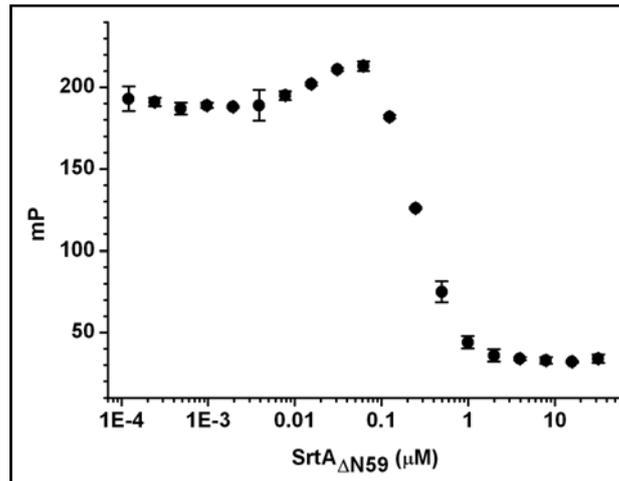


Abb. 26: Fluoreszenzpolarisationsmessung der Spaltung von 360 nM LPETGKG_{5FAM,Biotin} durch SrtA_{ΔN59} (37°C, 17h). Die Datenpunkte mit Fehlerbalken repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Titrations und ihre Standardabweichungen. Die Reaktionen wurden vor der Messung durch Zugabe von 2 μM tetramerischem Avidin gestoppt.

Es wurden die kinetischen Parameter für SrtA_{ΔN59} und LPETGKG_{5FAM,Biotin} ermittelt, um einen Anhaltspunkt zur Vergleichbarkeit des hier entwickelten mit den publizierten SrtA-IC₅₀-Assays zu erhalten. Dies erfolgte entsprechend der Charakterisierung des bereits erwähnten Substrates eines HCMV-Protease-Fluoreszenzpolarisationsassays (Levine et al., 1997). Es

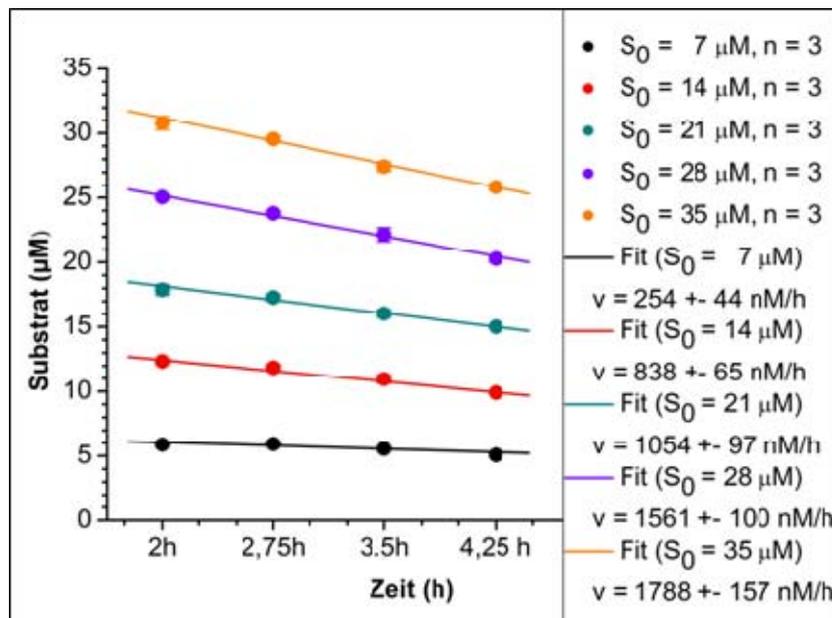


Abb. 27: Umsatz verschiedener Substratstartkonzentrationen durch 0,5 μM SrtA_{ΔN59} bei 37°C verfolgt über 4.25 Stunden und linearer Anpassung („Fit“) von Gleichung [1] (siehe Anhang) an die Datenpunkte.

wurden verschiedene Substratkonzentrationen SrtA_{ΔN59} inkubiert und die Reaktionsansätze jeweils zu vier Zeitpunkten durch Avidinzugabe gestoppt. Die anschließend gemessenen Fluoreszenzpolarisationswerte wurden mittels der Gleichungen [6] und [7] (Bolger und Checovich, 1995, Dandiker et al., 1981, siehe Anhang) und [8] - [10] (Levine et al., 1997,

1.3.5 Ergebnisse: IC₅₀-Werte

siehe Anhang) in Substratkonzentrationen umgerechnet. Die berechneten S_t-Werte wurden gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Durch die lineare Anpassung von Gleichung [1] (siehe Anhang) an die Datenpunkte wurde die SrtA_{ΔN59} Geschwindigkeit für jede S₀-Konzentration ermittelt (Abb. 27). Abb. 27 zeigt die Ermittlung der SrtA_{ΔN59}-Geschwindigkeiten für verschiedene S₀-Konzentrationen. Der Betrag der durch Anpassung von Gleichung [1] an jede S₀-Datengruppe jeweils erhaltenen Steigung b gibt die entsprechende SrtA_{ΔN59}-Geschwindigkeit v an in:

$$\text{umgesetztes Substrat } (\mu\text{M}) / (0,5 \mu\text{M SrtA}_{\Delta\text{N59}} * \text{h})$$

Da die Substratkonzentration für jede S₀-Datengruppe in linearem Verhältnis zur Inkubationszeit abnimmt, wird davon ausgegangen, dass es gelungen ist, die Anfangsgeschwindigkeiten zu messen. Dennoch wurden nur die Daten des Zeitpunktes t = 2 h herangezogen um die kinetischen Parameter für SrtA_{ΔN59} und LPETGKG_{5FAM,Biotin} zu bestimmen. Für die S₀ = 7 μM-Datengruppe erfüllt nur der Messpunkt t = 2 h das für K_m / k_{cat}-Bestimmungen übliche Kriterium, dass weniger als 20% des Substrates umgesetzt sein sollten. Trägt man die Geschwindigkeiten v in s⁻¹ nach Lineweaver-Burk auf, so erhält man K_{m,app.} und k_{cat,app.}. Ein Lineweaver-Burk Diagramm beruht auf der reziproken Darstellung (Gleichung [12]) der Michaelis-Menten Gleichung [11] (Gleichungen siehe Anhang) und ermöglicht eine linearisierte Darstellung der Messergebnisse. Hierbei entspricht der Schnittpunkt mit der x-Achse -1 / K_m, der Schnittpunkt mit der y-Achse 1 / V_{max} und die Steigung K_m / V_{max}. Die Schnittpunkte werden mittels linearer Anpassung von Gleichung [1] an die Datenpunkte ermittelt (Abb. 28). Es ergibt sich für V_{max} (s⁻¹) = k_{cat,app.} ein Wert von 3,7 ± 2,0 * 10⁻³ * s⁻¹, für K_{m,app.} ein Wert von 8,2 ± 5,1 * 10⁻⁵ M und für die katalytische Effizienz K_m / k_{cat} ein Wert von 2,2 * 10⁻² M * s.

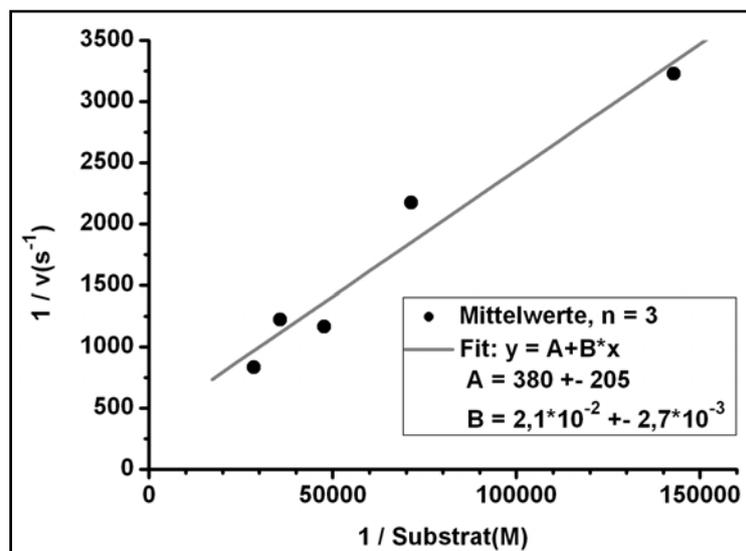


Abb. 28: Lineweaver-Burk Diagramm für den Umsatz von 7 μM, 14 μM, 21 μM, 28 μM und 35 μM LPETGKG_{5FAM,Biotin} durch 0,5 μM SrtA_{ΔN59} nach 2 h Inkubation bei 37°C und linearer Anpassung („Fit“) von Gleichung [1] (siehe Anhang) an die Datenpunkte.

1.3.5 Ergebnisse: IC₅₀-Werte

Da die SrtA ein zweites Substrat, hier das im Reaktionspuffer vorhandene Glycinamid, nutzt, sind die unter konstanten Glycinamidkonzentrationen ermittelten k_{cat} und K_m -Werte für das erste Substrat LPETGKG_{5FAM,Biotin} keine echten Konstanten. Sie würden sich mit einer Konzentrationsveränderung von Glycinamid ändern, weshalb sie als apparente Werte, $k_{cat,app.}$ und $K_{m,app.}$ bezeichnet werden müssen. Durch die Verwendung einer Konzentration des zweiten Substrates, die deutlich über dessen K_m -Wert liegt, können die $k_{cat,app.}$ - und $K_{m,app.}$ -Werte für verschiedene erste Substrate eines Enzyms jedoch miteinander verglichen werden. Die $K_{m,app.}$ -Werte der häufig genutzten zweiten SrtA-Substrate Gly-NH₂ und Gly₃NH₂ betragen ca. 25 μ M (Huang et al., 2003).

2.3.5.2. IC₅₀-Werte der Peptidinhibitoren im entwickelten SrtA-Aktivitätsassay

Die IC₅₀-Werte der zu untersuchenden Peptidinhibitoren an SrtA $_{\Delta N59}$ konnten als 0,5 μ M - 4 μ M unter den folgend beschriebenen Assay-Bedingungen definiert werden. Die Peptide wurden zu 360 nM LPETGKG_{5FAM,Biotin} titriert und die Reaktion durch Zugabe von je 0,5 μ M SrtA $_{\Delta N59}$ gestartet. Nach einer 17 stündigen Inkubation bei 37°C wurden die Reaktionen durch Zugabe vom 2 μ M Avidin-Tetramer gestoppt und die Fluoreszenzpolarisation gemessen. Ohne einen Inhibitoreinfluss verdaut SrtA $_{\Delta N59}$ unter diesen Bedingungen ca. 80% des Substrats und die resultierenden mP-Werte sind niedrig (Abb. 26, Seite 46). Das Edukt der SrtA-Reaktion LPETG_{5FAM} kann keine Bindung mit Avidin eingehen und verursacht als freies Molekül niedrige Fluoreszenzpolarisationswerte. Das intakte Substrat LPETGKG_{5FAM,Biotin} kann über Biotin an Avidin binden und verursacht als Komplex hohe Fluoreszenzpolarisationswerte. Ist der hinzutitrierte Inhibitor wirksam gegen SrtA $_{\Delta N59}$, so verursachen zunehmende Inhibitorkonzentrationen ansteigende mP-Werte. Der maximale mP-Wert wird dann erreicht, wenn SrtA $_{\Delta N59}$ vollständig inhibiert ist. Bei halblogarithmischer Auftragung ergibt sich für einen SrtA-Inhibitor ein sigmoidaler Kurvenverlauf. Das P_{min}-Plateau entspricht dabei 0% Inhibition und das P_{max}-Plateau 100% Inhibition. Der Wendepunkt (EC₅₀-Wert) der Inhibitionskurve stellt den IC₅₀-Wert dar und kann durch Anpassung von Gleichung [3] (siehe Anhang) an die Datenpunkte ermittelt werden. Die Eignung des entwickelten SrtA-Aktivitätsassays für die Charakterisierung von SrtA-Inhibitoren wurde mit 4-(hydroxyquecksilber)Benzoessäure (pHMB), einem kommerziell erhältlichen SrtA-Inhibitor (Ton-That et al., 1999), getestet. pHMB modifiziert reversibel Thiolgruppen ($K_d = 10^{-20}$) nach dem Schema (Wong und David, 1991):



Durch die pHMB-bedingte Modifikation des Cystein¹⁸⁴ des aktiven Zentrums wird SrtA inaktiviert.

1.3.5 Ergebnisse: IC₅₀-Werte

Für pHMB und die untersuchten unmarkierten Peptidinhibitoren wurden sigmoidale Kurvenverläufe erhalten (Abb. 29, Seite 50). Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den zu untersuchenden Peptidsequenzen um wirkungsvolle SrtA-Inhibitoren handelt. Es wurde ein robuster Assay entwickelt. Der statistische Fehler ist jeweils gering gegenüber der Differenz zwischen P_{max} und P_{min}. Die Sensitivität des Assays ist ausreichend, da die P_{max}-Plateaus für die Peptidsequenzen jeweils erreicht werden konnten. Die IC₅₀-Werte der Peptidinhibitoren liegen zwischen 0,5 µM und 4 µM (Tabelle 7). Unter Berücksichtigung möglicher Fehler bei der Peptidkonzentrationsbestimmung, (siehe 2.3.3 und 2.3.4), welche sich proportional auf den jeweiligen IC₅₀-Wert auswirkten, kann geschlossen werden, dass die ermittelten IC₅₀-Werte keine signifikanten Unterschiede aufweisen und sich im niedrigen einstelligen mikromolaren Bereich befinden. Es wurden nur die unmarkierten Peptide bzw. MBP-Fusionsproteine vermessen, da eine Titration fluoresceinmarkierter Peptide die auf der Fluoresceinmarkierung des Substrates beruhende SrtA-Aktivitätsmessung verfälscht hätte. Auch das GFP-P1-Fusionsprotein konnte nicht vermessen werden, da GFP und Fluorescein ähnliche Anregungs- und Emissionswellenlängen aufweisen.

Tabelle 7: Ermittelte IC₅₀-Werte aus Abb. 29

unmarkiertes Peptid / Fusionsprotein	IC ₅₀ -Wert (µM)
P1 _{unmarkiert} (linear)	3,72 +- 0,24
P1 _{unmarkiert} (zyklisch)	2,62 +- 0,11
P2 _{unmarkiert}	1,83 +- 0,07
P3 _{unmarkiert}	2,23 +- 0,08
MBP-P1 _{nativ}	0,409 +- 0,012
MBP-P1 _{zyklisch}	4,54 +- 0,16
MBP-P1 _{Kontrolle}	0,714 +- 0,026
pHMB (Positivkontrolle)*	840 +- 25

*der IC₅₀-Wert aus der Literatur für pHMB an SrtA beträgt 147 µM, aufgrund anderer Assay-Bedingungen ist er jedoch nicht direkt mit dem hier ermittelten IC₅₀-Wert zu vergleichen (Kim et al., 2003, siehe Tabelle 10, Seite 77).

Abb. 29 (Seite 50): ►

Inhibitionskurven der unmarkierten Peptide / MBP-Fusionsproteine an SrtA_{ΔN59}. Es wurden zu 360 nM LPETGKG_{5FAM,Biotin} und 0,5 µM SrtA_{ΔN59} pHMB (A), P1_{unmarkiert} (linear) (B), P1_{unmarkiert} (zyklisch) (C), P2_{unmarkiert} (D), P3_{unmarkiert} (E), MBP-P1_{nativ} (F), MBP-P1_{zyklisch} (G) oder MBP-P1_{Kontrolle} (H) titriert. Die Ansätze wurden 17 h bei 37°C inkubiert, danach mit 2 µM Avidin-Tetramer gestoppt und anschließend die Fluoreszenzpolarisation gemessen. Die Datenpunkte mit Fehlerbalken entsprechen den Mittelwerten aus 4 (A) bzw. 3 (B-H) unabhängigen Titrationen und ihren Standardabweichungen. Die jeweiligen IC₅₀-Werte (Tabelle 7, \triangle EC₅₀-Werte) wurden mittels Anpassung von Gleichung [3] (siehe Anhang) an die Datenpunkte (orange durchgezogene Linien) ermittelt.

1.3.5 Ergebnisse: IC₅₀-Werte

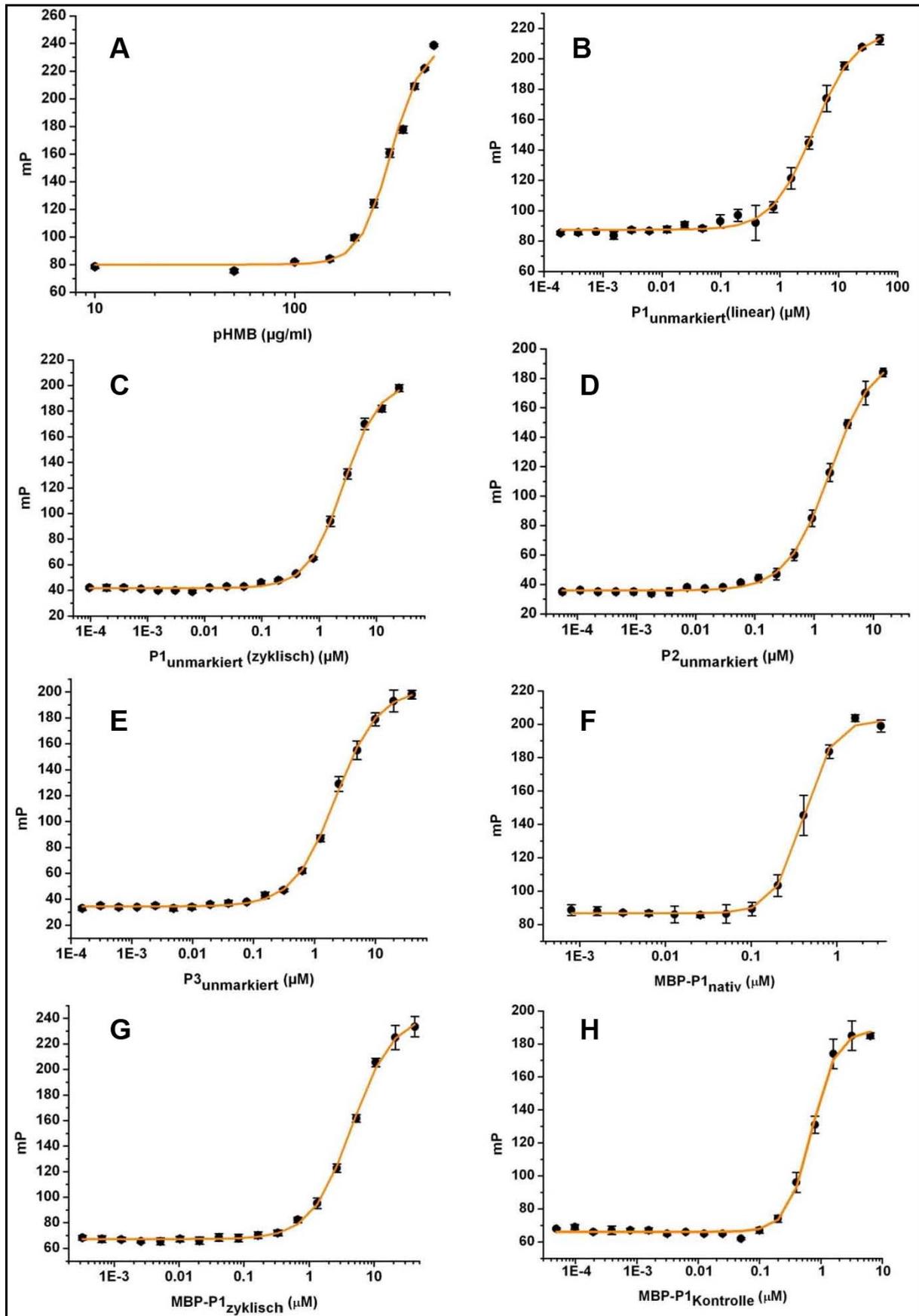


Abb. 29:

◀ Abbildungstext: siehe Seite 49

2.3.6 Inhibitionsmechanismus der Peptidinhibitoren SrtA_{ΔN59}

Es konnte exemplarisch für die fluoresceinmarkierten Peptidinhibitoren gezeigt werden, dass sie SrtA_{ΔN59} reversibel inhibieren. Ein kovalenter Inhibitionsmechanismus oder eine Modifikation der Peptidinhibitoren durch SrtA_{ΔN59}, konnte ausgeschlossen werden. Um zu dieser Erkenntnis zu gelangen, wurden HPLC-Untersuchungen in Kombination mit Massenspektrometrie an Inkubationsansätzen der Peptidinhibitoren mit SrtA_{ΔN59} vorgenommen. Da unter 2.3.5.1 mit obiger Methodenkombination erfolgreich die Umsetzung des eingesetzten SrtA-Substrates durch SrtA_{ΔN59} in die vorhergesagten Produkte gezeigt werden konnte, wurden hier, soweit möglich, die gleichen experimentellen Bedingungen wie unter 2.3.5.1 gewählt. Es wurden ca. 50 µg des jeweiligen Peptidinhibitors in den Inkubationsansätzen eingesetzt, um anschließend eine ausreichende Detektion der Peptidelutionen von der hier genutzten analytischen C18-Säule zu erreichen. Da die Peptidinhibitoren in DMSO gelöst sind, wurde 1 ml als Reaktionsvolumen gewählt, um die DMSO-Konzentrationen in den Reaktionsansätzen unter 5% zu halten. Es wurde davon ausgegangen, dass DMSO-Konzentrationen über 5% (v/v) die SrtA-Aktivität beeinträchtigen. Für den Peptidinhibitor P1_{5FAM} (linear) musste der Reaktionsansatz auf ein Volumen von 10 ml eingestellt werden, da die Peptid-Konzentration der entsprechenden DMSO-Stocklösung vergleichsweise gering war. Entsprechend der Erkenntnisse aus 2.3.5.1 wurde ein 10 facher molarer Überschuss an SrtA_{ΔN59} eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht. Dies sollte gewährleisten, dass nahezu alle Peptidinhibitormoleküle von SrtA_{ΔN59} gebunden und ggf. modifiziert werden können. Als Kontrollen wurden entsprechende Ansätze ohne SrtA_{ΔN59} angefertigt, um zu klären, ob eventuell auftretende Peptidmodifikationen durch SrtA_{ΔN59} oder nicht-enzymatisch durch die Inkubationsbedingungen hervorgerufen werden. Um bei der späteren Analytik eine genügend sensitive und von Verunreinigungen der HPLC-Säule unabhängige Detektion der Peptidelution zu gewährleisten, wurden hier nur die fluoresceinmarkierten Peptide untersucht und die Peptidelution bei einer Wellenlänge von 445 nm verfolgt, welche dem Absorptionsmaximum von 5FAM im verwendeten sauren HPLC-Laufmittel entspricht. Es wird davon ausgegangen, dass die hier erzielten Resultate auch für die unmarkierten Peptidinhibitoren repräsentativ sind. Zunächst wurde, entsprechend 2.3.5.1, versucht, nach der Beendigung der Inkubation der Peptide und SrtA_{ΔN59} durch Zugabe von 11 mM EDTA, die Peptide durch einen Konzentrator von SrtA_{ΔN59} zu trennen. Die in jedem Reaktionsansatz eingesetzten ca. 3 mg SrtA_{ΔN59} wurden nicht auf die C18-Säule aufgetragen werden, da sie das Säulenmaterial überladen und daher dessen Trennungseigenschaften beeinträchtigt hätten. Die Trennung von SrtA_{ΔN59} und den Peptidinhibitoren gelang nicht durch den Einsatz

eines Konzentrators. Die gelbe Färbung der fluoresceinmarkierten Peptide verblieb überwiegend im Konzentrator statt im Durchfluss zu erscheinen. Dies wurde nicht für einen Hinweis auf einen kovalenten Inhibitionsmechanismus gehalten. Es wurde vermutet, dass die ca. 3 kDa großen Peptidinhibitoren im Gegensatz zu dem ca. 0,9 kDa großen SrtA-Edukt LPET-Gly_{5FAM} aus 2.3.5.1 nur schwerlich die Konzentratormembran mit einem cut-off von 10 kDa passieren können. Aufgrund des Molekulargewichts der SrtA_{ΔN59} von ca. 19 kDa konnte kein Konzentrator eines größeren cut-offs eingesetzt werden. Daher wurden die Reaktionsansätze nach Ablauf der Inkubationszeit mit Ni-NTA-Agarose versetzt. Da SrtA_{ΔN59} einen His₆-Tag besitzt, wird der SrtA_{ΔN59}-Peptidinhibitor-Komplex von Ni-NTA-Agarose gebunden. Die Ni-NTA-Agarose wurde anschließend mit Reaktionspuffer gewaschen, wobei die gelbe Fluoresceinfärbung auf der Ni-NTA-Agarose verblieb. Um die Peptide von der an den Ni-NTA-Agarose gebundenen SrtA_{ΔN59} zu eluieren und damit von ihr zu trennen, wurde 6 M Guanidinium-Puffer (pH 8) eingesetzt. Unter diesen Bedingungen wird SrtA_{ΔN59} inklusive ihrer Bindungstasche denaturiert und der vormals gebundene Peptidinhibitor freigesetzt und von der Ni-NTA-Agarose eluiert. Die Bindung des His₆-Tags an die Ni-NTA-Agarose wird von 6 M Guanidinium nicht beeinflusst, so dass SrtA_{ΔN59} nicht eluiert, und folglich von den Peptiden getrennt wird. Die gesamte gelbe Färbung konnte von den eingesetzten 250 µl Ni-NTA-Agarose in weniger als 1 ml Elutionspuffervolumen eluiert werden. Dies zeigt, dass die Bindung zwischen SrtA_{ΔN59} und den in hier untersuchten Peptidinhibitoren nicht kovalent ist. Die Peptidinhibitor-eluate wurden ohne weitere Behandlung und unverzüglich auf die C18-Säule aufgetragen. Die Kontrollansätze ohne SrtA_{ΔN59} wurden direkt nach Ablauf der Inkubationszeit ohne jegliche Behandlung auf die C18-Säule aufgetragen. Mit der Ausnahme eines Kontrollansatzes wurden alle Proben mittels eines 1 ml-Loops auf die C18-Säule aufgetragen.

Abb. 30 zeigt die HPLC-Auftrennung des Inkubationsansatzes von P1_{5FAM} (linear) und SrtA_{ΔN59} („+SrtA, 1 ml-Loop“). Die ESI-MS-ermittelte Molmasse des Peaks (2) entspricht mit 3174,6 Da der von P1_{5FAM} (linear) (kalkulierte Molmasse 3177,1 Da). Der wesentlich kleinere Peak (1) birgt die Molmasse 3422,4 Da, die um 247,8 Da über der von P1_{5FAM} (linear) (Peak (2)) liegt. Der Inkubationsansatz von P1_{5FAM} (linear) ohne SrtA_{ΔN59} konnte im Gegensatz zu dem mit SrtA_{ΔN59} nicht auf 1 ml eingengt werden, da die Einengung über die Ni-NTA-Agarose die Bindung des Peptidinhibitors an die mit einem His₆-Tag versehene SrtA_{ΔN59} voraussetzt. Daher wurde der Inkubationsansatz von P1_{5FAM} (linear) ohne SrtA_{ΔN59} als einzige Probe mittels eines 10 ml-Loops auf die C18-Säule aufgetragen („-SrtA, 10 ml-Loop“), was zu einer Verschiebung der Retentionszeiten führte. Die Peaks des Kontrollansatzes („-SrtA, 10 ml-Loop“) wurden anhand der ermittelten Molmassen als

Peak (1) (3423.0 Da) und Peak (2) (3174,2 Da) des Inkubationsansatzes von P1_{5FAM} (linear) und SrtA Δ N59 („+SrtA, 1 ml-Loop“) identifiziert. Als weitere Kontrolle wurde eine äquivalente Menge P1_{5FAM} (linear) mit Reaktionspuffer auf ein Volumen von 1 ml eingestellt und unverzüglich, ohne 17 h Inkubation bei 37°C, mittels eines 1 ml-Loops auf die C18-Säule aufgetragen („-SrtA, 1 ml-Loop“). Hier wurde nur ein Peak detektiert, der anhand der gleichen Retentionszeit und Molmasse (3174,6 Da) als Peak (2) identifiziert wurde. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass eine 17 stündige Inkubation bei 37°C mit SrtA Δ N59 zu keiner Modifikation von P1_{5FAM} (linear) führt. Die Inkubationsbedingungen führen allerdings unabhängig von SrtA Δ N59 zu einer Modifikation (evt. TCEP-Anlagerung, siehe Seite 55, unten) eines kleinen Anteils von P1_{5FAM} (linear), die eine Molmassenzunahme von 247,8 Da zur Folge hat.

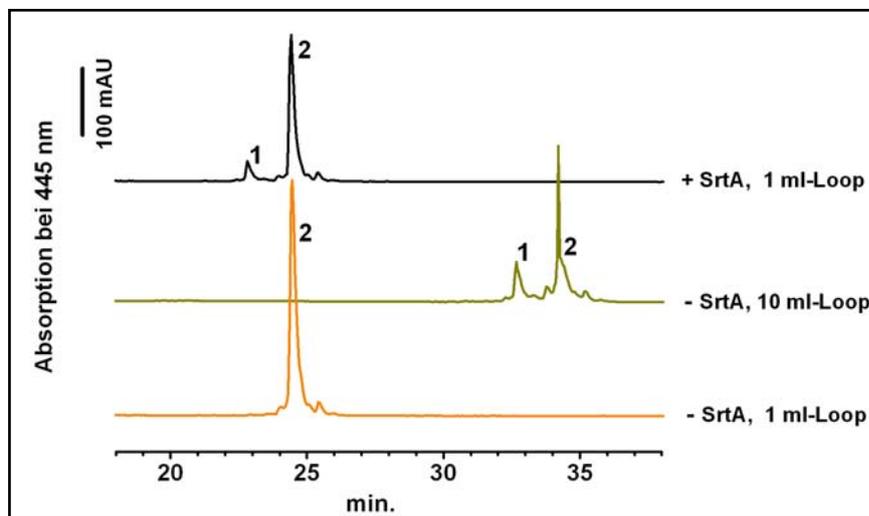


Abb 30: HPLC-Auftrennungen des Inkubationsansatzes von P1_{5FAM} (linear) und SrtA Δ N59 („+SrtA, 1 ml-loop“), des Kontrollansatzes ohne SrtA Δ N59 („-SrtA, 10 ml-loop“) und des nicht inkubierten P1_{5FAM} (linear) („-SrtA, 1 ml-loop“). 1 = P1_{5FAM} (linear)-Addukt (+247,8 Da), 2 = P1_{5FAM} (linear) (3174,6 Da).

Abb. 31 zeigt die HPLC-Auftrennung des Inkubationsansatzes von P1_{5FAM} (zyklisch) und SrtA Δ N59 („+SrtA“). Die per ESI-MS ermittelte Molmasse des Peaks (2) entspricht mit 3285,2 Da P1_{5FAM} (zyklisch) (kalkulierte Molmasse 3286,1 Da). Der wesentlich kleinere Peak (1) birgt die Masse 3533,1 Da, die um 247,0 Da über der von P1_{5FAM} (zyklisch) (Peak (2)) liegt. Der Inkubationsansatz von P1_{5FAM} (zyklisch) ohne SrtA Δ N59 („-SrtA“) zeigt zwei Peaks, die anhand der gleichen Retentionszeiten und Molmassen (3532,9 Da und 3285,2 Da) als Peak (1) und (2) des Inkubationsansatzes von P1_{5FAM} (zyklisch) mit SrtA Δ N59 („+SrtA“) identifiziert wurden. Eine 17 stündige Inkubation bei 37°C mit SrtA Δ N59 führt also zu keiner Modifikation von P1_{5FAM} (zyklisch). Unabhängig von SrtA Δ N59 zeigen die Proben einen kleinen Anteil einer Masse, die der Molmasse von P1_{5FAM} (zyklisch) + 247 Da entspricht (evt. TCEP-Anlagerung, siehe Seite 55, unten).

2.3.6 Inhibitionsmechanismus der Peptidinhibitoren an SrtA $_{\Delta N59}$

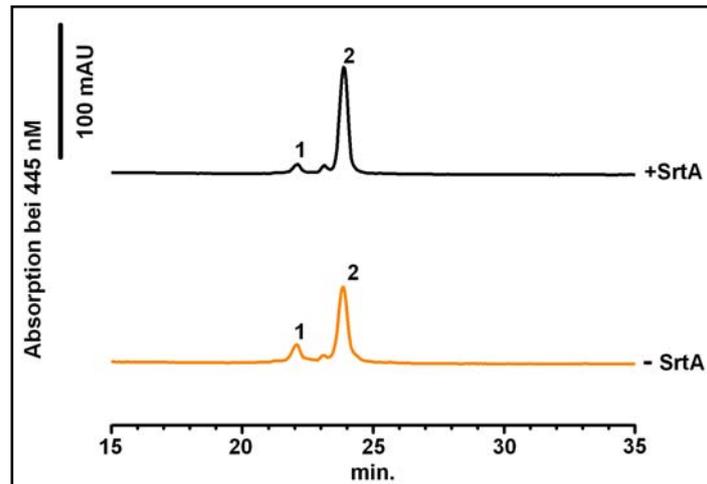


Abb. 31: HPLC-Auftrennungen des Inkubationsansatzes von P1_{5FAM} (zyklisch) und SrtA $_{\Delta N59}$ („+SrtA“) und des Kontrollansatzes ohne SrtA $_{\Delta N59}$ („-SrtA“). 1 = P1_{5FAM} (zyklisch)-Addukt (+247 Da), 2 = P1_{5FAM} (zyklisch) (3285,2 Da).

Abb. 32 zeigt die HPLC-Auftrennung des Inkubationsansatzes von P2_{5FAM} und SrtA $_{\Delta N59}$ („+SrtA“). Die per ESI-MS ermittelte Molmasse des detektierten Peaks (1) von 3137,2 Da entspricht P2_{5FAM} (kalkuliertes Molgewicht 3139,1 Da). Der Inkubationsansatz von P2_{5FAM} ohne SrtA $_{\Delta N59}$ („-SrtA“) zeigt einen Peak der anhand der gleichen Retentionszeit und Molmasse (3137,4 Da) als Peak (1) des Inkubationsansatzes von P2_{5FAM} und SrtA $_{\Delta N59}$ („+SrtA“) identifiziert wurde. Eine 17 stündige Inkubation bei 37°C führt also weder mit noch ohne SrtA $_{\Delta N59}$ zu einer Modifikation von P2_{5FAM}.

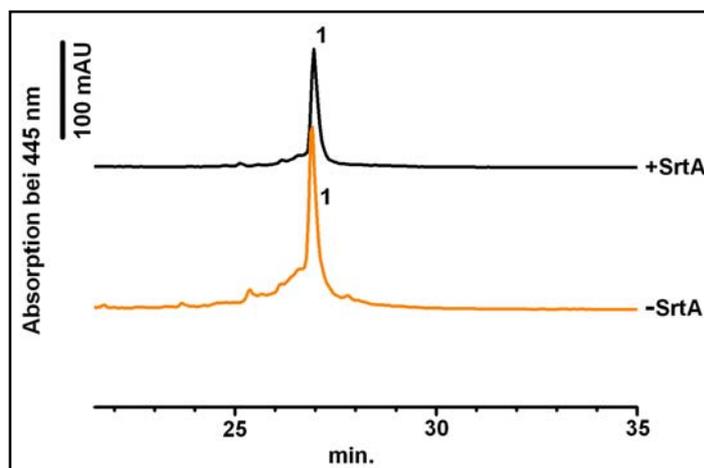


Abb. 32: HPLC-Auftrennungen des Inkubationsansatzes von P2_{5FAM} und SrtA $_{\Delta N59}$ („+SrtA“) und des Kontrollansatzes ohne SrtA $_{\Delta N59}$ („-SrtA“). 1 = P2_{5FAM} (3137,2 Da).

Abb. 33 zeigt die HPLC-Auftrennung des Inkubationsansatzes von P3_{5FAM} und SrtA $_{\Delta N59}$ („+SrtA“): Die per ESI-MS ermittelte Molmasse des Peaks (2) von 3212,4 Da entspricht P3_{5FAM} (kalkulierte Molmasse 3214,2 Da). Der wesentlich kleinere Peak (1) birgt die Masse

2.3.6 Inhibitionsmechanismus der Peptidinhibitoren an SrtA Δ N59

3460,0 Da, die um 247,6 Da über der von P3_{5FAM} (Peak (2)) liegt. Der Inkubationsansatz von P3_{5FAM} ohne SrtA Δ N59 („-SrtA“) zeigt zwei Peaks, die anhand der gleichen Retentionszeiten und Molmassen (3460,2 Da und 3212,4 Da) als Peaks (1) und (2) des Inkubationsansatzes von P3_{5FAM} mit SrtA Δ N59 („+SrtA“) identifiziert wurden. Eine 17 stündige Inkubation bei 37°C mit SrtA Δ N59 führt also zu keiner Modifikation von P3_{5FAM}. Unabhängig von SrtA Δ N59 zeigen die Proben einen kleinen Anteil einer Masse, die der Molmasse von P3_{5FAM} + 247,6 Da entspricht (evt. TCEP-Anlagerung, siehe unten).

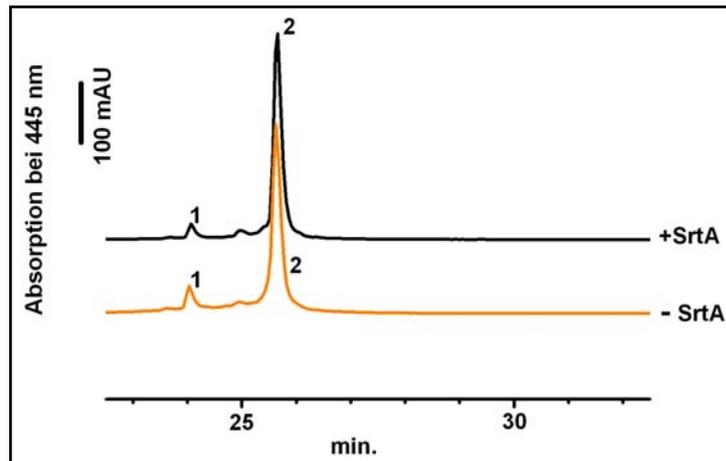


Abb. 33: HPLC-Auftrennungen des Inkubationsansatzes von P3_{5FAM} und SrtA Δ N59 („+SrtA“) und des Kontrollansatzes ohne SrtA Δ N59 („-SrtA). 1 = P3_{5FAM}-Addukt (+247,6 Da), 2 = P1_{5FAM} (3212,4 Da).

Die Peptide P1_{5FAM}, P2_{5FAM} und P3_{5FAM} werden also nicht von SrtA Δ N59 modifiziert. Dies bedeutet, dass es sich bei diesen Peptiden um reversible SrtA-Inhibitoren handelt. Es wird davon ausgegangen, dass der reversible Inhibitionsmechanismus auch auf die unmarkierten Peptidinhibitoren zutrifft. Die Peptide P1_{5FAM} (linear), P1_{5FAM} (zyklisch) und P2_{5FAM} erfahren zu einem kleinen Anteil eine Modifikation (ca. +247 Da) durch die Inkubationsbedingungen. Bei dieser Modifikation könnte es sich um über ionische Wechselwirkungen angelagertes TCEP (Molekulargewicht protoniert 250 Da) aus dem Reaktionspuffer handeln. Die Peptide, welche diese Modifikation zeigen, besitzen zwei Lysine wohingegen das nichtmodifizierte Peptid P3_{5FAM} kein Lysin besitzt. Zwei der drei Carboxygruppen des TCEP könnten in deprotonierter Form ionische Wechselwirkungen mit den bei pH 7,4 protonierten ϵ -Aminogruppen der beiden Lysinseitenketten von P1_{5FAM} (linear), P1_{5FAM} (zyklisch) und P2_{5FAM} eingehen.

2.3.7 K_{off} -Wert des Komplexes $\text{SrtA}_{\Delta\text{N59}}:\text{P1}_{5\text{FAM}}$ (linear)

Bei $\text{P1}_{5\text{FAM}}$ (linear) handelt es sich um einen langsam reversiblen SrtA -Inhibitor. Es wurde exemplarisch für den Komplex $\text{SrtA}_{\Delta\text{N59}}:\text{P1}_{5\text{FAM}}$ (linear) ein K_{off} -Wert von $0,7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und eine Halbwertszeit von 990 s ermittelt. Die Reversibilität wurde unter 2.3.6 bewiesen. Zur K_{off} -Wert-Bestimmung wurde die Verdrängung von $\text{P1}_{5\text{FAM}}$ (linear) durch einen 600-fachen Überschuss an $\text{P1}_{\text{unmarkiert}}$ (linear) von $\text{SrtA}_{\Delta\text{N59}}$ mittels Messung der Fluoreszenzpolarisation über die Zeit verfolgt (Abb. 34). Es wurden für jeden Zeitpunkt eine P_{max} -Kontrolle (ohne $\text{SrtA}_{\Delta\text{N59}}$) und eine P_{min} -Kontrolle (ohne $\text{P1}_{\text{unmarkiert}}$ (linear)) gemessen, um die durch die Messbedingungen hervorgerufenen mP-Wert-Veränderungen berücksichtigen zu können.

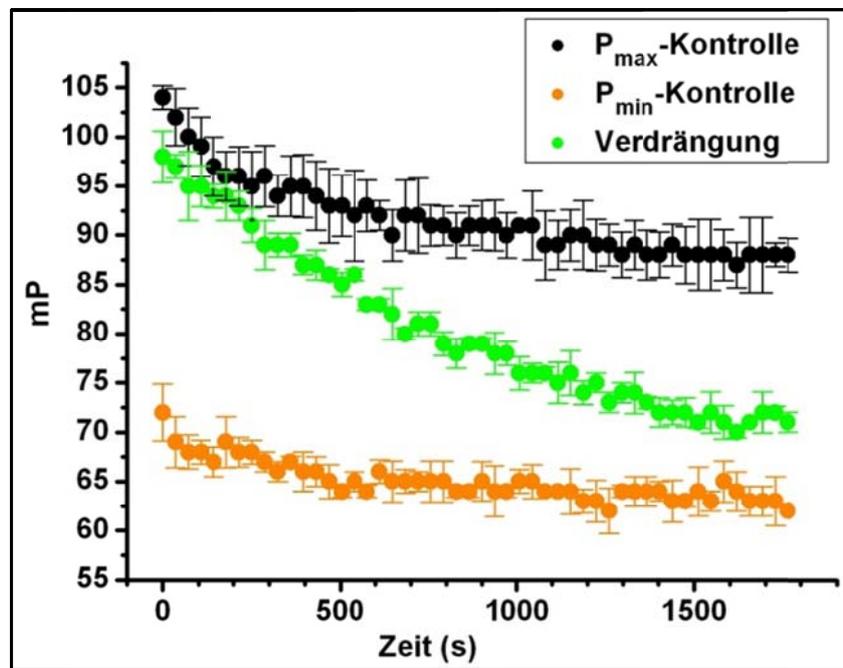


Abb. 34: Zeitabhängige Verdrängung von $\text{P1}_{5\text{FAM}}$ (linear) aus der Bindung an $\text{SrtA}_{\Delta\text{N59}}$ durch einen 600-fachen Überschuss an $\text{P1}_{\text{unmarkiert}}$ (linear) (grün). Als Kontrollen wurde für P_{min} ein Ansatz mit $\text{P1}_{5\text{FAM}}$ (linear) und einem 600-fachen Überschuss an $\text{P1}_{\text{unmarkiert}}$ ohne $\text{SrtA}_{\Delta\text{N59}}$ verwendet (orange), und für P_{max} wurden $\text{P1}_{5\text{FAM}}$ (linear) und $\text{SrtA}_{\Delta\text{N59}}$ mit $\text{P1}_{\text{unmarkiert}}$ (linear)-Puffer versetzt (schwarz). Die Datenpunkte mit Fehlerbalken repräsentieren jeweils die Mittelwerte aus drei unabhängigen Reaktionsansätzen und deren Standardabweichungen.

Aufgrund der gewählten Konzentrationsverhältnisse wird vorausgesetzt, dass die beobachtete Verdrängung dem Zerfall des Komplexes EI zu $\text{E} + \text{I}$, also einer Reaktion erster Ordnung, entspricht. Das Verhältnis $(\text{EI})_t/(\text{EI})_0$ für jeden Zeitpunkt wurde mit Hilfe der Kontrollen für P_{max} und P_{min} berechnet. Der P_{max} -Wert entspricht 0 % Komplexzerfall ($(\text{EI})_0$) und der P_{min} -Wert 100% Komplexzerfall ($(\text{EI})_\infty$). Die Auftragung von $\ln((\text{EI})_t/(\text{EI})_0)$ gegen die Zeit zeigte erwartungsgemäß einen linearen Verlauf (Abb. 35).

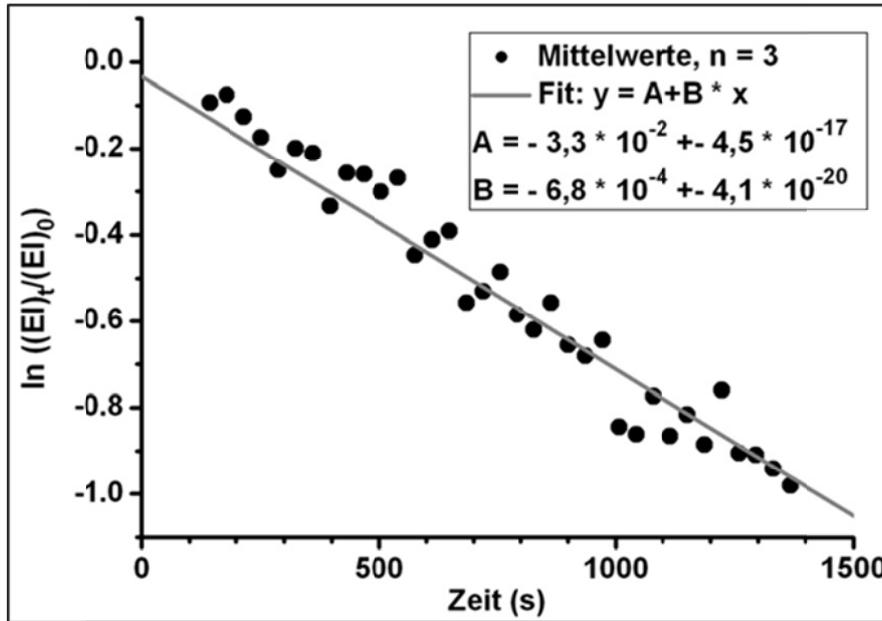


Abb 35: Auftragung von $\ln((\text{SrtA}_{\Delta\text{N59}}:\text{P1}_{5\text{FAM}}(\text{linear}))_t)/(\text{SrtA}_{\Delta\text{N59}}:\text{P1}_{5\text{FAM}}(\text{linear}))_0$ gegen die Zeit und lineare Anpassung („Fit“) von Gleichung [1] (siehe Anhang) an die Datenpunkte. Das Verhältnis $(\text{SrtA}_{\Delta\text{N59}}:\text{P1}_{5\text{FAM}}(\text{linear}))_t)/(\text{SrtA}_{\Delta\text{N59}}:\text{P1}_{5\text{FAM}}(\text{linear}))_0$ zum Zeitpunkt t wurde berechnet aus den jeweiligen mP-Werten für „ P_{max} “, „ P_{min} “, und „Verdrängung“ zum Zeitpunkt t , welche in Abb. 34 dargestellt sind.

Der Kehrwert von K_{off} ergibt sich aus dem Zeitpunkt, für den $\ln((\text{EI})_t/(\text{EI})_0)$ den Wert -1 annimmt. Die Halbwertszeit ergibt sich aus der Multiplikation des Kehrwertes von K_{off} mit $0,6931$ (Copeland, 2005). Anhand der linearen Anpassung von Gleichung [1] (siehe Anhang) der Datenpunkte (Abb. 35) ergibt sich ein K_{off} -Wert von $0,7 * 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und eine Halbwertszeit von 990 s für die Dissoziation des Komplexes $\text{SrtA}_{\Delta\text{N59}}:\text{P1}_{5\text{FAM}}(\text{linear})$. Aus dem K_{off} -Wert und dem bekannten K_{d} -Werte ergibt sich für die Bildung des Komplexes $\text{SrtA}_{\Delta\text{N59}}:\text{P1}_{5\text{FAM}}(\text{linear})$ ein K_{on} -Wert von $70000 \text{ s}^{-1} * \text{M}^{-1}$. Die ersten vier Messwerte aus Abb. 34 wurden nicht in die K_{off} -Bestimmung einbezogen, da die entsprechenden P_{max} -Kontrollen keine konstanten mP-Werte zeigten. Ebenso wurden die letzten 11 Messpunkte aus Abb. 34 nicht in die K_{off} -Bestimmung einbezogen, da die Werte zunehmend Schwankungen aufwiesen. Die leichte Abnahme der mP-Werte während der bezüglich des K_{off} -Wertes ausgewerteten mittleren 35 Messpunkte (siehe Abb. 34) wurde als unbedeutend erachtet. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit ist es wahrscheinlich, dass alle in der vorliegenden Arbeit untersuchten Peptidinhibitoren einen langsam reversiblen Inhibitionsmechanismus an SrtA aufweisen.

2.3.8 *In vivo* Bindung der Peptidinhibitoren an SrtA Zellen

P1_{5FAM} (zyklisch) und, in wesentlich höherem Maß, P2_{5FAM} binden im Vergleich zu Kontrollpeptiden signifikant an *S. aureus*-Zellen. Für P2_{5FAM} wurde exemplarisch gezeigt, dass es sich um eine sequenzspezifische *in vivo* Bindung handelt. Das Fusionsprotein P1-GFP bindet zwar *in vitro* sequenzspezifisch an SrtA_{ΔN59}, jedoch konnte seine *in vivo* Bindung an *S. aureus*-Zellen nicht quantifiziert werden. Anscheinend ist es mit 29 kDa zu groß, um effektiv die Zellwand zu durchqueren um an die darunterliegende membranverankerte SrtA zu binden.

Für *in vivo* Bindungstests an *S. aureus* Zellen wurden die GFP-Fusionsproteine P1-GFP, P1_{scrambled}-GFP und LPETG-GFP hergestellt (siehe 2.3.1). Mittels der GFP-Fluoreszenz sollte die Affinität der fusionierten Peptidsequenzen an *S. aureus*-Zellen gemessen werden. LPETG entspricht der Substratsequenz der SrtA und P1_{scrambled} besitzt die gleichen Aminosäuren wie P1, jedoch in veränderter Abfolge. LPETG-GFP diene als GFP-Kontrollfusionsprotein, um eine unspezifische, GFP-vermittelte *S. aureus*-Bindung auszuschließen. Es wird erwartet, dass SrtA ihrem Reaktionsmechanismus entsprechend LPET am Peptidoglykangerüst verankert, G-GFP freisetzt und keine Fluoreszenz an den Zellen verbleibt. P1_{scrambled}-GFP diene zur Überprüfung der Sequenzspezifität der P1-Bindung an *S. aureus*. Sofern die *in vivo* Bindung von P1 an die *S. aureus* Zellen sequenzspezifisch ist, sollte P1_{scrambled}-GFP eine geringere Bindungsaffinität als P1-GFP aufweisen. Eine Messung der *in vitro* Bindungsaffinitäten der GFP-Fusionsproteine an

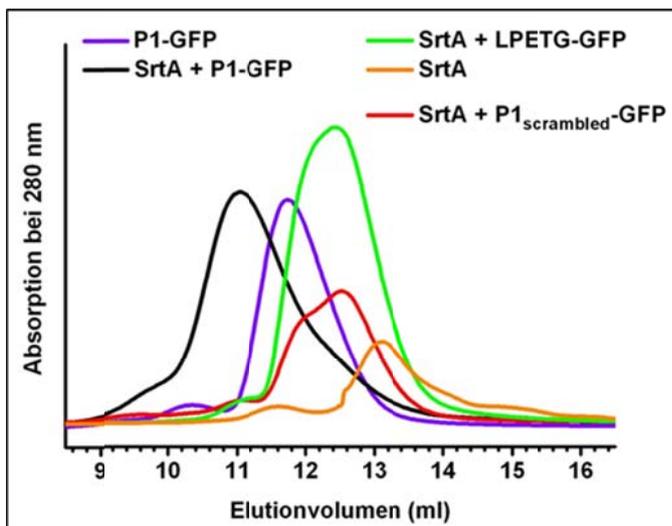


Abb.36: analytische Gelfiltration (Superdex 75) von P1-GFP, SrtA_{ΔN59}, und Inkubationsansätzen von SrtA_{ΔN59} mit P1-GFP, LPETG-GFP oder P1_{scrambled}-GFP im Vergleich. Es wurden je 60 μM SrtA_{ΔN59} mit 60 μM des entsprechenden GFP-Fusionsproteins über Nacht bei 4°C in SrtA-Aktivitätspuffer inkubiert.

SrtA_{ΔN59} mittels Fluoreszenzpolarisation, entsprechend Punkt 2.3.3.1, war nicht möglich. Vermutlich lag dies an dem zu geringen Größenunterschied zwischen dem freien GFP-Fusionsprotein (ca. 29 kDa) und dem P1-GFP:SrtA_{ΔN59}-Komplex (48 kDa). Um die *in vitro* Bindungsfähigkeit der GFP-Fusionsproteine an SrtA_{ΔN59} zu überprüfen, wurden Inkubationsansätze der GFP-Fusionsproteine und SrtA_{ΔN59} einer analytischen Gelfiltration unterzogen (Abb. 36 und 37).

Abb. 36 zeigt im Vergleich die mittels FPLC auf einer analytischen Superdex75 Säule ausgeführten Chromatographieläufe von P1-GFP, SrtA Δ N59, und Inkubationsansätzen von SrtA Δ N59 mit P1-GFP, LPETG-GFP oder P1_{scrambled}-GFP. Es wurde darauf verzichtet, für P1_{scrambled}-GFP und LPETG-GFP Chromatographieläufe ohne SrtA Δ N59 durchzuführen, da sie das gleiche Elutionsvolumen wie P1-GFP aufweisen. Aus Abb. 36 geht hervor, dass SrtA Δ N59 und P1-GFP einen Komplex bilden, da der detektierte Chromatographie-Peak des entsprechenden Inkubationsansatzes ein wesentlich geringeres Elutionsvolumen als die Chromatographie-Peaks von einzeln aufgetragenem P1-GFP oder einzeln aufgetragener SrtA Δ N59 aufweist. In diesem Inkubationsansatz liegt also ein wesentlich größerer Molekülkomplex als P1-GFP oder SrtA Δ N59 vor, was nur durch eine Komplexbildung zwischen P1-GFP und SrtA erklärt werden kann. Die Form des Peaks deutet nicht auf das Vorhandensein mehrerer, schlecht aufgetrennter Peaks hin. Es kann davon ausgegangen werden, dass P1-GFP und SrtA Δ 59 zu 100% als Komplex vorliegen. Dies entspricht den Erwartungen für einen K_d von ca. 10 nM, der unter 2.3.3 für die P1-Sequenz und SrtA Δ N59 bestimmt wurde. Dem gegenüber weisen P1_{scrambled}-GFP und LPETG-GFP fast keine Komplexbildung mit SrtA Δ N59 auf. Die Chromatographieläufe der entsprechenden Inkubationsansätze zeigen nur einen sehr kleinen Peak mit dem Elutionsvolumen des Komplexpeaks des Inkubationsansatzes von P1-GFP und SrtA Δ 59, und einen dem gegenüber sehr großen Peak, dessen Elutionszeit zwischen dem des Peaks einzeln aufgetragener SrtA Δ N59 und einzeln aufgetragenen P1-GFP liegt. Hier liegen LPETG-GFP bzw. P1_{scrambled}-GFP und SrtA also zum aller größten Teil als ungebundene Moleküle vor, deren Elutionspeaks jedoch nicht aufgetrennt werden konnten. P1_{scrambled}-GFP weist allenfalls nur eine geringe Bindungsaffinität zu P1_{scrambled}-GFP auf, während LPETG-GFP zwar eine hohe Bindungsaffinität zu SrtA Δ N59 aufweisen sollte, der entsprechende Komplex aber aufgrund seiner geringen Lebensdauer kaum detektierbar ist, da SrtA Δ N59 das LPETG-Motiv spaltet und die entstehenden Produkte freisetzt. Das C-terminale Produkt G-GFP und das Edukt LPETG-GFP dürften aufgrund ihrer fast identischen Größe ein nahezu gleiches Elutionsvolumen aufweisen und das N-terminale Produkt LPET-Gly dürfte aufgrund seiner geringen Größe ein Elutionsvolumen aufweisen, das nur geringfügig unter dem Bettvolumen der analytischen Superdex75-Säule von 24 ml liegt. Um den beschriebenen Peaks aus Abb. 36 ungefähre Molekulargewichte zuordnen zu können, wurde die genutzte Säule mit einem Proteingrößenstandard kalibriert. Abb. 37 zeigt die Kalibrierung der analytischen Superdex75-Säule mit Proteinen bekannten Molekulargewichts und die Elutions- / Ausschlussvolumenverhältnisse für den Inkubationsansatz von P1-GFP und SrtA Δ N59, P1-GFP einzeln aufgetragen sowie SrtA Δ N59 einzeln aufgetragen. Es wurde für Albumin (66382 Da), Ovalbumin (44000 Da), Chymotrypsinogen A (25000 Da) und

2.3.8 Ergebnisse: *in vivo* Bindung

Ribonuclease A (13700 Da) das Elutionsvolumen bestimmt. Zudem wurde das Ausschlussvolumen durch Blue Dextran mit 7,115 ml bestimmt. Das Verhältnis zwischen Molekulargewicht und Elutionsvolumen / Ausschlussvolumen kann durch die logarithmische Auftragung des Molekulargewichtes gegen Elutionsvolumen / Ausschlussvolumen linear dargestellt werden (Abb. 37).

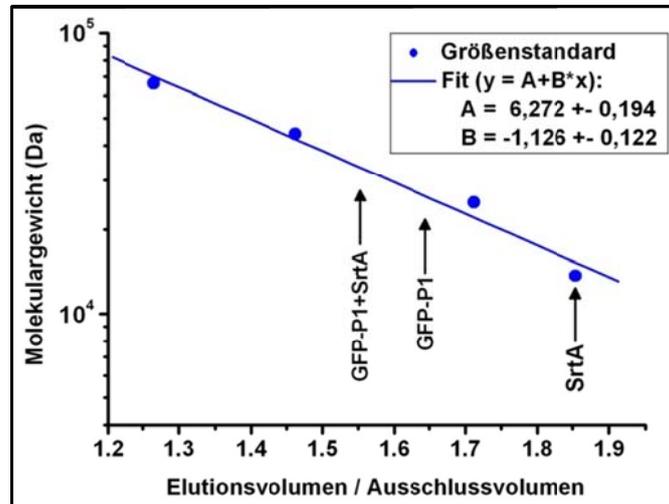


Abb. 37: Kalibrierung der analytischen Superdex75-Säule mit Proteingrößenstandards und Darstellung der Elutions- / Ausschlussvolumenverhältnisse für P1-GFP + SrtA Δ N59, P1-GFP und SrtA Δ N59 (weitere Erläuterung siehe Text)

Durch eine lineare Anpassung („Fit“) von Gleichung [1] (siehe Anhang) an die Datenpunkte in Abb. 37 ergibt sich für A = 6,272 und für B = -1,126. Somit ergibt sich für die genutzte Säule:

$$\log(\text{Molmasse}) = 6,272 - 1,126 * \text{Elutionsvolumen} / 7,115 \text{ ml} \quad [19]$$

Die hiermit für die Peaks aus Abb. 36 berechneten Molekulargewichte werden in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle. 8: Elutionsvolumen, anhand der Elutionsvolumen und Gleichung [19] für die Peaks aus Abb. 36 berechnete Molekulargewichte und ESI-MS bestimmte Molekulargewichte, der auf die Säule aufgetragenen Proteine

Protein (-Komplex)	Molekulargewicht (ESI-MS)	Elutionsvolumen (Superdex75, analytisch)	Molekulargewicht nach Gleichung [19]
P1-GFP	29822 Da	11,722 ml	26122 Da
SrtA Δ N59	18761 Da	13,188 ml	15311 Da
P1-GFP:SrtA Δ N59	48583 Da*	11,035 ml	33574 Da

*ermittelt durch Addition der Molekulargewichte von P1-GFP und SrtA Δ N59

Tabelle 8 zeigt die mittels einer Säulenkalibrierung den Peaks aus Abb. 36 zugeordneten Molekulargewichte im Vergleich zu den ESI-MS ermittelten Molekulargewichten der

aufgetragenen Proteine bzw. des aufgetragenen Proteinkomplexes. Tabelle 8 bestätigt die im vorhergehenden Textabschnitt dargelegte Interpretation der Chromatogramme in Abb. 36. Die mittels Gleichung [19] (Seite 57) und den Elutionszeiten berechneten Molekulargewichte liegen zwar um 12 - 31% unter den durch ESI-MS-ermittelten Molekulargewichten, aber da die Elutionszeit sich linear zum Molekülradius, dieser sich aber nicht unbedingt linear zum Molekulargewicht verhält, ist ein Fehler dieser Größenordnung bei der Molekulargewichtsberechnung mittels Elutionszeiten nicht zu vermeiden. Aus den Daten der analytischen Gelfiltration kann geschlossen werden, dass das fusionierte GFP die Bindung zwischen P1 und SrtA Δ N59 nicht beeinträchtigt, diese Bindung sequenzspezifisch ist und GFP keine unspezifische Bindung an SrtA Δ N59 zeigt.

In einem ersten *in vivo* Versuch wurde das Wachstumsmedium von *S. aureus* (ATCC6538p)-Flüssigkulturen mit je 7 μ M des GFP-Fusionsproteins P1-GFP oder P1_{scrambled}-GFP oder LPETG-GFP versetzt. Während des Wachstums der mit den GFP-Fusionsproteinen versetzten *S. aureus*-Kulturen wurden Proben genommen und die Zellen in Zellwaschpuffer gewaschen und pelletiert. Die durch GFP verursachte Grünfärbung der Pellets wurde visuell abgeschätzt. Aus diesem groben Vorversuch wurden folgende Kenntnisse gewonnen. Das Pellet der LPETG-GFP-Kultur war farblos, d.h. es kommt zu keiner sichtbaren unspezifischen GFP-Bindung an die Zellen. Das Pellet der P1-GFP-Kultur wies eine wesentlich stärkere Grünfärbung auf als das der P1_{scrambled}-GFP-Kultur. Die fusionierte P1-Sequenz bindet also sequenzspezifisch an die *S. aureus* Zellen. Die Intensitäten der Pelletgrünfärbungen der P1-GFP-Kultur und der P1_{scrambled}-Kultur wiesen für die Proben der frühen exponentiellen Wachstumsphase die größte Differenz auf. Es wurde daraus geschlossen, dass die P1-Sequenz auch *in vivo* von der SrtA gebunden wird, und diese Bindung am besten während der frühen exponentiellen Wachstumsphase beobachtet werden kann.

Die GFP-vermittelte Fluoreszenz der Zellen konnte nicht quantifiziert werden, da die Zellen eine zu hohe Hintergrundfluoreszenz aufwiesen. Um eine quantitative Auswertung der Bindung zu ermöglichen, wurde versucht, die GFP-Fluoreszenzabnahme der Überstände der mit den GFP-Fusionsproteinen versetzten Kulturen in Abhängigkeit zur Zelldichte zu ermitteln. Hierzu wurden die GFP-Fusionsproteine in einer Konzentration von 50 nM eingesetzt, da die Fluoreszenzintensität nur im Bereich von ca. 6 - 100 nM linear zur Fluorophorkonzentration war. Unter diesen Bedingungen konnte für P1-GFP keine kulturwachstumsbedingte Abnahme der Fluoreszenz der Kulturüberstände gemessen werden. Eine Ursache hierfür könnte in der molekularen Größe der GFP-Fusionproteine von ca. 30 kDa liegen. Die Diffusion eines 30 kDa großen Moleküls durch die Peptidoglykanzellwand zur membranverankerten SrtA ist vermutlich gehindert. Dies würde

erklären, weshalb keine signifikante Abnahme der P1-GFP-Konzentration im Medium während des Kulturwachstums beobachtet wird.

Die *in vivo* Bindung der nur ca. 3 kDa großen Peptidinhibitoren P1_{5FAM} (linear), P1_{5FAM} (zyklisch), P2_{5FAM} und P3_{5FAM} an *S. aureus*-Zellen konnte gezeigt werden. Sie wurden, entsprechend den Versuchen für die GFP-Fusionsproteine, in einer Konzentration von 50 nM den Wachstumsmedien von *S. aureus*-Kulturen zugesetzt. Die Peptidinhibitorbindung an die Zellen konnte über die Abnahme der Fluoreszenzintensität der Kulturüberstände während des Kulturwachstums beobachtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich für ein fluoresceinmarkiertes Peptid in Kulturmedium die Fluoreszenzintensität in einem Konzentrationsbereich von ca. 6 - 100 nM linear zur Peptidkonzentration verhält (Abb. 38).

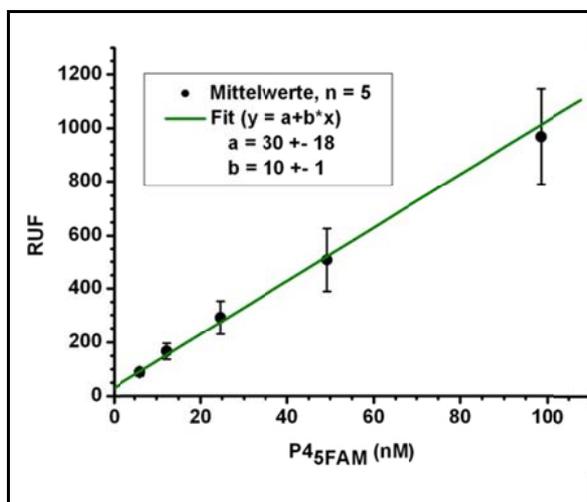


Abb. 38: Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die P4_{5FAM}-Konzentration für eine Verdünnungsreihe von P4_{5FAM} in Wachstumsmedium und lineare Anpassung („Fit“) von Gleichung [1] (siehe Anhang) an die Datenpunkte. Die Datenpunkte mit Fehlerbalken repräsentieren die Mittelwerte von 5 unabhängigen Titrationen und deren Standardabweichungen.

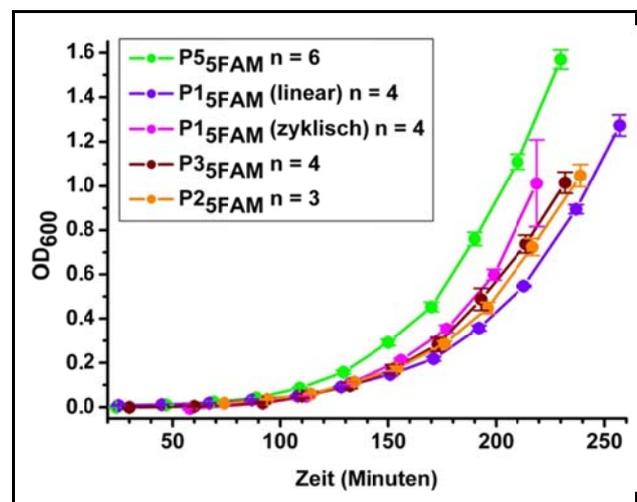


Abb. 39: Wachstumskurven der *S. aureus*-Kulturen, denen 50 nM P1_{5FAM} (linear), P1_{5FAM} (zyklisch), P2_{5FAM}, P3_{5FAM} oder P5_{5FAM} zugesetzt wurden. Die Datenpunkte mit Fehlerbalken repräsentieren die Mittelwerte von 3 - 6 Kulturen und deren Standardabweichungen.

Es konnten *S. aureus*-Kultivierungsbedingungen gefunden werden, die über Stunden hinweg ein vergleichbares Wachstum unabhängiger Kulturen gewährten. Abb. 39 zeigt die Wachstumskurven für die Messungen der *in vivo* Bindungen zwischen P1_{5FAM} (linear), P1_{5FAM} (zyklisch), P2_{5FAM}, P3_{5FAM} sowie der Negativkontrolle P5_{5FAM} und *S. aureus*-Zellen.

Während des Kulturwachstums wurden in Zeitabständen von 20 min. Proben genommen und die OD₆₀₀ bestimmt. Die Proben wurden zentrifugiert und die Fluoreszenz der Überstände gemessen. Abb. 40 zeigt die Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Kulturüberstände aufgetragen gegen die entsprechende OD₆₀₀. Die OD₆₀₀ verhält sich linear zur Zelldichte.

2.3.8 Ergebnisse: *in vivo* Bindung

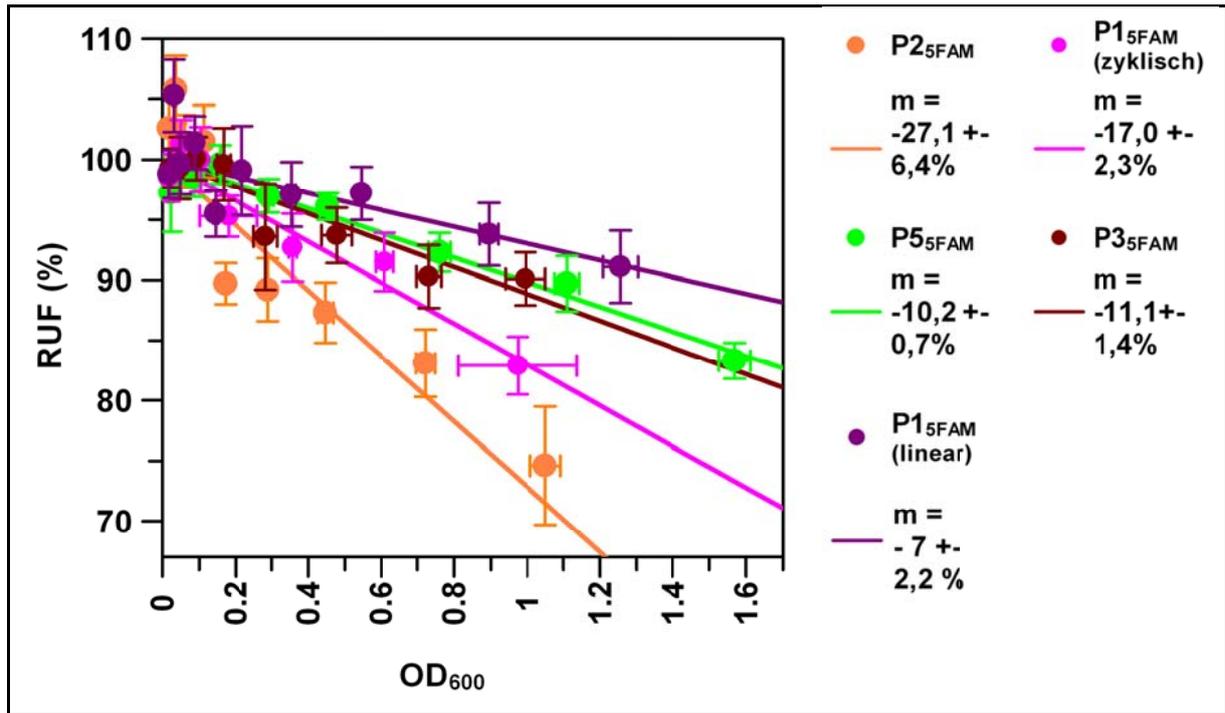


Abb. 40: prozentuale Fluoreszenzintensitätsabnahme von *S. aureus*-Kulturüberständen während des Wachstums, wobei dem entsprechenden Wachstumsmedium 50 nM P1_{5FAM} (linear), P1_{5FAM} (zyklisch), P2_{5FAM}, P3_{5FAM} oder P5_{5FAM} zugesetzt wurde. Die Datenpunkte mit Fehlerbalken repräsentieren die Mittelwerte von 3 - 6 unabhängigen Kulturen (entsprechend Abb. 39) und deren Standardabweichungen. Die durchgezogenen Linien zeigen die linearen Anpassungen von Gleichung [1] (siehe Anhang) an die Datenpunkte.

RUF = relative units fluorescence

Durch eine lineare Anpassung von Gleichung [1] (siehe Anhang) an die Datenpunkte aus Abb. 40 erhält man die Steigung m (in Gleichung [1] = b) in ΔRUF (%) / OD_{600} . Dieser anschauliche Wert wird in Abb. 41 dargestellt. Aus Abb. 41 geht hervor, dass P1_{5FAM} (zyklisch) und P2_{5FAM} gegenüber dem Kontrollpeptid P5_{5FAM} in signifikanter Weise von den *S. aureus*-Zellen gebunden werden, während dies für P1_{5FAM} (linear) und P3_{5FAM} nicht der Fall ist. Exemplarisch wurde für das die größte Bindungsaffinität aufweisende P2_{5FAM} die Spezifität der Bindung genauer untersucht. Hierzu wurden obige Versuche wiederholt mit 50 nM P2_{5FAM,scrambled}, oder 50 nM P2_{5FAM} + 500 nM P2_{unmarkiert}, oder 50 nM P2_{5FAM} + 500nM P2_{unmarkiert,scrambled} als Wachstumsmedienzusätze (Abb. 42). P2_{5FAM,scrambled} und P2_{unmarkiert,scrambled} besitzen die gleichen Aminosäuren wie P2_{5FAM} bzw. P2_{unmarkiert}, jedoch in veränderter Reihenfolge. P2_{5FAM,scrambled} hat eine solch geringe Bindungsaffinität zu SrtA_{ΔN59}, dass unter Verwendung der Methode aus Punkt 2.3.3.1 keine Bindung zwischen P2_{5FAM,scrambled} und SrtA_{ΔN59} detektiert werden konnte (Die Daten werden nicht aufgeführt). Ist die Bindung von P2_{5FAM} an die *S. aureus*-Zellen sequenzspezifisch, sollte erstens P2_{5FAM,scrambled} schlechter an die *S. aureus*-Zellen binden als P2_{5FAM} und zweitens P2_{5FAM} durch P2_{unmarkiert,scrambled} in geringerem Maße als durch P2_{unmarkiert} von den *S. aureus*-Zellen

2.3.8 Ergebnisse: *in vivo* Bindung

verdrängt werden. Aus Abb. 42 geht hervor, dass P2_{5FAM,scrambled} wesentlich schlechter an die *S. aureus*-Zellen bindet als P2_{5FAM}. P2_{5FAM} wird durch einen 10 fachen molaren Überschuss an P2_{unmarkiert} aus der Bindung verdrängt. Ein 10 facher molarer Überschuss an P2_{unmarkiert,scrambled} verdrängt P2_{5FAM} schlechter aus der Bindung an *S. aureus*-Zellen als P2_{unmarkiert}.

Insgesamt kann aus den Ergebnissen dieses Unterpunkts geschlossen werden, dass zumindest P2_{5FAM} und P2_{unmarkiert} *in vivo* sequenzspezifisch an *S. aureus*-Zellen binden. Für P2_{unmarkiert} wird daher exemplarisch im nächsten Unterpunkt eine Untersuchung zum *in vivo*-Inhibitionsvermögen vorgenommen (2.3.9).

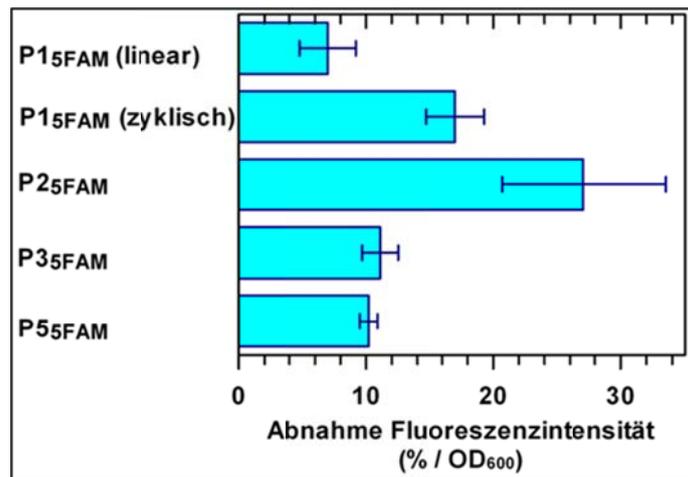


Abb. 41: Fluoreszenzintensitätsabnahme (normalisiert auf eine OD₆₀₀ von 1) der Überstände von *S. aureus*-Kulturen, deren Wachstumsmedien 50 nM P1_{5FAM} (linear), P1_{5FAM} (zyklisch), P2_{5FAM}, P3_{5FAM} oder P5_{5FAM} zugesetzt wurde.

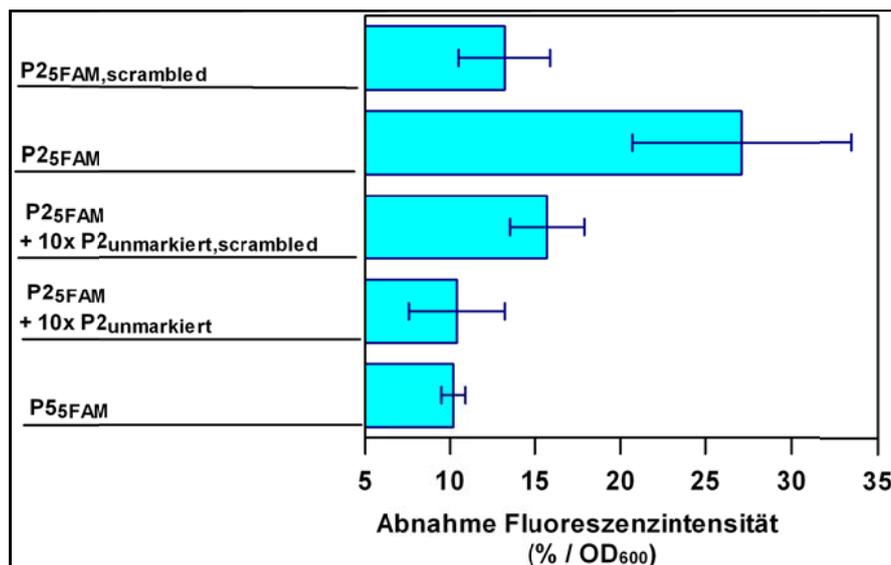


Abb. 42: Fluoreszenzintensitätsabnahme (normalisiert auf eine OD₆₀₀ von 1) der Überstände von *S. aureus*-Kulturen, deren Wachstumsmedien 50 nM P2_{5FAM,scrambled}, oder 50 nM P2_{5FAM} + 500 nM P2_{unmarkiert}, oder 50 nM P2_{5FAM} + 500nM P2_{unmarkiert,scrambled} zugesetzt wurde, im Vergleich zu den bereits in Abb. 41 dargestellten Ergebnissen für 50 nM P2_{5FAM} oder 50 nM P5_{5FAM} als Wachstumsmedienzusatz.

2.3.9 Versuche zur *in vivo* Inhibition von SrtA durch P2_{unmarkiert}

Da unter den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Peptidinhibitoren die P2-Peptidsequenz *in vivo* die größten Bindungsaffinitäten zu *S. aureus*-Zellen aufweist (2.3.8) wurde exemplarisch für P2_{unmarkiert} die *in vivo* Inhibition in Bezug auf SrtA untersucht. Hierzu wurde der Clumpingtiter von *S. aureus*-Kulturen bestimmt, deren Wachstumsmedien mit P2_{unmarkiert}, P2_{unmarkiert,scrambled} oder nur dem Lösungsmittel DMSO versetzt wurden. Der Clumpingtiter entspricht der niedrigsten Fibrinogen-Konzentration einer Fibrinogen-Verdünnungsreihe, bei der die Zugabe einer bestimmten Menge *S. aureus*-Zellen zu einer sichtbaren Verklumpung des Ansatzes führt. Fibrinogen wird von *S. aureus*-Oberflächenproteinen gebunden, die durch SrtA an der Zellwand verankert werden, wie z.B. dem Clumping factor A (ClfA). Da jedes Fibrinogenmolekül mehrere Bindedomänen besitzt, bilden die *S. aureus*-Zellen unter Anwesenheit von Fibrinogen Zellaggregate, welche über Fibrinogenmoleküle miteinander verbunden sind. Je weniger fibrinogenbindende Oberflächenproteine auf *S. aureus*-Zellen vorhanden sind, desto höher ist die für eine Verklumpung notwendige Fibrinogenkonzentration. Eine *in vivo* Inhibition der SrtA würde also zu einem Anstieg des Clumpingtiters führen. Für jedes der beiden Peptide P2 und P2_{scrambled} sowie die DMSO-Kontrolle wurden je drei unabhängige Kulturen angesetzt. Die Peptidkonzentration betrug jeweils 27,8 µM und die DMSO-Konzentration in jeder Kultur 1%. Da die Dichte der Oberflächenproteine und somit der Clumpingtiter innerhalb der Wachstumsphasen von *S. aureus*-Zellen variiert, wurden von jeder Kultur 4 Proben im Laufe der exponentiellen Wachstumsphase genommen. Von den Proben wurde die OD₆₀₀ bestimmt. Dann wurden die Zellen jeder Probe gewaschen, auf die gleiche OD₆₀₀ eingestellt und der Clumpingtiter bestimmt. Abb. 43 zeigt für jeden Medienzusatz, als Mittelwert der entsprechenden drei Kulturen, den Clumpingtiter aufgetragen gegen die OD₆₀₀, die die entsprechende Kultur zum Zeitpunkt der jeweiligen Probenahme aufwies. Abb. 44 zeigt die Wachstumskurve einer *S. aureus* (ATCC6538p)-Kultur unter den hier gewählten Kultivierungsbedingungen.

Aus Abb. 43 geht hervor, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Clumpingtitern aller Proben existiert. Somit zeigt eine Konzentration von 27,8 µM P2 *in vivo* keine inhibitorische Wirkung auf *Staphylococcus aureus* SrtA. Ferner geht aus Abb. 43 hervor, dass sich der Clumpingtiter am eindeutigsten, also mit dem geringsten Fehler, bei einer OD₆₀₀ von ca. 2,4 - 3,4 bestimmen lässt, bei der sich die Kulturen in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase befinden (siehe Wachstumskurve, Abb. 44).

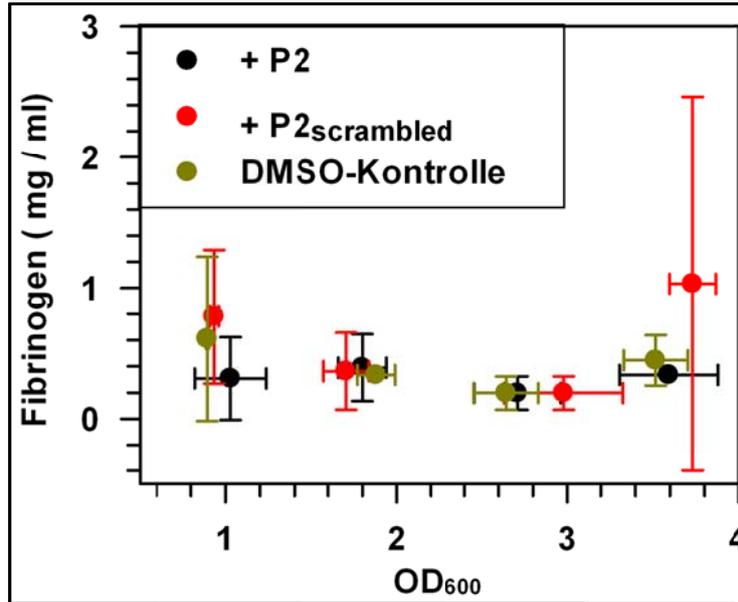


Abb 43: Clumpingtiter von *S. aureus*-Kulturen, deren Wachstumsmedien 27,8 μ M P2_{unmarkiert} („P2“), P2_{unmarkiert,scrambled} („P2_{scrambled}“) oder eine entsprechende Menge von 1% (v/v) DMSO („DMSO“) zugefügt wurden, zu verschiedenen Zeitpunkten der exponentiellen Wachstumsphase. Die Datenpunkte mit Fehlerbalken repräsentieren die Mittelwerte und deren Standardabweichungen von jeweils drei unabhängigen Kulturen

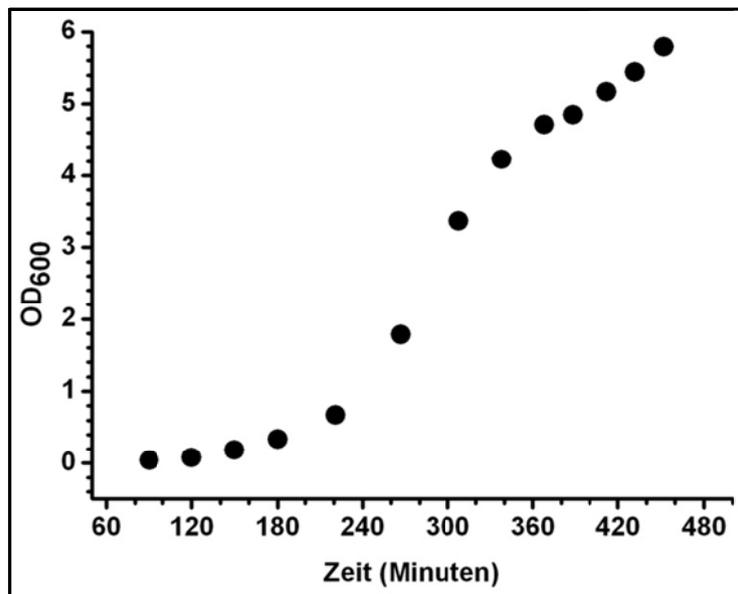


Abb. 44: Wachstumskurve einer *S. aureus*-Kultur unter den hier gewählten Kultivierungsbedingungen und 1% (v/v) DMSO als Wachstumsmedienzusatz.

2.4 Diskussion

Es wurden verschiedene Peptidsequenzen, zur Verfügung gestellte putative SrtA-Binder (Seebeck, unpublizierte Daten), bezüglich ihrer Interaktion mit SrtA charakterisiert, sowie der Einfluss einer Zyklisierung dieser Peptidsequenzen auf diese Interaktion untersucht. Hierzu wurden Methoden entwickelt, um K_d -Werte, IC_{50} -Werte, den Inhibitionsmechanismus, K_{off} -Wert, ΔH , ΔS , N und die *in vivo* Bindung an *S. aureus*-Zellen zu ermitteln. Die untersuchten Peptidsequenzen konnten als wirkungsvolle SrtA-Inhibitoren ausgewiesen werden.

2.4.1. Bestimmung der K_d -Werte der Peptidsequenzen und SrtA $_{\Delta N59}$

Betrachtet man die bisherigen SrtA-Inhibitor Charakterisierungen aus der Literatur (Tabelle 10, Seite 77), so wurden zumeist keine K_d -Werte der Inhibitoren bestimmt. In der einzigen Ausnahme (Scott et al., 2002) wurde ein K_d -Wert nur indirekt über den Inhibitoreinfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit berechnet. Ein direkter Vergleich der Potenz der vorgestellten SrtA-Inhibitoren mittels der statt einer K_d -Bestimmung vorgenommenen IC_{50} -Bestimmungen ist nur möglich, wenn sie unter exakt den gleichen Assaybedingungen ermittelt wurden. IC_{50} -Werte stellen keine Konstanten dar, sondern hängen von den gewählten experimentellen Bedingungen ab. In der vorliegenden Arbeit wurden auf Fluoreszenzpolarisation beruhende Bindungsassays genutzt, um die K_d -Werte für SrtA $_{\Delta N59}$ und den hier untersuchten Peptidinhibitoren zu ermitteln. Da der K_d -Wert eine Konstante darstellt, ist er besser zur Charakterisierung eines Inhibitors geeignet, als der IC_{50} -Wert.

2.4.1.1 Bestimmung der K_d -Werte der fluoreszenzmarkierten Peptide und SrtA $_{\Delta N59}$

Für die fluoreszenzmarkierten Peptide wurde der K_d -Wert über die Titration von SrtA $_{N59}$ zu einer konstanten Konzentration des entsprechenden Peptids ermittelt. Die Bindung eines zunehmenden Anteils der fluoreszenzmarkierten Peptide an die hinzutitrierte verhältnismäßig große SrtA konnte anhand zunehmender mP-Werte verfolgt werden. Die ermittelten mP-Werte zeigen bei halblogarithmischer Auftragung gegen die SrtA $_{\Delta N59}$ -Konzentration erwartungsgemäß einen sigmoidalen Kurvenverlauf, wobei die Plateaus für den Minimal- und den Maximalwert jeweils erreicht werden konnten und der statistische Fehler gering im Vergleich zur Differenz zwischen dem Maximal- und Minimalwert ist. Zur Auswertung der Messungen wurde Gleichung [2] (siehe Anhang) an die Datenpunkte angepasst. Zu bemerken ist, dass die aus der Funktionsanpassung resultierenden von den eingesetzten

Peptidkonzentrationen (Tabelle 20, Seite 126) abweichen, wobei nicht aufgeklärt werden konnte, was diese Abweichungen verursacht (Punkt 2.4.3). Da aber die aus den Funktionsanpassungen resultierenden K_d -Werte keinen signifikanten Unterschied aufweisen, je nachdem ob eine variable, oder eine der experimentellen Vorschrift entsprechend fixierte Peptidkonzentration genutzt wurde, kann dennoch davon ausgegangen werden, dass die K_d -Werte der fluoreszenzmarkierten Peptide korrekt bestimmt wurden. Die ermittelten K_d -Werte werden jeweils als Mittelwert der Funktionsanpassungsergebnisse für eine variable Peptidkonzentration einerseits und eine der experimentellen Vorschrift entsprechenden Peptidkonzentration andererseits angegeben. Die niedrigsten K_d -Werte zeigen mit 12 ± 1 nM und 10 ± 9 nM die Peptide P1_{5FAM} (linear) und P1_{5FAM} (zyklisch), gefolgt von P2_{5FAM} (75 ± 20 nM) und P3_{5FAM} (50 ± 20 nM). Die Ergebnisse zeigen, dass die Art der Zyklisierung keinen großen Einfluss auf die K_d -Werte hat. Ob keine Zyklisierung (P1_{5FAM} (linear)), oder eine Zyklisierung über zwei Cysteine einige Aminosäuren vom Bindungsmotiv entfernt vorhanden ist (P1_{5FAM} (zyklisch)), hat keinen Einfluss auf den K_d -Wert. Auch eine Zyklisierung über zwei Cysteine, von denen eines innerhalb des Bindungsmotivs liegt (P2_{5FAM}) beeinflusst den K_d -Wert in ähnlich geringem Maße wie eine Zyklisierung über drei Cysteine (P3_{5FAM}). Da die ermittelten K_d -Werte im niedrigen nanomolaren Bereich liegen, scheinen Modifikationen des N- und C-Terminus der Peptide keinen drastischen Einfluss auf das Bindungsgeschehen zu haben. Die hier verwendeten Peptide verfügen N-terminal über ein 5FAM und C-terminal über eine PEG₃-Einheit, wohingegen die im SrtA-Binder-Screening (mRNA Display) eingesetzten Peptide N-terminal unmodifiziert waren und C-terminal an ihre mRNA geknüpft waren. Im Vergleich zu dem Einzigen aus der Literatur bekannten K_d -Werten für SrtA-Inhibitoren von 210 nM und 220 nM (Scott et al., 2002) sind die K_d -Werte der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Peptide um das zwei bis 20 fache niedriger. Die hier untersuchten Peptidsequenzen binden zudem sehr spezifisch an SrtA, da keinerlei Bindung an das SrtA-verwandte Enzym SrtB gemessen werden konnte.

2.4.1.2 Bestimmung der K_d -Werte der fluoreszenzmarkierten Peptidinhibitoren und dem Komplex (SrtA_{biotinyliert})₄:Avidintetramer

Es wurde überprüft, ob die ermittelten K_d -Werte für die hier untersuchten Peptide und SrtA_{ΔN59} dem Bindungsgeschehen während des SrtA-Binder-Screenings entsprechen, für den an Avidintetramere gebundene biotinylierte SrtA als Zielstruktur genutzt wurde. Hierzu wurde der Komplex (SrtA_{bio}:Avidinmonomer)₄ hergestellt und exemplarisch für P1_{5FAM} (linear), und P1_{5FAM} (zyklisch) die Bindungsaffinität zu diesem Komplex ermittelt. Es zeigte sich, dass die K_d -Werte für (SrtA_{bio}:Avidinmonomer)₄ und P1_{5FAM} (linear) bzw.

P1_{5FAM} (zyklisch) mit 43 ± 22 nM bzw. 24 ± 13 nM den K_d -Werten für SrtA $_{\Delta N59}$ und P1_{5FAM} (linear) bzw. P1_{5FAM} (zyklisch) von 12 ± 1 nM bzw. 10 ± 9 nM sehr ähnlich sind. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der Komplex (SrtA_{biotinyliert})₄:Avidintetramer als Zielstruktur für SrtA-Binder-Screenings eingesetzt werden kann.

2.4.1. 3 Bestimmung der K_d -Werte der unmarkierten Peptidinhibitoren und SrtA $_{\Delta N59}$

Für die IC₅₀-Bestimmung an SrtA $_{\Delta N59}$ (siehe 2.4.4) wurden unmarkierte Varianten der Peptidinhibitoren P1, P2 und P3 verwendet. Der entwickelte IC₅₀-Assays beruht auf einem fluoresceinmarkierten SrtA-Substrat, weshalb eine Fluoresceinmarkierung des hinzutitrierten Inhibitors die Ergebnisse verfälscht hätte. Des Weiteren wurde exemplarisch die Enthalpie, Entropie und Stöchiometrie der Bindung von P1 an SrtA $_{\Delta N59}$ mittels ITC bestimmt, wozu aufgrund der besseren Löslichkeit unmarkierte MBP-P1-Fusionsproteine verwendet wurden. Die K_d -Werte der unmarkierten Peptide und MBP-P1-Fusionsproteine an SrtA $_{\Delta N59}$ wurden bestimmt, um sicherzustellen, dass die K_d -Werte der fluoresceinmarkierten und unmarkierten Peptidinhibitoren vergleichbar sind, und folglich die an den unmarkierten Peptidinhibitoren durchgeführten Untersuchungen (IC₅₀, ITC) repräsentativ für die fluoresceinmarkierten Peptidinhibitoren sind. Hierzu wurden Konkurrenztitrationen (Mathias und Jung, 2007) verwendet. Mittels Fluoreszenzpolarisation wurde in Form einer Endpunktmessung die Verdrängung des entsprechenden fluoresceinmarkierten Peptidinhibitors durch variierte Konzentrationen des entsprechenden unmarkierten Peptidinhibitors von SrtA $_{\Delta N59}$ ermittelt. Die erhaltenen mP-Werte zeigten erwartungsgemäß bei halblogarithmischer Auftragung einen sigmoidalen Kurvenverlauf, wobei das P_{max}- und P_{min}-Plateau jeweils erreicht werden konnten und die statistische Fehler der Messpunkte mit Ausnahme von P2_{unmarkiert} gering im Vergleich zur Differenz des P_{max}- und P_{min}-Wertes sind. Es kann davon ausgegangen werden, dass die K_d -Werte der unmarkierten Peptidinhibitoren korrekt anhand der Wendepunkte der Graphen berechnet werden konnten. Die ermittelten K_d -Werte sind in Tabelle 9 den K_d -Werten der fluoreszenzmarkierten Peptide gegenüber gestellt. Es ist festzustellen, dass das Fehlen der N-terminalen 5FAM-Modifikation bzw. deren Ersatz durch ein MBP-Fusionsprotein keinen signifikanten Einfluss auf die K_d -Werte hat. Bezieht man die Fehlerspanne in die Betrachtung ein, so weichen die K_d -Werte der unmarkierten Peptidinhibitoren nur in unerheblichem Maße von denen der entsprechenden fluoreszenzmarkierten Peptidinhibitoren ab. Die größten Abweichungen sind bei P1_{unmarkiert} (zyklisch) und P2_{unmarkiert} zu verzeichnen, jedoch ist zu beachten, dass diese beiden Messungen im Vergleich zu den anderen eine schlechtere Datenqualität aufweisen. Für P1_{unmarkiert} (zyklisch) weicht der Graph von einem idealen sigmoidalen Verlauf ab und für

P2_{unmarkiert} sind die statistischen Fehler der Datenpunkte vergleichsweise groß. Zudem ist einzubeziehen, dass Ungenauigkeiten bei der Peptidkonzentrationsbestimmung (siehe hierzu 2.4.1.1 und 2.4.3) nicht ausgeschlossen werden konnten, welche eine Fehlerquelle für die Auswertung des indirekten Bindungsassays darstellen. Im Rahmen der zu erwartenden Messungenauigkeiten weisen daher alle unmarkierten und fluoresceinmarkierten Peptide sowie die MBP-P1-Fusionsproteine dieselbe Bindungsaffinität zu SrtA_{ΔN59} auf. Es kann davon ausgegangen werden, dass die IC₅₀- und ITC-Messungen an den unmarkierten Peptidinhibitoren repräsentativ für die fluoresceinmarkierten Peptidinhibitoren sind, und die Bindungsfähigkeiten der Peptidsequenzen an SrtA_{ΔN59} offenbar wenig empfindlich gegenüber Variationen des N- und des C-Terminus sind.

Tabelle 9: Vergleich der K_d -Werte der unmarkierten und fluoresceinmarkierten Peptidinhibitoren an SrtA_{ΔN59}

unmarkierte Peptidinhibitoren		fluoresceinmarkierte Peptidinhibitoren	
Name	K_d (nM)	K_d (nM)	Name
P1 _{unmarkiert} (linear)	10 ± 0	12 ± 1	P1 _{5FAM} (linear)
P1 _{unmarkiert} (zyklisch)	81 ± 57	10 ± 9	P1 _{5FAM} (zyklisch)
P2 _{unmarkiert}	18 ± 8	75 ± 20	P2 _{5FAM}
P3 _{unmarkiert}	76 ± 10	50 ± 13	P3 _{5FAM}
MBP-P1 _{nativ}	9 ± 1	12 ± 1	P1 _{5FAM} (linear)
MBP-P1 _{zyklisch}	40 ± 3	10 ± 9	P1 _{5FAM} (zyklisch)
MBP-P1 _{Kontrolle}	12 ± 0	12 ± 1	P1 _{5FAM} (linear)

2.4.1.4 Übertragbarkeit des Assays zur Bestimmung der K_d -Werte der unmarkierten Peptidinhibitoren auf SrtA-Inhibitoren allgemein

Da der in der vorliegenden Arbeit etablierte indirekte SrtA-Bindungsassay keine Fluoreszenzmarkierung des zu untersuchenden potentiellen SrtA-Bindungspartners voraussetzt, könnte der Assay in künftigen Studien zur K_d -Bestimmung von am aktiven Zentrum bindenden SrtA-Inhibitoren genutzt werden. Das einfach zu synthetisierende Peptid P1_{5FAM} (linear) könnte hierzu universal als vom aktiven Zentrum zu verdrängender Bindungspartner eingesetzt werden. Da es sich hier um einen Assay im 384-Well-Format handelt, der nur zu einem Zeitpunkt t ausgelesen werden muss, stellt er eine Vereinfachung der K_d -Wert Bestimmung von SrtA-Inhibitoren im Vergleich zu den bisher genutzten K_d -Wert Berechnungen aus für verschiedene Bedingungen ermittelten IC₅₀-Werten dar. Besonders in Anbetracht von SAR (Structure-Activity-Relationship) -Studien wäre eine einfache Methode zur Bestimmung von K_d -Werten von Vorteil, da die Relevanz von einzelnen Strukturmerkmalen für das Bindungsgeschehen am besten über deren Einfluss auf den

K_d -Wert bemessen werden kann. Allerdings könnten auf diese Weise nur niedrige K_d -Werte bestimmt werden. Um das Peptid P1_{5FAM} (linear), welches eine Dissoziationskonstante von 10 nM aufweist, mit einem deutlich schlechter bindenden Inhibitor aus dem aktiven Zentrum von SrtA zu verdrängen, bedürfte es Inhibitorkonzentrationen, die wahrscheinlich dessen Löslichkeit in SrtA-kompatiblen Puffer überschreiten. Dieses Problem könnte gemildert werden, indem ein Peptid mit einem höheren Wert für die Dissoziationskonstante von SrtA verwendet wird. Zum Beispiel wurde in Rahmen der vorliegenden Arbeit dem N-terminal FITC-markierten und über die beiden Cysteine DBX-zyklisierten Peptid GCEVLPPCG eine Dissoziationskonstante von ca. 900 nM zugeordnet (die Daten werden hier nicht aufgeführt). Ein Assay bei welchem 900 nM diesen Peptids und 18 μ M SrtA mit dem zu testenden kompetitiven SrtA-Inhibitor titriert werden, würde die Bestimmung deutlich höherer K_d -Werte ermöglichen, als dies für ein Assay unter Verwendung des Peptids P1_{5FAM} (linear) der Fall ist.

2.4.2 K_{off} -Wert des Komplexes SrtA $_{\Delta N59}$:P1_{5FAM} (linear)

Exemplarisch für P1_{5FAM} (linear) wurde der Wert für K_{off} bestimmt. Hierzu wurde die Verdrängung von P1_{5FAM} (linear) durch P1_{unmarkiert} (linear) von SrtA $_{\Delta N59}$ mittels Messung der Fluoreszenzpolarisierung über die Zeit verfolgt. Aufgrund der gewählten Konzentrationsverhältnisse wird davon ausgegangen, dass die beobachtete Verdrängung dem Zerfall des Komplexes EI zu E + I, also einer Reaktion erster Ordnung, entspricht. Das Verhältnis $(EI)_t/(EI)_0$ für jeden Zeitpunkt wurde mit Hilfe der Kontrollen für P_{max} und P_{min} berechnet. Im P_{max} -Kontrollansatz wurde nur der Puffer des unmarkierten Peptids hinzugegeben, weshalb der P_{max} -Wert 0 % Komplexzerfall $((EI)_0)$ entspricht. Im P_{min} -Kontrollansatz wurde nur der Puffer der SrtA $_{\Delta N59}$ hinzugegeben, weshalb der P_{min} -Wert 100 % Komplexzerfall $((EI)_\infty)$ entspricht. Die tatsächlichen Werte für $(EI)_0$ und $(EI)_\infty$ konnten nicht gemessen werden, da die erste Messung gerätebedingt erst mit einer Verzögerung von ca. 1 min. nach dem Zusammenmischen der Reaktion stattfand, und die Messung nicht unendlich lange fortgeführt werden konnte. Es wurden für jeden Zeitpunkt P_{max} - und P_{min} -Kontrollen gemessen, um den Einfluss der 30 minütigen Messung mit insgesamt 2500 Belichtungsblitzen auf die Fluoreszenzpolarisationswerte beurteilen zu können. Temperaturänderungen verändern z.B. die Viskosität des Puffers, welche einen direkten Einfluss auf die mP-Werte hat. Ein Ausbleichen des Fluorophors erhöht den statistischen Fehler der Daten, da das Verhältnis Signal / Hintergrund sinkt. Der Kehrwert von K_{off} ergibt sich aus dem Zeitpunkt, für den $\ln((EI)_t/(EI)_0)$ den Wert -1 annimmt. Die Auftragung von $\ln((EI)_t/(EI)_0)$ gegen die Zeit zeigte erwartungsgemäß einen linearen Verlauf. Die ersten vier Messwerte wurden nicht in die K_{off} -Bestimmung einbezogen, da die entsprechenden

P_{\max} -Kontrollen keine konstanten mP-Werte zeigten. Ebenso wurden die letzten 11 Messpunkte nicht in die K_{off} -Bestimmung einbezogen, da die Werte zunehmende Schwankungen aufwiesen. Der zu beobachtende leichte Abfall der mP-Werte der Kontrollen über den für die K_{off} -Bestimmung verwendeten Zeitraum (35 Messpunkte) könnte mit dem vom Plattenlesegerät verzeichneten Anstieg der Temperatur von 27,2°C auf 28°C zusammenhängen. Die Viskosität des Reaktionspuffers nimmt mit zunehmender Temperatur ab und eine abnehmende Viskosität des umgebenden Mediums führt zu einer Verringerung der Fluoreszenzpolarisation eines gegebenen fluoreszenzmarkierten Moleküls oder Molekülkomplexes. Da die Vorinkubation für P1_{5FAM} (linear) mit SrtA_{ΔN59} (bzw. SrtA_{ΔN59}-Puffer) bei ca. 25°C stattfand, könnten die oben erwähnten starken mP-Wert Schwankungen während der ersten vier Messpunkte auf der anfänglichen Temperaturerhöhung von ca. 25°C auf 27,2 °C beruhen. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass bei einer Vorinkubation bei ca. 4°C und einer Messung bei RT die anfänglichen MP-Wert-Schwankungen wesentlich höher sind als bei einer Vorinkubation bei ca. 25°C. Da das verwendete Plattenlesegerät über keine Kühlfunktion verfügt, konnten Temperaturerhöhungen während des Messvorgangs nicht vermieden werden. Die leichte Abnahme der mP-Werte während der bezüglich des K_{off} -Wertes ausgewerteten mittleren 35 Messpunkte wurde vernachlässigt. Mit Hilfe einer linearen Regression der Auftragung von $\ln((EI)_t/(EI)_0)$ gegen die Zeit konnte ein K_{off} -Wert von 0,0007 s⁻¹ und eine Halbwertszeit von 990 s für die Dissoziation des Komplexes SrtA_{ΔN59}:P1_{5FAM} (linear) ermittelt werden. P1_{5FAM} (linear) ist also in Bezug SrtA_{ΔN59} ein langsam reversibler Inhibitor. Aus dem K_{off} -Wert und dem bekannten K_d -Werte ergibt sich für die Bildung des Komplexes SrtA_{ΔN59}:P1_{5FAM} (linear) ein K_{on} -Wert von 70000 s⁻¹ * M⁻¹. Vergleicht man den K_{off} -Wert und den K_{on} -Wert mit der hier ermittelten Rate der Produktbildung der SrtA von 0,0037 s⁻¹ (siehe 2.4.4.1), so wird ersichtlich, dass eine Inhibition der SrtA durch P1_{5FAM} (linear) auf dem verhältnismäßig hohen K_{on} -Wert beruhen muss. Es wird davon ausgegangen, dass es sich, aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu P1_{5FAM} (linear), auch bei den übrigen P1-Varianten und den Peptiden P2 und P3 um langsam reversible Sortase A-Inhibitoren handelt. Um sicherzustellen, dass im obigen Experiment tatsächlich der K_{off} -Wert bestimmt wurde, und es sich um einen langsam reversiblen Inhibitionsmechanismus handelt, wurde mittels HPLC und ESI-MS überprüft ob, und ausgeschlossen dass, SrtA die fluoreszenzmarkierten Peptide modifiziert.

2.4.3 ITC-Messungen zur Ermittlung von ΔH , ΔS und N

ITC-Messungen, welche ΔH , $-T\Delta S$ und N-Werte liefern, wurden exemplarisch für die Fusionsproteine MBP-P1_{zyklisch}, MBP-P1_{nativ} und MBP-P1_{Kontrolle} durchgeführt, um mehrere Erkenntnisse zu erhalten.

Zum einen wurden für die Bindungen von SrtA und SrtA-Inhibitoren bisher keine ΔH und $-T\Delta S$ Werte ermittelt, weshalb sich hier erstmalig Einblicke in thermodynamische Parameter eines SrtA-Inhibitors bieten. Dies ermöglicht die Klärung der Frage, ob die Bindung Enthalpie-, also von der Ausbildung von Salz- und Wasserstoffbrücken, oder Entropie-, d.h. von der Freisetzung von Lösemittelmolekülen aus der Bindungstasche, getrieben ist. Als dritte Möglichkeit könnte auch eine bindungsverhindernde Entropieminderung aufgrund von Einbußen von Rotations- und Translationsfreiheiten („Entropiestrafe“) von hohen ΔH -Werten kompensiert werden. Zudem sollte die Relevanz der P1-Zyklisierung untersucht werden. Inwieweit ein Unterschied zwischen den $\Delta H / -T\Delta S$ Verhältnissen zwischen der zyklischen und linearen MBP-fusionierten P1-Variante existiert, zeigt sich durch die durchgeführten ITC-Messungen. Für die Bindung von MBP-P1_{zyklisch}, MBP-P1_{nativ} und MBP-P1_{Kontrolle} an SrtA $_{\Delta N59}$ resultierte das gleiche Reaktionsprofil (Enthalpiegetrieben). Die Entropie erfährt nur eine unbedeutende Änderung. Die Einbuße von Rotations- und Translationsfreiheiten durch die Bindung wird also ausgeglichen durch die Freisetzung von Lösemittelmolekülen aus der Bindungstasche. Da für alle drei Fusionsproteine die ermittelten thermodynamischen Parameter sehr ähnliche Werte aufweisen, kann geschlossen werden, dass das vorhanden Sein oder Fehlen einer Zyklisierung der P1-Sequenz irrelevant für das Bindungsgeschehen ist.

Zum anderen wurde die Stöchiometrie N der Bindung von SrtA $_{\Delta N59}$ und den drei Fusionsproteinen MBP-P1_{zyklisch}, MBP-P1_{nativ} und MBP-P1_{Kontrolle} bestimmt. Bei den K_d -Wert-Bestimmungen der fluoresceinmarkierten Peptidinhibitoren und SrtA (siehe 2.4.1) war aufgefallen, dass die aus der Funktionsanpassung resultierenden Peptidkonzentrationen nicht den nach experimenteller Vorschrift eingesetzten Peptidkonzentrationen entsprachen und diese Abweichungen für die zyklischen Peptide P1_{5FAM} (zyklisch), P2_{5FAM} und P3_{5FAM} höher waren als für das lineare Peptid P1_{5FAM} (linear). Verschiedene Gründe für die erwähnten Konzentrationsabweichungen waren vorstellbar. Das Bindungsmotiv enthält bei allen Peptidinhibitoren zwei Proline. Peptidbindungen an denen ein Prolin beteiligt ist, können zu einem bedeutenden Anteil in der Cis-Konformation vorliegen, wodurch für ein Peptid mit zwei Prolinen vier Konformationskombinationen denkbar sind. Die Zyklisierung könnte die Cis- / Trans-Umlagerung des Peptids behindern und könnte auch eine bestimmte Konformationskombination unterstützen. Wenn man annimmt, dass SrtA nicht alle der vier

möglichen Konformationskombinationen binden kann, wäre dies eine Erklärung dafür, weshalb die aus den Funktionsanpassungen resultierenden Peptidkonzentrationen bei den zyklischen Peptiden deutlich unter den eingesetzten Peptidkonzentrationen liegen. Das lineare Peptid P1_{5FAM} (linear) könnte sich während der Inkubationszeit mit SrtA genügend oft umlagern, so dass die SrtA jeweils die bindungsfähigen Varianten aus dem Gleichgewicht ziehen könnte, bis fast alle Peptide an SrtA gebunden vorliegen und die aus der Funktionsanpassung resultierende Peptidkonzentration fast der experimentell eingesetzten entspricht. Sollte dies zutreffen, wäre die Bindungsstöchiometrie N der zyklischen Peptidinhibitoren und SrtA ungleich 1, während sie bei den linearen P1-Varianten einem Wert von 1 entsprechen müsste. Anhand der ITC-Messungen konnte eine Stöchiometrie von ca. 1 für die Bindung aller Fusionsproteine an SrtA $_{\Delta N59}$ gezeigt werden. Dem zu Folge verursacht die MBP-P1-Zyklisierung keine Änderung der Bindungsstöchiometrie verglichen mit linearem MBP-P1. Entweder fixiert die Zyklisierung die Peptidsequenzkonformationen also nicht, oder alle Isomeren binden gleich gut an SrtA $_{\Delta N59}$, oder das Bindungsmotiv liegt nur in einer isomeren Form vor. Daraus, dass die Bindungsstöchiometrie den Wert 1 zeigt, ergibt sich zudem, dass die Konzentrationen der Fusionsproteine und SrtA $_{\Delta N59}$ korrekt bestimmt wurden und die Proteine zu 100% aktiv sind. Als Erklärungen für die bei den K_d -Wert-Bestimmungen beobachteten Abweichungen der aus den Funktionsanpassungen resultierenden von den experimentell eingesetzten Konzentrationen der fluoresceinmarkierten Peptide bleiben dann noch, dass entweder der Extinktionskoeffizient von 5FAM nicht dem der fluoresceinmarkierten Peptide entspricht und daher die über den Extinktionskoeffizient von 5FAM ermittelten Peptidkonzentrationen fehlerhaft sind, dass die Peptide nicht vollständig gelöst waren, oder dass unbedachte / unerkannte Effekte, welche in der an die Datenpunkte angepassten Gleichung [2] (siehe Anhang) nicht berücksichtigt sind, die gemessenen mP-Werte beeinflussen. Die fluoresceinmarkierten Peptide konnten nicht mittels ITC vermessen werden. Aufgrund ihrer geringen Löslichkeit konnten die erforderlichen hohen Konzentrationen in wässrigem Puffer nicht erreicht werden. Da die K_d -Wert-Ergebnisse der Funktionsanpassungen mit entweder variabler, oder der experimentellen Vorschrift entsprechend fixierter, Peptidkonzentration jeweils sehr ähnlich waren, wurde die Peptidkonzentrationsfrage als praktisch unbedeutend eingestuft, und keine weiteren Untersuchungen zu deren Aufklärung unternommen.

2.4.4 IC₅₀-Werte der unmarkierten Peptidinhibitoren an SrtA_{ΔN59}

2.4.4.1 Entwicklung IC₅₀-Assay

Aufgrund der begrenzten Löslichkeit der Peptide in SrtA-Reaktionspuffer konnten publizierte SrtA-Aktivitätsassays (siehe 2.3.5.1) nicht angewendet werden, weshalb ein neuer, auf Fluoreszenzpolarisation beruhender SrtA-Aktivitätsassay entwickelt wurde, der geringere Inhibitorkonzentrationen zur Ermittlung von IC₅₀-Werten voraussetzt. Hierzu wurde das neue SrtA-Substrat LPETGKG_{5FAM,Biotin} synthetisiert. Mittels HPLC-Auftrennung und ESI-MS-Messungen konnte gezeigt werden, dass dieses Substrat von SrtA_{ΔN59} in Anwesenheit von Glycinamid in die Spaltungsprodukte der SrtA-Reaktion, das N-terminal 5FAM-markierte LPET-Gly_{5FAM} und das an der Lysinseitenkette biotinylierte GKG_{Biotin}, umgesetzt wird. Der entwickelte SrtA-Aktivitätsassay beruht darauf, dass nur beim intakten Substrat der Fluorophor mittels der Substratbiotinylierung an zugegebenes Avidin binden kann und der entstehende Komplex eine hohe Fluoreszenzpolarisation verursacht, während das fluoreszenzmarkierte Spaltungsprodukt LPET-Gly_{5FAM} nicht an Avidin binden kann und eine geringe Fluoreszenzpolarisation hervorruft. Es wurde, analog zu der Methodik für die K_d-Wert Bestimmung der fluoreszenzmarkierten Peptide und SrtA_{ΔN59}, gezeigt, dass das neue SrtA-Substrat LPETGKG_{5FAM,Biotin} bezüglich Avidin einen K_d-Wert von 89 ± 7 nM aufweist. Dieser liegt um 7 Größenordnungen höher als der K_d-Wert für Avidin und Biotin von 10⁻¹⁵ M. Eine solche Abweichung wurde auch schon für das HCMV-Protease-Substrat Biotin-γ-Abu-GVNASARLK(DTAF)-NH₂ beschrieben (Levine et al., 1997). Diese Erhöhung des K_d-Wertes der biotinylierten Substrate und Avidin im Vergleich zu Biotin und Avidin beruht wahrscheinlich darauf, dass das jeweils an Biotin geknüpfte Substratmolekül die Bindung von Biotin in der Bindungstasche des Avidin sterisch erheblich behindert. Aus dem P_{max}-Plateau der durchgeführten LPETGKG_{5FAM,Biotin} / Avidin K_d-Bestimmung ging eine Konzentration an tetramerem Avidin von 2 μM als ausreichend hervor, um die eingesetzten 360 nM LPETGKG_{5FAM,Biotin} praktisch vollständig zu binden. Die Inkubation der IC₅₀-Messungen sollte über Nacht erfolgen, um mit einer geringen SrtA_{ΔN59}-Konzentration eine messbare Substratspaltung zu erreichen und entsprechend der geringen Enzymkonzentration auch nur geringe Inhibitorkonzentrationen zu benötigen. Eine Konzentration von 500 nM SrtA_{ΔN59} stellte sich als ausreichend heraus, um 360 nM Substrat über Nacht zu ca. 80% umzusetzen. Es wurde als sinnvoll erachtet, die Assaybedingungen so zu wählen, dass das Substrat möglichst vollständig umgesetzt wird, weil dadurch die Spanne zwischen den mP-Werten für vollständig aktive SrtA_{ΔN59} und vollständig inhibierte SrtA_{ΔN59} möglichst groß ist und der Assay dadurch robuster gegenüber den statistischen

Fehlern der gemessenen mP-Werte wird. Es wurde außerdem festgestellt, dass SrtA_{ΔN59} unter den Inkubationsbedingungen mindestens 23 h aktiv ist und dass SrtA_{ΔN59} durch die Zugabe von Avidin abgestoppt wird, wie dies auch für die HCMV-Protease berichtet wurde (Levine et al., 1997). Hierzu wurden Reaktionsansätze von SrtA_{ΔN59} und Substrat zu unterschiedlichen Zeiten mit Avidin versetzt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten vermessen. Aus diesen Messungen ging hervor, dass in mit Avidin versetzten Reaktionsansätzen keine Substratspaltung mehr stattfindet und dass SrtA_{ΔN59} über mindestens 23 h unter den gegebenen Assaybedingungen aktiv ist (die Daten werden nicht aufgeführt). Die Unterbindung der SrtA_{ΔN59}-Aktivität durch Avidin beruht wahrscheinlich darauf, dass an Avidin gebundenes Substrat sterisch nicht zugänglich für SrtA_{ΔN59} ist. Insgesamt ging aus den beschriebenen Voruntersuchungen hervor, dass die Bedingungen 360 nM Substrat, 500 nM SrtA_{ΔN59}, eine Inkubation von 17 h bei 37°C und ein Abstoppen der Reaktion mit 2 μM tetramerem Avidin einen sensitiven SrtA-Inhibitionsassay versprechen. Da der K_m -Wert des Substrates die IC₅₀-Werte eines Inhibitors in einem gegebenen Assay beeinflusst, wurden die kinetischen Parameter des neuen SrtA-Substrates LPETGKG_{5FAM,Biotin} bezüglich SrtA_{ΔN59} ermittelt. Hierzu wurde mittels des entwickelten Aktivitätsassays die Umsatzgeschwindigkeit von verschiedenen Substratkonzentrationen durch SrtA_{ΔN59} bestimmt. Da hierfür das Substrat zu weniger als 20% umgesetzt sein sollte, waren die auszuwertenden resultierenden mP-Wert-Differenzen im Vergleich zum IC₅₀-Assay (ca. 80% Substratumsatz) gering, was sich in verhältnismäßig hohen statistischen Fehlern niederschlug. Da die SrtA ein zweites Substrat, hier Glycinamid, nutzt, sind die unter konstanten Glycinamidkonzentrationen ermittelten k_{cat} und K_m -Werte für das erste Substrat LPETGKG_{5FAM,Biotin} keine echten Konstanten. Sie würden sich mit einer Konzentrationsveränderung von Glycinamid ändern, weshalb sie als apparente Werte, $k_{cat,app.}$ und $K_{m,app.}$, bezeichnet werden müssen. Durch die Verwendung einer Konzentration des zweiten Substrates, die deutlich über dessen K_m -Wert liegt, können die $k_{cat,app.}$ - und $K_{m,app.}$ -Werte für verschiedene erste Substrate eines Enzyms jedoch miteinander verglichen werden. Für das hier untersuchte neue SrtA-Substrat LPETGKG_{5FAM,Biotin} wurde für $k_{cat,app.}$ ein Wert von 0,0037 ± 0,0017 s⁻¹ und für $K_{m,app.}$ ein Wert von 82 ± 51 μM ermittelt, wodurch sich eine katalytische Effizienz von 13-184 s⁻¹*M⁻¹ ergibt. Vergleicht man dies mit den kinetischen Parametern des am häufigsten für SrtA-Aktivitätstests genutzten Substrates Dabcyl-QALPETGEE-Edans (Tabelle 10, Seite 77) von $k_{cat,app.} = 0,000023$ s⁻¹, $K_{m,app.} = 16,5$ μM und $k_{cat,app.} / K_{m,app.} = 1,4$ (Ton-That et al., 2004), so wird das hier verwendete Substrat 10 – 130 x effektiver umgesetzt. Der für die benötigte Inhibitorkonzentration zum Erreichen des IC₅₀-wertes ausschlaggebende $K_{m,app.}$ -Wert des hier verwendeten Substrates ist jedoch etwas höher als der von Dabcyl-QALPETGEE-Edans, weshalb das Substrat LPETGKG_{5FAM,Biotin} geeignet ist

Tabelle 10: Übersicht über bisherige SrtA-Inhibitorstudien. Es ist jeweils der potenteste Inhibitor der jeweiligen Studie aufgeführt. Grau unterlegt sind die IC₅₀-Werte, die aufgrund gleicher Assaybedingungen direkt miteinander vergleichbar sind.

Referenz	Substanz	Herkunft	IC ₅₀ -Assay				MIC <i>S. aureus</i>	<i>in vivo</i> ^{*3} -Test
			IC ₅₀	Substrat ^{*1}	Konz. ^{*2}	IC ₅₀ pHMB		
Scott et al., 2002	Substratanalogon	synthetisch	- ^{*4}	1	10 µM E, 50 µM S	-	-	
Kim et al., 2003, Oh et al., 2006	β-Sisterd-3-O-glucopyranosid	Pflanze	32 µM	1	10 µM E, 1,3 µM S	147 µM	690 µM a	
Frankel et al., 2004	Vinylsulfone	synthetisch	190 µM	2	1 µM E, 230 µM S	-	75 µg/ml a	
Kim et al., 2004, Oh et al., 2006	Berberinchlorid	Pflanze	24 µM	1	10 µM E, 1,3 µM S	147 µM	276 µM a	
Kruger et al., 2004a	Transition state Analogon	synthetisch	10 mM	2	0,1 µM E, 1 mM S	-	-	
Oh et al., 2004, 2006, 2010	DMMA	HTS+SAR	9,2 µM	1	10 µM E, 1,3 µM S	147 µM	> 680 µM a + c	
Park et al., 2005	Curcumin	Pflanze	37 µM	1	10 µM E, 1,3 µM S	147 µM	> 540 µM a	
Kang et al., 2006	Flavonol	HTS	37 µM	1	5 µM E, 10 µM S	-	> 300 µM b	
Jang et al., 2007	Aptamin	Schwamm	17 µM	1	10 µM E, 1,3 µM S	-	232 µM a	
Chang et al., 2008	Dihydroxystyrene	Schwamm	55 µM	1	10 µM E, 1,3 µM S	147 µM	-	
Chenna et al., 2008, 2010	Virtueller Screen + SAR		58 µM	1	5 µM E, 20 µM S	-	-	
Suree et al., 2009	HTS + SAR		0,2 µM	2	0,4 µM E, 15 µM S	-	-	
Jeon et al., 2010	Discorhabdin	Schwamm	6,5 µM	1	10 µM E, 1,3 µM S	111 µM	> 290 µM -	
Lee et al., 2010	HTS + SAR		25 µM	1	10 µM E, 1,3 µM S	142 µM	> 200 µM -	
Oh et al., 2011	Kuranol	Pflanze	108 µM	1	keine Angaben	130 µM	219 µM -	

*1 1 = Dabzyl-QALPETGEE-Edans, 2 = Abz-LPETG-Dap(Dnp)

*2 E = SrtA, S = Substrat

*3 a = Fibronektinbindung, b = Fibrinogencolumnping, c = Maus-Infektionsmodell

*4 in dieser Studie wurde kein IC₅₀-Wert, aber ein K_i-Wert von 210 nM bestimmt.

für einen sensitiven SrtA-Inhibitionsassay. Die Funktionalität der ausgewählten Assaybedingungen wurde an pHMB, einem kommerziell erhältlichen SrtA-Inhibitor (Ton-That et al., 1999) getestet. Mit zunehmender pHMB-Konzentration nahm die nach Abstoppen mit Avidin gemessene Fluoreszenzpolarisation erwartungsgemäß ab und der Kurvenverlauf bei halblogarithmischer Auftragung der mP-Werte gegen die pHMB-Konzentration zeigte einen sigmoidalen Verlauf. Der Assay eignet sich also zur Ermittlung von IC_{50} -Werten für SrtA-Inhibitoren. Überraschender Weise war der hier ermittelte IC_{50} -Wert für pHMB mit $840 \mu M$ achtmal höher als der IC_{50} -Wert von pHMB aus der Literatur, bei dessen Ermittlung eine 20x höhere SrtA- und eine 3,6 x höhere Substratkonzentration (Dabcyl-QALPETGEE-Edans) eingesetzt wurde (Referenzen und Übersicht siehe Tabelle 10, Seite 77). Da der K_m -Wert des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Substrats nicht geringer ist als der von Dabcyl-QALPETGEE-Edans, scheinen sich pHMB und die genutzten Substrate nicht kompetitiv zueinander zu verhalten. Die SrtA-Bindungstasche bietet möglicher Weise genug Platz, um gleichzeitig ein Binden des Substrates und ein Auftreten von pHMB als reversiblen Thiolblocker am Cys¹⁸⁴ zu ermöglichen. Sofern pHMB eine höhere Affinität zum Substrat:SrtA $_{\Delta N59}$ -Komplex als zu freier SrtA $_{\Delta N59}$ zeigt, wäre die Folge davon der hier beobachtete Effekt, dass eine Erniedrigung des Verhältnisses $[S]/K_m$ zu einer Erhöhung des IC_{50} -Wertes führt. Andere Beispiele für den Einfluss der Substratkonzentration auf den pHMB- IC_{50} -Wert liegen nicht vor, da in den Studien, in denen andere Substratkonzentrationen oder Substrate für die Bestimmung von SrtA-Inhibitor- IC_{50} -Werten genutzt wurden, pHMB nicht als Kontrolle vermessen wurde (Tabelle 10, Seite 77). Es wird davon ausgegangen, dass sich die zu untersuchenden unmarkierten Peptidinhibitoren im Gegensatz zu pHMB kompetitiv zum Substrat LPETGKG_{5FAM,Biotin} verhalten, und daher der hier entwickelte SrtA-Inhibitionsassay für diese Inhibitoren sensitiver ist als die bereits aus der Literatur bekannten Aktivitätsassays.

2.4.4.2 ermittelte IC_{50} -Werte

Die für die unmarkierten Peptidinhibitoren durchgeführten IC_{50} -Messungen zeigten bei halblogarithmischer Auftragung der mP-Werte gegen die Inhibitorkonzentration einen sigmoidalen Kurvenverlauf. Das P_{min} -Plateau konnte stets gut charakterisiert werden, wohingegen das P_{max} -Plateau nur knapp erreicht werden konnte. Da der statistische Fehler der mP-Werte jedoch verhältnismäßig gering ist, kann davon ausgegangen werden, dass die IC_{50} Werte dennoch korrekt bestimmt werden konnten. Die weniger sensitiven aus der Literatur bekannten SrtA-Aktivitätsassays hätten nicht ausgereicht, um die IC_{50} -Werte der unmarkierten Peptide / Fusionsproteine zu ermitteln. Die niedrigsten IC_{50} -Werte zeigen

MBP-P1_{nativ} und MBP-P1_{Kontrolle} mit 409 nM und 714 nM. Diese IC₅₀-Werte liegen im Bereich der für den Assay verwendeten SrtA_{ΔN59}- und Substratkonzentration und entsprechen den Erwartungen für einen Inhibitor mit einem K_d-Wert von ca. 10 nM. Die übrigen unmarkierten Peptidinhibitoren zeigen 5 – 10 x höhere IC₅₀-Werte von 1,8 μM bis 4,5 μM. Tendenziell folgen die IC₅₀-Differenzen den K_d-Wert Differenzen mit Ausnahme von P1_{unmarkiert} (linear), das zwar den gleichen K_d-Wert wie MBP-P1_{nativ} und MBP-P1_{Kontrolle} zeigt, aber einen 5 – 10 x höheren IC₅₀-Wert aufweist. Im Gegensatz zu der linearen P1-Variante verbessert das fusionierte MBP bei der zyklischen P1-Variante anscheinend nicht das Inhibitionsvermögen. Aufgrund der zu erwartenden Messungenauigkeit und möglicher Fehler der Peptidkonzentrations-bestimmung sollten diese Differenzen der IC₅₀-Werte jedoch nicht überbewertet werden. Es kann festgehalten werden, dass alle unmarkierten Peptidinhibitoren bezüglich SrtA_{ΔN59} einen IC₅₀-Wert im einstelligen mikromolaren Bereich aufweisen. Ein direkter Vergleich der hier ermittelten IC₅₀-Werte mit Literaturwerten für andere SrtA-Inhibitoren ist aufgrund der unterschiedlichen Assaybedingungen nicht möglich. Berücksichtigt man, dass die IC₅₀-Werte aus der Literatur für SrtA größten Teils zwischen 9 μM und 190 μM liegen, und unter Verwendung einer 20 x höheren SrtA- und einer 4 x höheren Substratkonzentration ermittelt wurden (Tabelle 10, Seite 77), so lässt sich vermuten, dass die hier untersuchten Peptide / Fusionsproteine ein mit den bisher publizierten SrtA-Inhibitoren vergleichbares Inhibitionsvermögen besitzen.

2.4.5 *In vivo* Bindung der Peptidinhibitoren an SrtA

Als nächster Schritt wurde das *in vivo*-Bindungsvermögen der hier untersuchten Peptidsequenzen bezüglich SrtA untersucht. Hierzu wurde die Bindung fluoreszenzmarkierter Peptidsequenzen an *S. aureus*-Zellen über Fluoreszenzmessungen verfolgt. Zunächst wurde als Vortest die geeignetste Wachstumsphase einer *S. aureus* Kultur zur Messung der Inhibitorbindung ermittelt. Es zeigte sich, dass die frühe exponentielle Phase am geeignetsten ist. Für den Vortest wurden 7 μM GFP-P1-Fusionsproteine dem Wachstumsmedium zugesetzt und zu verschiedenen Zeiten die Zellpellet-Grünfärbung visuell abgeschätzt. Eine Quantifizierung konnte unter diesen Bedingungen nicht durchgeführt werden. Die direkte Messung der GFP-Fluoreszenz der *S. aureus*-Zellen war aufgrund der relativ hohen Hintergrundfluoreszenz der Bakterien nicht möglich. Daher wurde das Binden der fluoreszenzmarkierten Peptidsequenzen an die *S. aureus*-Zellen indirekt über die Abnahme der Fluoreszenz des Kulturüberstandes während des Zellwachstums gemessen. Es wurde eine GFP-Fusionsprotein-Konzentration von 50 nM gewählt, da ermittelt wurde, dass die Fluoreszenzintensität nur im Bereich von ca. 6 - 100 nM linear zur

Fluorophorkonzentration ist. Eine solche Methodik wurde in der Literatur bereits für die Messung der *in vivo* Bindung eines Peptides an ein *S. aureus*-Oberflächenprotein verwendet (Gründlings und Schneewind, 2006). Da die Bindungsmessungen anhand von unabhängigen Kulturen ausgeführt werden sollten, mussten zuerst Bedingungen gefunden werden, bei welchen sich unabhängige Kulturen in Bezug auf ihr Wachstum möglichst gleich verhalten. Wie aus den Vortests hervorging, ist während verschiedener Wachstumsphasen die Affinität der zu untersuchenden Peptidsequenzen zu *S. aureus*-Zellen unterschiedlich. Die *in vivo*-Bindungsmessungen konnten in dieser Form leider nicht auf ein Multi-Well-Platten-Format optimiert werden. Der kleinste Kulturmaßstab der ein stabiles, vergleichbares Wachstum zuließ, war ein Kulturvolumen von 40 ml in 250 ml Erlenmeyerkolben. Es zeigte sich, dass P2_{5FAM} die besten Bindungseigenschaften an die *S. aureus*-Zellen aufwies. Mit zunehmender Zelldichte während des Kulturwachstums nahm die Fluoreszenz des Kulturüberstandes für P2_{5FAM} am stärksten ab. Exemplarisch für P2_{5FAM} wurde festgestellt, dass es sich um eine sequenzspezifische Bindung an die *S. aureus*-Zellen handelt. Hierzu wurde ein Peptid P2_{scrambled} entworfen, das dieselben Aminosäuren wie P2, jedoch in veränderter Reihenfolge, enthält. Dieses Peptid hat keine nennenswerte Affinität zu SrtA Δ N59, so dass sich unter Anwendung der Methode aus 2.3.3.1 kein *in vitro* K_d -Wert bestimmen ließ (die Daten werden nicht aufgeführt). P2_{5FAM,scrambled} zeigt eine signifikant geringere Bindung an die *S. aureus* Zellen als P2_{5FAM}. Des Weiteren lässt sich P2_{5FAM} wesentlich besser durch P2_{unmarkiert}, als durch P2_{unmarkiert,scrambled} aus seiner Bindung an die *S. aureus* Zellen verdrängen. Eine Bindung des GFP-P1-Fusionsproteins an *S. aureus*-Zellen konnte bei einer Konzentration von 50 nM nicht gemessen werden. Dies liegt vermutlich an der Größe des Moleküls (29 kDa), die die Diffusion durch die Zellwand zur membranverankerten SrtA verlangsamt. Es wurde mittels Gelfiltration bestätigt, dass das GFP-P1-Fusionsprotein *in vitro* an SrtA Δ N59 bindet. Eine GFP-P1-Fusionsproteinkonzentration von 7 μ M, wie sie im Vortest eingesetzt wurde, führt offensichtlich trotz der langsamen Diffusion zu einem sichtbaren Anteil von an SrtA-gebundenem GFP-P1-Fusionsprotein. Die Hypothese der molmassenabhängig verlangsamt Diffusion wird dadurch unterstützt, dass die Bindung der nur ca. 3 kDa großen fluoresceinmarkierten Peptide an die *S. aureus*-Zellen gemessen werden konnte. Für zukünftige Untersuchungen könnten die *in vivo* Bindungsmessungen optimiert werden. Die Fluoreszenzintensitätsabnahme der Kulturüberstände in Abhängigkeit der OD₆₀₀ zeigt keinen exakt linearen Verlauf, sondern offensichtlich ist die Bindungsaffinität während der Latenz-Phase höher als während der exponentiellen Wachstumsphase. Dies könnte mit den Expressionsverhältnissen von SrtA und ihren Substraten, den LPETG-Motiv-besitzenden Oberflächenproteinen, zusammenhängen. So wurde für *S. aureus* gezeigt, dass SrtA relativ gleichmäßig während der Wachstumsphasen exprimiert wird, wohingegen die ClfA-

Expression stark mit der Zelldichte zunimmt (Josefsson et al., 2008). Bei geringer Zelldichte ist SrtA also schon vorhanden, während die SrtA-Substrate, sofern sie sich ähnlich wie ClfA verhalten, erst später ihre höchste Konzentration erreichen. Somit könnten die Peptide in frühen Wachstumsphasen leichter an SrtA binden, da die zu verdrängenden Substrate dann in geringerer Konzentration vorliegen. Zur Optimierung könnten z.B. zahlreichere Proben in kürzeren Zeitabständen während der Latenz-Phase genommen werden, da die Inhibitorbindung an SrtA dann aufgrund einer geringeren Konzentration natürlicher Substrate erleichtert sein sollte. Eine weitere Optimierungsoption ist die Variation der Inhibitorkonzentration, um das Verhältnis des statistischen Fehlers zur Differenz zwischen den gemessenen F_{\max} - und F_{\min} -Werten zu verringern. Von einer Optimierung durch die Verwendung aufkonzentrierter Zellen sollte abgesehen werden. Der Versuch die Bindungsaffinität von gewaschenen und aufkonzentrierten *S. aureus*-Zellen zu den Peptidsequenzen in kleinem Volumenmaßstab zu messen, scheiterte. Während der Inkubationszeit aggregierten, sedimentierten oder wuchsen die Zellen in unterschiedlichem Maße und machten eine Datenauswertung unmöglich.

2.4.6 Versuche zur *in vivo* Inhibition von SrtA durch P2_{unmarkiert}

Das Peptid P2_{unmarkiert} wurde für einen *in vivo* Inhibitionstest eingesetzt. P2_{5FAM} zeigte die deutlichste Bindung an *S. aureus*-Zellen und P2_{unmarkiert} wies unter den Peptiden den geringsten *in vitro* IC₅₀-Wert auf. Da die MBP-P1-Fusionsproteine ein 50% größeres Molekulargewicht als die GFP-P1-Fusionsproteine aufweisen, und folglich noch langsamer durch die bakterielle Zellwand diffundieren, wurden sie keinen *in vivo* Inhibitionstest unterzogen. Aufgrund der begrenzten Löslichkeit von P2_{5FAM} wurden *S. aureus*-Kulturen mit etwa 30 μM P2_{unmarkiert} versetzt. Dies resultierte in einer DMSO-Konzentration im Kulturmedium von 1% (v/v), welche *S. aureus*-Kulturen noch nicht in ihrem Wachstum beeinträchtigen. Als Kontrollen wurden P2_{unmarkiert,scrambled} und 1% (v/v) DMSO eingesetzt. Um die *in vivo* Aktivität der SrtA in den verschiedenen Kulturen zu bestimmen, wurde der Clumpingtiter der Kulturen bestimmt. Hierbei wird überprüft, wie hoch das Vermögen der *S. aureus*-Zellen ist mit Fibrinogen in Lösung Aggregate zu bilden. Der Clumpintiter ist definiert als die geringste Fibrinogenkonzentration, die zur sichtbaren Aggregatbildung bei einer bestimmten *S. aureus*-Zellkonzentration führt. Fibrinogen wird von den *S. aureus*-Oberflächenproteinen ClfA und ClfB gebunden, welche von SrtA an der Zelloberfläche verankert werden (McDevitt et al., 1994, Ni eidhin et al., 1998). Durch eine Inhibition der SrtA sollte also der Clumpingtiter erhöht werden. Eine Konzentration von etwa 30 μM P2_{unmarkiert} als Medienzusatz veränderte den Clumpingtiter im Vergleich zu den Kontrollen nicht.

P2_{unmarkiert} zeigt in dieser Konzentration keine messbare *in vivo*-Inhibition der SrtA. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die eingesetzte P2_{unmarkiert}-Konzentration nur ca. 15 x höher ist, als der *in vitro*-IC₅₀-Wert von P2_{unmarkiert} bezüglich SrtA_{ΔN59}. Bedenkt man, dass der K_m -Wert eines Substrat / Enzym-Paares evolutionsbedingt meist die physiologischen Konzentration des Substrates widerspiegelt (Copeland, 2005), so lag die SrtA-Substratkonzentration im *in vitro*-IC₅₀-Assay wahrscheinlich weit unter den physiologischen Substratkonzentrationen (also den Konzentrationen der LPXTG-Motiv-besitzenden Oberflächenprotein-Vorläufermolekülen). Die lokalen SrtA-Substratkonzentrationen sind *in vivo* auch dadurch erhöht, dass sich SrtA und ihre Substrate auf der zweidimensionalen Membranoberfläche bewegen, während P2_{unmarkiert} SrtA im dreidimensionalen Raum treffen muss. Der *in vivo* IC₅₀-Wert von P2_{unmarkiert} liegt also vermutlich wesentlich höher als der *in vitro*-IC₅₀-Wert, da P2_{unmarkiert} *in vivo* gegen eine wesentlich höhere SrtA-Substrate-Konzentration konkurrieren muss, als im hier genutzten *in vitro* IC₅₀-Assay. Oft liegt die für einen messbaren Inhibitionseffekt nötige Inhibitorkonzentration *in vivo* um bis zu mehrere Größenordnungen höher als *in vitro* (Copeland, 2005). Bei Inhibitoren, die ein Ziel innerhalb der Zelle angreifen, kommt diese Differenz nicht nur durch auf Sensitivität getrimmte *in vitro* IC₅₀-Assays, sondern auch durch das begrenzte Vermögen des Inhibitors, in das Zellinnere zu gelangen, zu Stande. Da ein SrtA-Inhibitor nicht ins Zellinnere gelangen muss, könnte für SrtA-Inhibitoren die *in vivo* / *in vitro*-Wirkungsdifferenz verhältnismäßig geringer ausfallen. Das Auftreten einer Resistenz gegen die hier charakterisierten LPXTG-abgewandelten SrtA-Inhibitoren wäre sehr unwahrscheinlich. Die SrtA-Bindungstasche müsste hierzu im Einklang mit ihren 21 Substratproteinen mutieren. Der langsam reversible Inhibitionsmechanismus der Peptidinhibitoren verspräche eine lange Wirkungsdauer und senkte die Applikationsmenge. Eine Weiterentwicklung der hier charakterisierten Peptidinhibitoren wäre womöglich lohnenswert.

Um in zukünftigen Studien für die P2-Sequenz *in vivo* eine SrtA-Inhibition zu messen, müssten deutlich höhere Konzentrationen als ca. 30 μ M den *S. aureus*-Kulturen zugesetzt werden. Hierzu müssten N- und C-terminale Modifikationen der P2-Sequenz vorgenommen werden, um eine erhebliche Verbesserung der Löslichkeit zu erzielen. Da gezeigt wurde, dass die Bindungsaffinitäten der Peptidinhibitoren unabhängig von diversen C- und N-terminalen Modifikationen sind, sollte ein gut löslicher SrtA-Peptid-Inhibitor realisierbar sein. Es könnte z. B. ein TRX-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt werden. Dieses wäre vermutlich gut löslich, hätte aber nur ein Molekulargewicht von ca. 14 kDa und würde die Zellwand möglicher Weise in effektivem Maße durchdringen können. Oder die Löslichkeit von P2 könnte durch das C- und N-terminale Anfügen polarer Aminosäuren erhöht werden. Eine andere Optimierung wäre es, den *in vivo* Inhibitionstest für die

Latenzphase zu optimieren. Da in dieser Phase, wie unter 2.3.8 gezeigt wurde, P2 *in vivo* effizienter an SrtA binden kann, wäre eine Inhibition der SrtA während der Latenzphase wahrscheinlich bei geringeren Inhibitorkonzentrationen erkennbar als in späteren Wachstumsphasen. Das für die Ausprägung des Clumpingtiters verantwortliche SrtA-Substrat, ClfA, gegen welches P2 kompetieren muss, wird während der Latenzphase in erheblich geringerem Maße exprimiert als in späteren Wachstumsphasen (Josefsson et al., 2008). Erschwert würde diese Optimierung allerdings dadurch, dass ein Auslesen der entsprechenden Oberflächenproteinaktivitäten für unabhängige Kulturen nur dann mit geringem statistischen Fehler möglich ist, wenn sich die Oberflächenproteindichte auf einem stabilen Niveau eingependelt hat. Der hier ermittelte Clumpingtiter ließ sich z.B. nur in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase mit geringem Fehler bestimmen. Zu Beginn und zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase war der Fehler des ermittelten Clumpingtiters derart hoch, dass eine eindeutige Auswertung nicht möglich ist. Diese Beobachtung befindet sich im Einklang mit dem Expressionsverlauf von ClfA. Zu Beginn des *S. aureus*-Wachstums steigt die ClfA-Expression stark an, um gegen Ende des Wachstums wieder abzufallen (Josefsson et al., 2008).

Im Allgemeinen wäre es für *in vivo*-Tests von SrtA-Inhibitoren sicherlich hilfreich, die verwendeten Assays für die Latenz-Phase zu optimieren. Ein weiterer Mangel der für SrtA in Kulturmedien durchgeführten *in vivo*-Inhibitortests ist, dass sie wahrscheinlich höhere IC_{50} -Werte aufweisen, als Infektionsmodelle. Die Bedingungen in Kulturmedium sind nicht vergleichbar mit den Bedingungen in einem Infektionsmodell. In einem Versuchstier benötigen *S. aureus*-Zellen dringend ihre von SrtA an der Zelloberfläche verankerten Oberflächenproteine. Diese vermitteln die Eisenaufnahme, vermeiden durch Anheftung an Epithelien den Transport in einen Lymphknoten und bieten Schutz vor dem Immunsystem des Versuchstieres. Wird SrtA in einem Infektionsmodell in der anfänglichen Phase geringer bakterieller Zelldichte auch nur geringfügig inhibiert, so gibt dies dem Wirtsimmunsystem womöglich den entscheidenden Vorteil, um die Infektion deutlich einzudämmen. Die Wirkung eines SrtA-Inhibitors und des Immunsystem potenzieren sich möglicher Weise in einem Infektionsmodell. In einem *in vivo*-Test in Kulturmedium hingegen benötigen *S. aureus*-Zellen ihre Virulenzfaktoren nicht. Sie können trotz SrtA-Inhibition ungehindert weiterwachsen, bis die Konzentration der gegen den Inhibitor kompetierenden SrtA-Substrate derart hoch ist, dass die eingesetzte SrtA-Inhibitorkonzentration keinen merklichen Einfluss mehr auf die Dichte der SrtA-verankerten Oberflächenproteine hat. Diese Hypothese wird unterstützt von den *in vitro*-, *in vivo*- und Infektionsmodell-Untersuchungen des SrtA-Inhibitors DMMA (Oh et al., 2004, 2006, 2010). DMMA zeigt einen *in vitro*- IC_{50} -Wert bezüglich SrtA von 2,7 $\mu\text{g} / \text{ml}$, wobei eine 13 x unterhalb des K_m -Wertes liegende Substratkonzentration eingesetzt wurde.

Eine *in vivo*-Bestimmung der SrtA-Aktivität in Kulturmedium zeigte, dass 10 µg / ml DMMA notwendig sind, um die SrtA-Aktivität zu unterbinden, wohingegen im Infektionsmodell bereits die geringste getestete DMMA-Konzentration von 4 µg / ml das Infektionsausbreitungsvermögen von Wildtyp *S. aureus* auf das von Sortase-defizienten knock-out Mutanten herabsenkte. DMMA ist der einzige SrtA-Inhibitor, der bisher in einem Infektionsmodell getestet wurde. Dies ist bemerkenswert, da 7 SrtA-Inhibitoren, unter Verwendung des für DMMA genutzten IC₅₀-Assays, IC₅₀-Werte in der gleichen Größenordnung wie DMMA zeigen (Tabelle 10, Seite 77). Die, nicht immer richtige, Annahme, der IC₅₀-Wert eines SrtA-Inhibitors läge im Infektionsmodell höher als im kulturmediumbasierten *in vivo*-Test, führt womöglich zur Unterlassung der sehr aufwendigen Infektionsmodell-Tests entsprechender SrtA-Inhibitoren.

1.4.7 Fazit

In der vorliegenden Arbeit konnten Methoden zur Charakterisierung von Peptid-SrtA-Inhibitoren entwickelt werden (K_d -Werte, K_{off} , ΔH , $-T\Delta S$, N, IC₅₀-Werte und *in vivo*-Bindung an *S. aureus*). Die untersuchten Peptidsequenzen entstammen einer erstmaligen Anwendung eines mRNA Displays gegen SrtA. Es wurden dadurch ähnlich potente SrtA-Inhibitoren gefunden, als durch die zuvor eingesetzten Screeningmethoden (Screening von Naturstoff- und „small molecule“-Bibliotheken, molecular docking, SAR-Studien). Die IC₅₀-Werte der hier untersuchten Peptidsequenzen zeigten sich sehr robust gegenüber Variationen der C- und N-terminalen Peptid-Modifikationen. Dies ist im Hinblick auf z.B. Löslichkeitsoptimierungen von Vorteil. Das vorhanden Sein oder Fehlen einer Zyklisierung der Peptide war für das *in vitro* Bindungsgeschehen an SrtA ohne jegliche Bedeutung. Es steht jedoch die Untersuchung aus, ob eine Zyklisierung die Stabilität der Inhibitoren unter *in vivo*-Bedingungen erhöht. Eine *in vivo*-Inhibition der SrtA durch die Peptidinhibitoren konnte nicht gezeigt werden, da die schlechte Löslichkeit der Inhibitoren nur den Einsatz relativ geringer Inhibitor-Konzentrationen erlaubte. Ebenfalls aufgrund der schlechten Inhibitor-Löslichkeit konnten ihre *in vitro*-IC₅₀-Werte nur mittels der Neuentwicklung eines verhältnismäßig sensitiven SrtA-Aktivitätsassays ermittelt werden. Für die Bestimmung von ΔH , $-T\Delta S$ und N konnte das Löslichkeitsproblem umgangen werden, indem die Peptidsequenzen als MBP-Fusionsproteine exprimiert wurden. Für einen *in vivo* Inhibitionstest konnten die Fusionsproteine jedoch nicht genutzt werden, da sie aufgrund ihrer Molekülgröße die grampositive Zellwand nur schlecht passieren können. Die Herstellung löslicherer Peptidinhibitoren hätte die Messung einer *in vivo* Inhibition vermutlich ermöglicht. Die hier entwickelten Methoden könnten hilfreich sein für zukünftige SrtA-

Inhibitor-Studien. Für schlecht lösliche oder aufwendig herzustellende SrtA-Inhibitoren könnte der neuentwickelte sensitive IC_{50} -Assay genutzt werden. Der hier verwendete K_d -Assay könnte auf andere SrtA-Inhibitoren übertragen werden, ebenso wie der Assay zur Einschätzung der *in vivo*-Bindung. Bisher wurden solche Messungen für SrtA-Inhibitoren nicht verwendet und die Inhibitor-Charakterisierungen beschränkten sich weitestgehend auf IC_{50} -Messungen. Aus den hier durchgeführten Bindungsstudien der Peptidinhibitoren und *S. aureus*-Zellen geht der Hinweis hervor, dass die Zellen in der Latenzphase eine höhere Affinität zu den Peptidinhibitoren aufweisen als in der frühen exponentiellen Wachstumsphase. Dies beruht wahrscheinlich darauf, dass die mit den Inhibitoren konkurrierenden SrtA-Substrate in der Latenzphase noch nicht in vollem Maße exprimiert werden (Josefsson et al., 2008). Zusammen mit der neuesten Studie zum SrtA-Inhibitor DMMA (Oh et al., 2010) welcher im Maus-Infektionsmodell eine höhere Potenz aufwies als in Tests an *S. aureus*-Kulturen in Kulturmedium, legt dies die Vermutung nahe, dass *in vivo*-Tests in Wachstumsmedien keine geeigneten Vortests für Infektionsmodell-Tests sein könnten. Im Infektionsmodell verstärkt sich eine SrtA-Inhibitorwirkung in der kritischen frühen Wachstumsphase vermutlich synergistisch mit der Immunsystemwirkung, während im Kulturmedium, in welchem *S. aureus* keine Virulenzfaktoren benötigt, eine nur frühe SrtA-Inhibition vermutlich wenig Einfluss auf spätere Zelloberflächendichten von SrtA-Substraten hat. Da Infektionsmodell-Tests sehr aufwendig sind, wäre es wahrscheinlich vorteilhaft, *in vivo* Tests an *S. aureus*-Kulturen in Wachstumsmedium für die Latenzphase zu optimieren, statt wie bisher üblich, Kulturen einer OD_{600} von über 0,5 (Frankel et al., 2004) zu verwenden. Insgesamt sind die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse ein weiteres Indiz dafür, dass nicht neue Screeningmethoden zum Auffinden wirkungsvoller SrtA-Inhibitoren führen, sondern dass es erfolgsversprechender ist, die bereits gefundenen Leitstrukturen zu optimieren, bzw. Infektionsmodell-Tests zu unterziehen. So wurden mit den nacheinander verwendeten unterschiedlichen Screens, wie auch mit dem hier zugrunde liegenden mRNA Display, jeweils keine Substanzen mit bedeutend niedrigeren IC_{50} -Werten als die der vorher bekannten Substanzen gefunden. SAR-Studien an einer 2004 publizierten Leitstruktur mit einem IC_{50} -Wert von nur 231 μ M führten jedoch zu einem SrtA-Inhibitor (DMMA) mit einem IC_{50} -Wert von 9 μ M (Oh et al., 2004). Dieser liegt zwar nur um weniger als eine Größenordnung unter den IC_{50} -Werten der meisten übrigen SrtA-Inhibitoren, aber im Maus-Infektionsmodell entfaltete DMMA eine beindruckende Wirkung (Oh et al., 2010). Möglicherweise wäre es sinnvoller, früher in den SrtA-Inhibitorentwicklungen Infektionsmodelle einzusetzen, statt nach IC_{50} -Werten im nanomolaren Bereich zu suchen.

3. Untersuchungen zur Ovothiol A-Biosynthese in *E. tasmaniensis*

3.1. Einleitung:

3.1.1. Ovothiol A:

Struktur und Funktion:

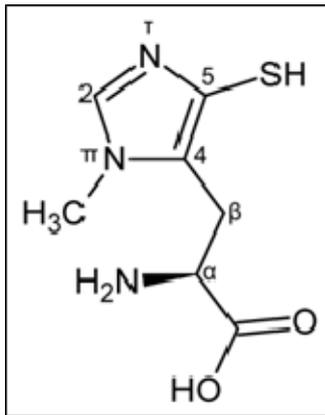


Abb. 45: Struktur von Ovothiol A

Die Familie der Ovothiole (π -N-methyl-5-thiohistidine) unterscheidet sich durch ihren Methylierungsgrad am α -N-Atom (A: $n=0$; B: $n=1$; C: $n=2$) (Holler et al., 1987, 1989) und dient unterschiedlichsten Organismen z.B. als Schutz vor oxidativem Stress. In Eiern mariner Echinodermen (Stachelhäuter) und Mollusken (Weichtiere) sind Ovothiole in millimolaren Konzentrationen vorhanden und sollen den Eiinhalt unmittelbar nach der Befruchtung vor den kurzzeitig von der Eihülle freigesetzten reaktiven Sauerstoffspezies schützen (Shapiro und Hopkins, 1991, Turner et al., 1987, 1988). Aufgrund der sehr sauren Thiolgruppe ($pK_a = 1,4$) zeigen Ovothiole die Eigenschaft eines Radikalfängers. Ein Radikal $X\cdot$ entzieht das Wasserstoffatom des Thiols und liegt anschließend als XH ohne Radikaleigenschaft vor. Je zwei der dabei entstehenden Ovothiolradikale neutralisieren sich zu einem über ein Disulfid verbrückten Dimer. Das Redoxpotential (OSH/OSSO) beträgt -90 mV (Holler und Hopkins, 1995, Weaver und Rabenstein 1995, Wunderlich und Glockshuber, 1993). So wird Wasserstoffperoxid von Ovothiol zu Wasser reduziert wobei Ovothiol selbst zum Disulfid oxidiert wird. Die Regenerierung erfolgt bei Seeigeln über Glutathion, welches ein Redoxpotential (GSH/GSSG) von -240 mV aufweist und dessen oxidierte Disulfidform anschließend von der Glutathionreduktase wieder reduziert wird (Shapiro und Hopkins, 1991, Saphiro und Turner, 1988).

Relevanz als Wirkstoffziel:

Die Entdeckung von Ovothiol A (Abb. 45) in Protozoen (Urtiere) der Unterordnung Tripanosomatina (Spies und Steenkamp, 1994, Steenkamp und Spies, 1994, Weldrick et al., 1999) rückte Ovothiol A ins Blickfeld der Medikamentenentwicklung. Trypanosomatina leben ausschließlich parasitär, wobei meistens Insekten als einziger Wirt befallen werden. Die Gattungen *Leishmania* und *Trypanosoma* jedoch nutzen neben blutsaugenden Insekten

3. Einleitung und Zielsetzung

unter verschiedenen Vertebraten (Wirbeltiere) auch den Menschen als zweiten Wirt und verursachen dadurch schwerwiegende Krankheiten wie Schlafkrankheit (*Trypanosoma brucei*), Chagas-Krankheit (*Trypanosoma cruzi*) und Leishmaniose (*Leishmania*). In ihrem Insektenwirt leben die Erreger innerhalb des Verdauungstraktes ohne den Wirt zu schädigen, gelangen sie jedoch über einen Stich in den Blutstrom ihres Vertebratenwirts (diverse Wild- und Haustiere, Mensch), so kann dieser z.T. durch die Infektion sogar getötet werden. *Trypanosoma* (Abb. 46) vermehren sich z.B. im Herzmuskel und im zentralen Nervensystem. Während des monatelangen Krankheitsverlaufes kann sich der Insektenwirt über Blutmahlzeiten am Vertebratenwirt infizieren, so dass der Lebenszyklus des Parasiten trotz Wirtstötung aufrecht erhalten bleibt. Das infizierte Insekt bleibt lebenslänglich Überträger der Krankheit.

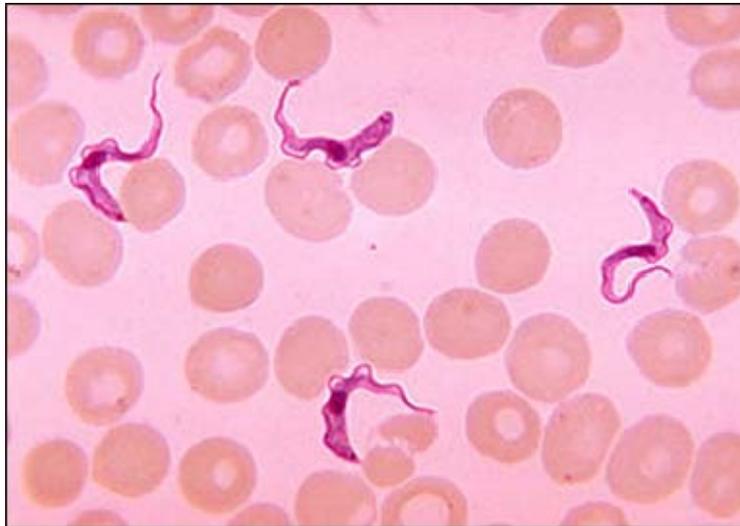


Abb. 46: *Trypanosoma spec.* im Blutausschlag eines infizierten Menschen (Public Health Image Library, #613)

Leishmania ist im Gegensatz zu *Trypanosoma* ein intrazellulärer Vertebratenparasit. Werden *Leishmania* im Blutstrom von Makrophagen phagozytiert, so entgehen sie nicht nur deren Abtötungsmaschinerie, sondern nutzen sie sogar gezielt als Habitat, in welchem sie sich vermehren und in den Insektenwirt geschleust werden. Stirbt eine Makrophage, so können die freigesetzten Protozoen weitere Makrophagen befallen. Die Leishmaniose ruft zwar in vielen Fällen nur Läsionen der Haut hervor, kann aber auch die inneren Organe betreffen und zum Tode führen. Gut verträgliche und dennoch wirkungsvolle Medikamente zur Behandlung von Trypanosomatina-Infektionen stehen noch aus (Kreier und Baker, 1987). Im Vergleich zu bakteriellen Infektionen sind Infektionen durch Protozoen schwieriger zu bekämpfen. Protozoen besitzen weder eine Zellwand noch (als Eukaryoten) ein prokaryotisches Ribosom als selektives Angriffsziel. Die Ovoidiol A-Biosynthese könnte ein neues selektives Angriffsziel gegen Trypanosomatina darstellen. Ovoidiol A (Abb. 45) wird

3. Einleitung und Zielsetzung

vom Menschen nicht produziert, liegt aber z.B. in *Leishmania* in Konzentrationen von über 1 mM vor. Es wird vermutet, das Ovothiol A Schutz vor oxidativem Stress während der Makrophageninvasion bietet. Während der Phagozytose setzen Makrophagen reaktive Sauerstoffspezies frei um die aufgenommenen Mikroorganismen abzutöten. Es wurde *in vitro* für Trypanosomatina gezeigt, dass die oxidierte Ovothiol A-Disulfidform nichtenzymatisch von Trypanothion reduziert wird, welches wiederum von der Trypanothionreduktase reduziert wird (Abb. 47). Es wird vermutet, dass dies auch *in vivo* für Trypanosomatina zutrifft (Ariyanayagam und Fairlamb, 2001).

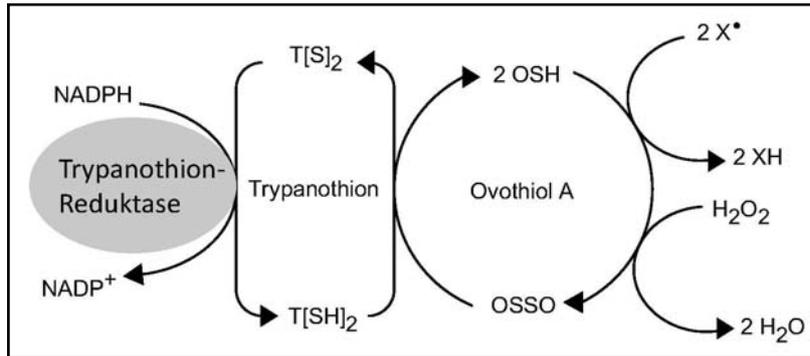


Abb. 47: Ovothiol A-Recycling in Trypanosomatina (Modifiziert nach Ariyanayagam und Fairlamb, 2001)

3.1.2. Biosynthese von Ovothiol A:

Für die ausschließlich Moskitos befallende Trypanosomatina Spezies *Crithidia fasciculata* konnte die Ovothiol A-Biosynthese aufgeklärt werden. Die Biosynthese von Ovothiol A (Abb. 48) startet mit der Fe²⁺ und O₂-abhängigen Umsetzung von L-Cystein und L-Histidin zu S-4-(histidyl)-Cystein-Sulfoxid durch eine Sulfoxidsynthase (OvoA). Im zweiten Schritt führt eine Pyridoxalphosphat (PLP)-abhängige Lyase (OvoB) eine β -Eliminierung am Sulfoxidsynthase-Produkt durch und bildet Mercaptohistidin. Dieses wird im dritten und letzten Schritt am π -N-Atom durch eine SAM-abhängige Methyltransferase (OvoA') methyliert, womit die Synthese von Ovothiol A abgeschlossen ist (Vogt et al., 2001).

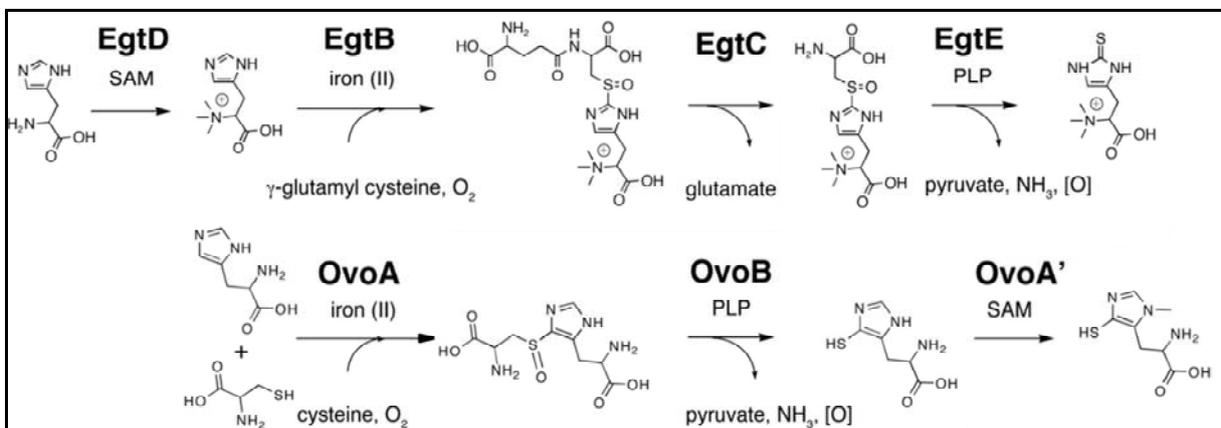


Abb. 48: Biosynthese von Ergothionein und Ovothiol A im Vergleich

3.1.3 Enzyme der Ovothiol A-Biosynthese:

3.1.3.1 Die Sulfoxidsynthase OvoA:

Die für die Ovothiol A-Biosynthese (Abb. 48) verantwortlichen Enzyme konnten anhand der Erkenntnisse über die Ergothionein-Biosynthese (Abb. 48) identifiziert werden. Hierbei wird α -N,N,N-Trimethylhistidin und γ -Glutamylcystein Fe^{2+} - und O_2 -abhängig von der Sulfoxidsynthase EgtB zu S-(β -Amino- β -carboxyethyl)-Ergothionein-Sulfoxid umgesetzt (Seebeck, 2010). Da dieser Schritt große Ähnlichkeit zum 1. Schritt der Ovothiol A-Biosynthese aufweist wurden Homologe zu *EgtB* in allen 5 Trypanosomagenomen als mögliche *OvoA*-Kandidaten gesucht. Die erhaltenen *EgtB*-Homologe aus allen 5 Trypanosomagenomen besitzen im Gegensatz zu denen aus Ergothionein-Produzenten zusätzlich eine C-terminale putative Methyltransferase. Mit Hilfe der Methyltransferase-Domäne als Unterscheidungskriterium zwischen putativen *OvoAs* und *EgtBs* wurden über 80 Homologe zu den putativen Trypanosoma-*OvoAs* v.a. in Proteobakterien gefunden. Das Genprodukt eines solchen Homologs aus *Erwinia tasmaniensis*, einem gramnegativen nichtpathogenen Bakterium, wurde *in vitro* eindeutig als OvoA identifiziert (Braunshausen und Seebeck, 2011; enthält Teile der vorliegenden Arbeit). Für die heterologe OvoA-Expression in *E. coli* wurde ein *Erwinia tasmaniensis*-Homolog gewählt, da in *E. coli* in der Regel bakterielle Gene effizienter als eukaryotische exprimiert werden. Das in allen gefundenen *EgtB*- und putativen *OvoA*-Homologen konservierte Motiv His-X₃-His-X-Glu deutet darauf hin, dass die Genprodukte EgtB und OvoA zur Gruppe der Mononuklearen Nicht-Häm-Eisen(II)-Enzyme gehören.

Mononukleare Nicht-Häm-Eisen(II)-Enzyme und die katalytische Triade aus zwei Histidinen und einem Carboxylat:

Zur Aktivierung von molekularem Sauerstoff nutzen Enzyme Metallatome als Cofaktoren in ihren aktiven Zentren. Diejenigen Enzyme, die hierzu ein Fe(II) -Ion nutzen, dieses jedoch nicht über einen Porphyrinliganden koordinieren, werden als Familie der Mononuklearen Nicht-Häm-Eisen(II)-Enzyme zusammengefasst. Mit Hilfe der innerhalb der vergangenen 15 Jahre aufgeklärten Kristallstrukturen konnte dieser Enzymfamilie eine katalytische Triade bestehend aus 2 Histidinen und einer Asparagin- oder Glutaminsäure als Motiv für die Bindung des Fe(II) -Ions zugewiesen werden. Das Fe(II) -Ion zeigt die Koordinationszahl 6 und die räumliche Konfiguration seiner Komplexes entspricht einem Oktaeder (Abb. 49). An

drei Koordinationsstellen einer Ebene des Oktaeders koordinieren die zwei Histidinliganden und der Asparagin- bzw. Glutaminsäureligand das Fe(II)-Ion und binden es so an das aktive Zentrum des Enzyms. Die drei Koordinationsstellen der gegenüberliegenden Ebene werden

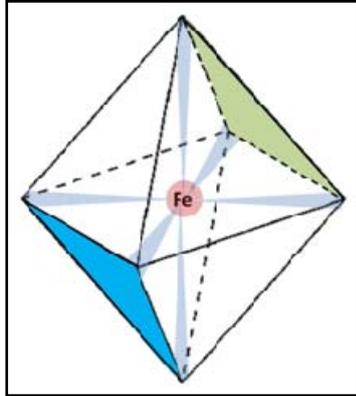


Abb. 49: Oktaeder-Konfiguration eines Fe(II)-Komplexes der Koordinationszahl 6

von H₂O-Molekülen besetzt, welche leicht verdrängt werden können. Zunächst bindet das Substrat an das Fe(II)-Ion und ermöglicht den Komplexangriff durch molekularen Sauerstoff. Es entsteht ein Superoxid-Fe(III)-Komplex. Durch die Übertragung eines Elektrons vom molekularen Sauerstoff auf den Komplex wird der molekulare Sauerstoff von seinem chemisch inerten Triplett-Grundzustand in einen reaktiveren Doublettzustand überführt. Es können anschließend höherwertigere Sauerstoff-Eisen-Komplexe entstehen. Welche Komplexstufe für die jeweilige Substratumsetzung verantwortlich ist, konnte bisher nur für Einzelfälle geklärt werden (reviewed in Koehntop et al., 2005., Mbughuni et al., 2010).

3.1.3.2 Die β -Lyase OvoB:

Im Genom von *E. tasmaniensis* existiert zwar kein Gen für ein PLP-abhängiges Enzym in Nachbarschaft zu *OvoA*, aber da in anderen *OvoA*-Produzenten ein PLP-abhängiges Enzym in direkter Nachbarschaft zu den *OvoA*-Homologen codiert wird, wurde über eine Homologiesuche zu diesen putativen *OvoBs* ETA_14770 aus *E. tasmaniensis* als mögliches Gen für die β -Lyase OvoB identifiziert (Seebeck, unpublizierte Daten).

PLP-abhängige Enzyme:

PLP-abhängige Enzyme katalysieren z.B. Umwandlungen von Aminosäuren. Am α -C-Atom können sie Transaminierungen, Decarboxylierungen, Desaminierungen, Racemisierungen und Aldolspaltungen katalysieren. Am β -C-Atom von Aminosäuren können PLP-abhängige Enzyme Austauschreaktionen oder wie im Falle der Ovothiol A-Synthese (siehe Abb. 48) eine β -Eliminierung durchführen. Alle von PLP-abhängigen Enzymen katalysierten Reaktionen beruhen auf folgendem Prinzip. Zunächst bilden die Aminogruppe der Aminosäure und die Carbonylgruppe des PLP eine Schiff-Base. Im zweiten Schritt übernimmt die protonierte PLP-Form die Funktion einer Elektronenfalle und stabilisiert dadurch negativ geladene Katalysezwischenprodukte. Das konjugierte π -Elektronensystem

des PLP ermöglicht eine Übertragung von Elektronen von negativ geladenen Katalysezwischenprodukten in den Pyridinring, in welchem sie die positive Ladung am Pyridinstickstoff ausgleichen. Zum Abschluss der Reaktion wird die Schiff-Base gespalten. Die PLP-abhängigen Enzyme wurden bisher in 5 Faltungstypen unterteilt. Jedoch werden von jedem Faltungstyp die unterschiedlichsten Reaktionen katalysiert. Von der Struktur eines PLP-abhängigen Enzymes kann also nicht auf dessen Funktion geschlossen werden (Eliot und Kirsch, 2004).

3.2. Zielsetzung

3.2.1. Die Fe²⁺-Koordination in OvoA aus *E. tasmaniensis*

Aus dem Sequenzvergleich von 240 EgtB- und 80 OvoA-Sequenzen geht das hochkonservierte Motiv His-X₃-His-X-Glu hervor (Abb. 50). Aufgrund der Ähnlichkeit dieses Motivs mit z.B. dem Eisenbindungsmotiv His-X-Asp/Glu-X_n-His Fe(II)α-Ketoglutarat-abhängiger Hydroxylasen (Hausinger, 2004) soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob das Motiv His-X₃-His-X-Glu in OvoA aus *E. tasmaniensis*, gebildet von den Aminosäuren His¹⁷⁰, His¹⁷⁴ und Glu¹⁷⁶, für die Fe²⁺-Koordination zuständig ist. Hierzu werden die Punktmutationen H170A, H174A und E176A mittels Overlap-Extension-PCR in *OvoA* aus *E. tasmaniensis* eingeführt. Die resultierenden Proteinmutanten OvoAH170A, OvoAH174A und OvoAE176A werden in *E. coli* exprimiert und mittels eines C-terminalen His₆-Tags durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Es wird anschließend überprüft, ob die Mutanten im Vergleich zu OvoA_{wt} einen Aktivitätsverlust aufweisen.

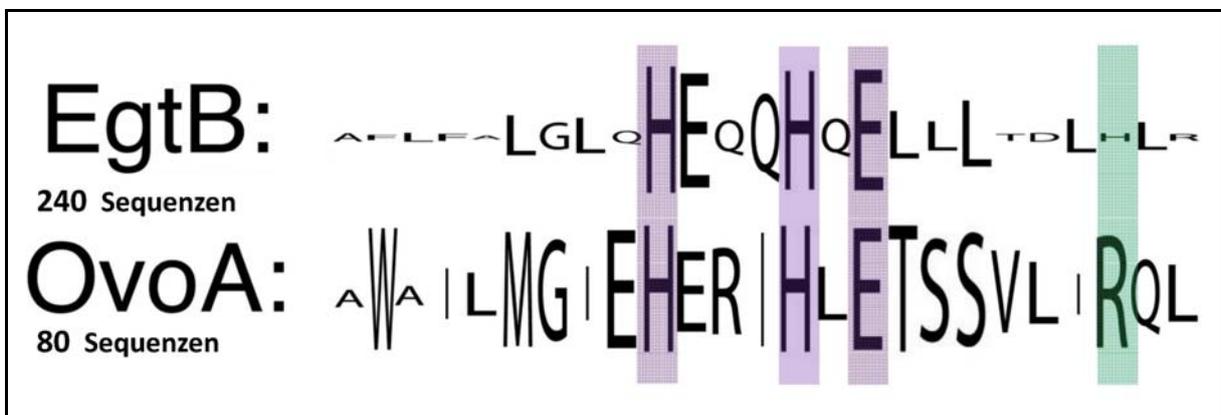


Abb. 50: Sequenzvergleich im Bereich des putativen Eisenbindungsmotivs His-X₃-His-X-Glu (lila unterlegt) von 240 EgtB- und 80 OvoA-Homologen. Grün unterlegt ist ein nur in den OvoA-Homologen konserviertes Arginin.

3.2.2. Die Funktion von Arg¹⁸³ in OvoA aus *E. tasmaniensis*

Aus dem Sequenzvergleich der 240 EgtBs und 80 OvoAs (Abb. 50) geht hervor, dass in den OvoA-Homologen auf das putative Eisenbindungsmotiv His-X₃-His-X-Glu C-terminal ein hochkonserviertes Arginin (Arg¹⁸³ in *E. tasmaniensis*) folgt, welches in den EgtB-Homologen nicht vorhanden ist. Es soll untersucht werden, ob Arg¹⁸³ aus *E. tasmaniensis* essentiell für die Funktion von OvoA ist. Da ein Unterschied zwischen EgtBs und OvoAs ist, dass EgtBs γ -Glutamylcystein und OvoAs Cystein als Substrat nutzen, könnte Arg¹⁸³ durch die Koordination von Cystein für die spezifische Substraterkennung zuständig sein. Zur Überprüfung dieser These werden die Punktmutationen R183A und R183K in *OvoA* aus *E. tasmaniensis* eingeführt. Die resultierenden Proteinmutanten OvoAR183A und OvoAR183K werden in *E. coli* exprimiert und mittels eines C-terminalen His₆-Tags durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Es wird anschließend überprüft, welchen Aktivitätsverlust die zwei Mutanten im Vergleich zu OvoA_{wt} zeigen. Die Mutanten wurden von Tatjana Wiebe zur Verfügung gestellt.

3.2.3. Codiert das Gen ETA_14770 aus *E. tasmaniensis* OvoB?

Um das Genprodukt von ETA_14770 aus *E. tasmaniensis* als OvoB zu identifizieren, wird ETA_14770 in *E. coli* exprimiert und mittels eines C-terminalen His₆-Tags durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Substratspezifität der putativen OvoB wird hierzu mit einem an die Laktatdehydrogenase (LDH) gekoppelten Assay bestimmt. Hierbei lässt sich die Aktivität einer β -Lyase indirekt über die Absorptionsabnahme bei 340 nM verfolgen, da das durch die β -Elimination entstehende Pyruvat von der LDH unter NADH-Verbrauch ($\epsilon_{340\text{nM}} = 6200 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) in Laktat umgesetzt wird. Über Michaelis-Menten Kinetik wird ermittelt, mit welcher katalytischen Effizienz ausgewählte Substrate (Abb. 51) von OvoB umgesetzt werden. Es soll gezeigt werden, ob erstens ETA_14770 für eine β -Lyase codiert und zweitens deren bevorzugtes Substrat das von OvoA gelieferte Intermediat S-(4-Histidyl)-L-Cystein-Sulfoxid ist. Die Messungen zur Ermittlung der katalytischen Effizienzen wurden von Tatjana Wiebe im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt.

3. Einleitung und Zielsetzung

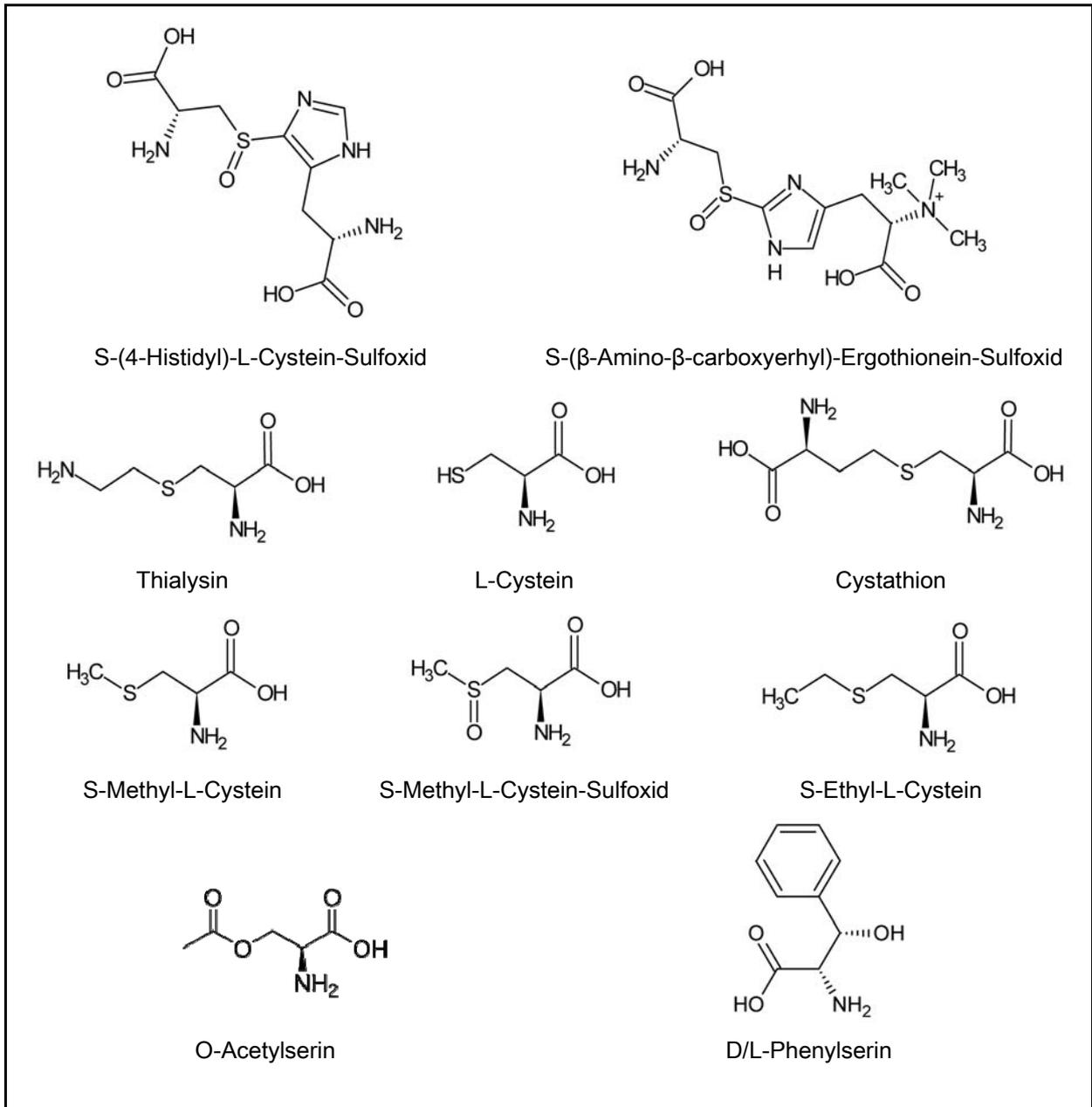


Abb. 51: Testsubstrate für OvoB

3.3. Ergebnisse

3.3.1 Untersuchungen zu OvoA:

3.3.1.1 Herstellung und Charakterisierung der OvoA-Varianten

Der Erfolg der Klonierung der mittels OE-PCR mutierten OvoA-Gene (H170A, H174A, E176A, R183A und R183K) in den Vektor pET28a wurde mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Die resultierenden Proteinsequenzen sind im Anhang 6.4 aufgeführt. Das Plasmid OvoA_{wt}pET28a lag bereits vor. Die Klonierung, Expression und Aufreinigung von OvoAR183A und OvoAR183K wurde von Tatjana Wiebe im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt. Wie mittels SDS-PAGE (Abb. 52 und 53) gezeigt wurde, konnten die OvoA-Varianten OvoA_{wt}, OvoAH170A, OvoAH174A, OvoAE176A, OvoAR183A und OvoAR183K erfolgreich exprimiert und aufgereinigt werden. Die jeweils einzige bzw. am stärksten ausgeprägte Bande ist zwischen der 98 kDa- und 64 kDa-Markerbande lokalisiert, was dem Molekulargewicht der OvoA-Varianten von 83,5 kDa entspricht. Die Ausbeuten in mg pro Liter Bakterienkultur betragen 6, 10, 12 bzw. 4 für OvoA_{wt}, OvoAH170A, OvoAH174A und OvoAE176A und 1 für OvoAR183A und OvoAR183K.

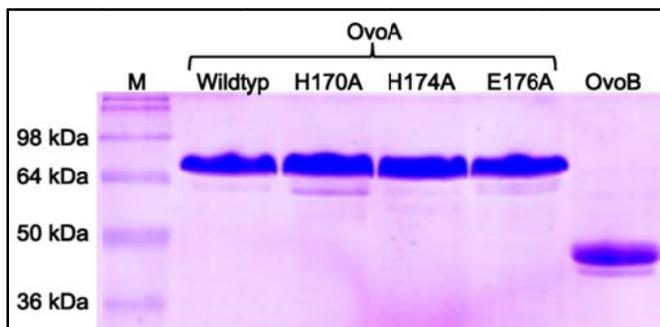


Abb. 52: SDS-PAGE der aufgereinigten OvoA-Varianten OvoA_{wt}, OvoAH170A, OvoAH174A und OvoAE176A, sowie der aufgereinigten OvoB. In der linken Spur wurde Marker aufgetragen und in den anderen Spuren je 2 µg der den Spurenbeschriftungen entsprechenden Proteine.



Abb. 53: SDS-PAGE der aufgereinigten OvoA-Varianten OvoAR183A („A“) und OvoAR183K („K“). In der linken Spur wurde Marker aufgetragen und in den anderen Spuren den Spurenbeschriftungen entsprechende Mengen der OvoA-Varianten (Wiebe, 2010)

Exemplarisch wurde für OvoA_{wt}, OvoAH170A, OvoAH174A und OvoAE176A der Grad der Oligomerisierung durch analytische Gelfiltration (Superdex75) bestimmt. Es geht daraus hervor, dass alle untersuchten OvoA-Varianten die gleiche quaternäre Struktur aufweisen, da alle Proteine das gleiche Elutionsvolumen besitzen. Zudem handelt es sich um eine homogene quaternäre Struktur, da jeweils nur ein Elutionspeak verzeichnet wurde (Abb. 54).

3. Ergebnisse und Diskussion

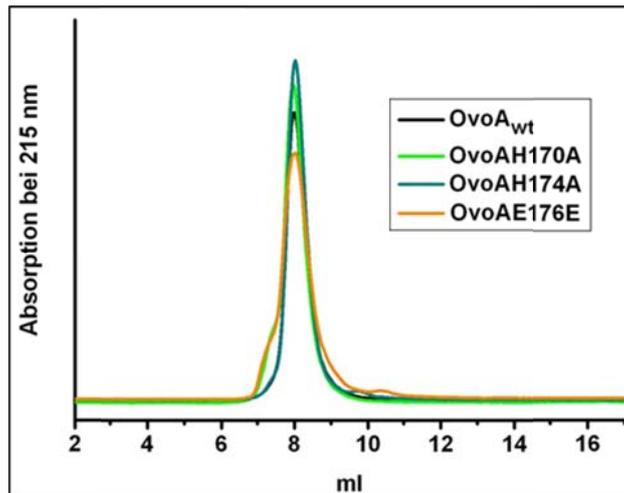


Abb. 54: Gelfiltration der OvoA-Varianten OvoA_{wt}, OvoAH170A, OvoAH174A und OvoAE176A mittels einer analytischen Superdex75-Säule

Anhand der unter 2.3.7 vorgenommenen Kalibrierung der verwendeten analytischen Superdex75-Säule und der hierbei ermittelten Gleichung [19] (Seite 60) ergibt sich für ein Elutionsvolumen von 8 ml ein Molekulargewicht von 101 kDa. Das Ausschlussvolumen der Säule betrug 7,115 ml. Es wurde vermutet, dass die untersuchten OvoA-Varianten als Dimere vorliegen könnten und die vorgenommene Größenzuordnung ungenau ist, da das Molekulargewicht der Dimere (167 kDa) außerhalb des Separationsbereichs der Superdex75-Säule liegt. Daher wurde für OvoA_{wt} exemplarisch eine Gelfiltration mit einer analytischen Superdex200-Säule durchgeführt, welche einen Separationsbereich von 10 - 600 kDa aufweist (Abb. 55).

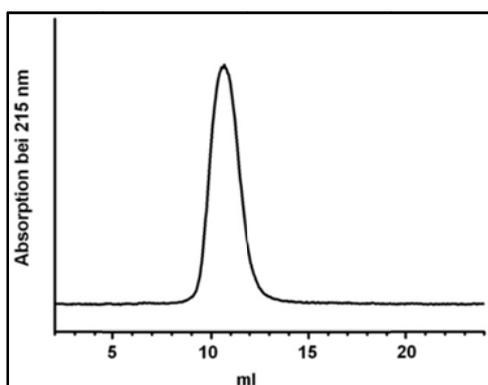


Abb. 55: Gelfiltration von OvoA_{wt} mittels einer analytischen Superdex200-Säule

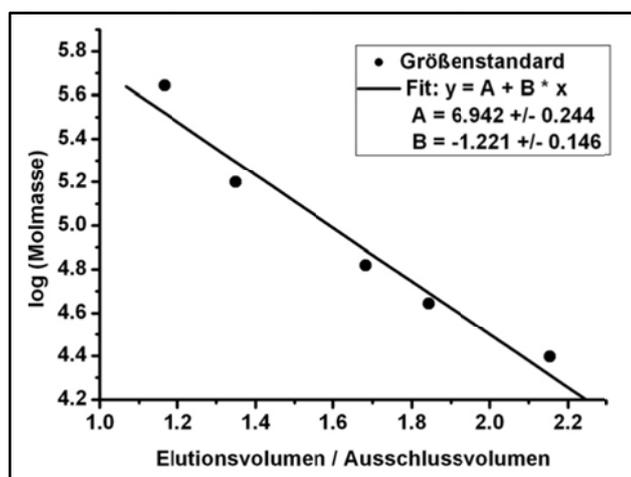


Abb. 56: Kalibrierung der analytischen Superdex200-Säule mit einem Proteingrößenstandard (440 kDa, 158 kDa, 66 kDa, 44 kDa und 25 kDa) und lineare Anpassung („Fit“) von Gleichung [1] (siehe Anhang) an die Datenpunkte

3. Ergebnisse und Diskussion

Das Elutionsvolumen der $OvoA_{wt}$ von der analytischen Superdex200-Säule ist 10,67 ml. Abbildung 56 zeigt die Kalibrierung der genutzten Superdex200-Säule mit einem Proteingrößenstandard (440 kDa, 158 kDa, 66 kDa, 44 kDa und 25 kDa) in der linearisierten Darstellungsweise \log (Molmasse) gegen Elutionsvolumen / Ausschlussvolumen und das Ergebnis der linearen Anpassung von Gleichung [1] (siehe Anhang) an die Datenpunkte. Es ergibt sich daraus:

$$\log(Da) = 6,94 - 1,22 * \text{Elutionsvolumen in ml} / 7,2 \text{ ml} \quad [20]$$

Aus Gleichung [20] und dem Elutionsvolumen von 10,67 ml ergibt sich für $OvoA_{wt}$ ein Molekulargewicht von 136 kDa. Dies entspricht eher dem Molekulargewicht eines $OvoA$ -Dimers von 167 kDa (Abweichung: -18,6%) als dem eines $OvoA$ -Monomers von 83,5 kDa (Abweichung: +62,9%). Daher wird insgesamt aus den vorgenommenen Gelfiltrationen für die untersuchten $OvoA$ -Varianten $OvoA_{wt}$, $OvoAH170A$, $OvoAH174A$ und $OvoAE176A$ geschlossen, dass sie alle ausschließlich als Dimere vorliegen.

3.3.1.2 $OvoA$ -Aktivitätstests

Mit den hergestellten, charakterisierten $OvoA$ -Varianten wurden Aktivitätstests durchgeführt, um den diesbezüglichen Einfluss der verschiedenen Mutationen, und damit die Wichtigkeit der ersetzten Aminosäureseitenketten, zu bestimmen. Hierzu werden die $OvoA$ -Varianten mit den $OvoA$ -Substraten Histidin und Cystein sowie dem Cofaktor Fe^{2+} inkubiert und anschließend mittels HPLC die Substratumsetzung in das Produkt S-(4-Histidyl)-L-Cystein-Sulfoxid („2“ in Abb. 57 und 58) beobachtet.

Fe(II)-Koordinationsmotiv:

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem konservierten Motiv $His^{170}-X_3-H^{174}-X-E^{176}$ aus $OvoA_{wt}$ um ein Eisenkoordinationsmotiv handelt, wurden die drei $OvoA$ -Mutanten $OvoAH170A$, $OvoAH174A$ und $OvoAE176A$ genutzt, bei denen jeweils eine Aminosäure des vermuteten Eisenkoordinationsmotivs durch Alanin ersetzt wurde. $OvoA_{wt}$ setzt unter den gewählten Inkubationsbedingungen die Substrate Histidin und Cystein nahezu vollständig in S-(4-Histidyl)-L-Cystein-Sulfoxid (2) um (Abb. 57). Im Gegensatz hierzu konnte dieses Produkt in den Inkubationsansätzen der Mutanten $OvoAH170A$, $OvoAH174A$ und $OvoAE176A$ nicht beobachtet werden, wie dies auch für Fe^{2+} -abgereicherte $OvoA_{wt}$ („EDTA“) der Fall ist (Abb. 57). Die Fe^{2+} -Abreicherung von $OvoA_{wt}$ wurde durch eine Inkubation mit dem Chelator EDTA, welcher zweiwertige Kationen bindet, erreicht. Es kann aus

diesen Aktivitätstests geschlossen werden, dass es sich bei dem Motiv His¹⁷⁰-X₃-H¹⁷⁴-X-E¹⁷⁶ aus OvoA_{wt} um das Eisenkoordinationsmotiv handelt.

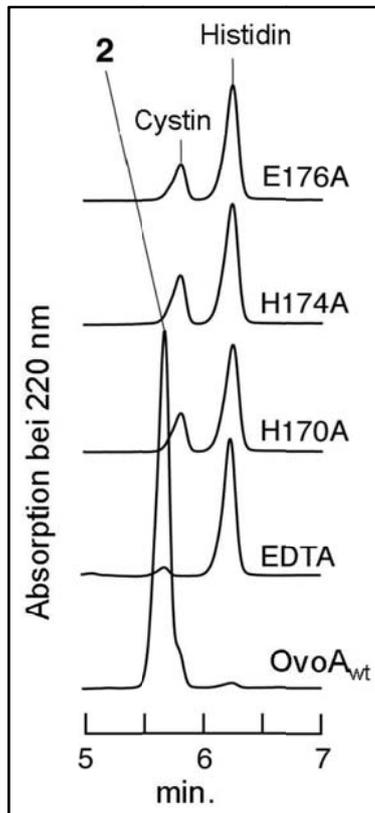


Abb. 57: HPLC-Auftrennung der Reaktionsprodukte verschiedener OvoA-Varianten, 2 = S-(4-Histidyl)-L-Cystein-Sulfoxid (Braunshausen und Seebeck, 2011).

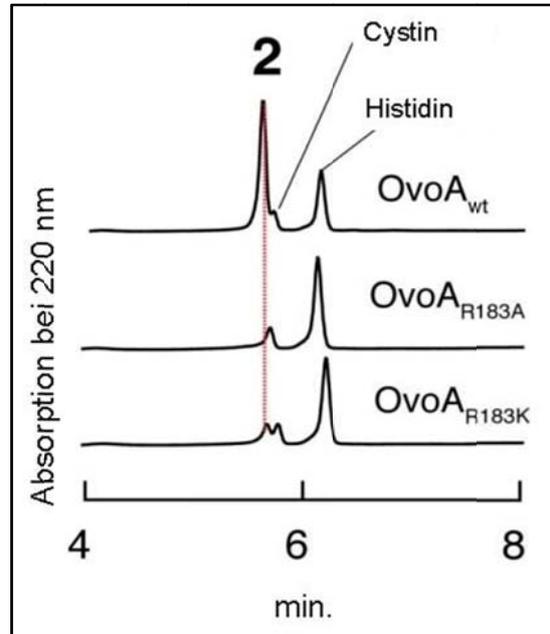


Abb. 58: HPLC-Auftrennung der Reaktionsprodukte der OvoA-Varianten OvoAR183A und OvoAR183K im Vergleich zu OvoA_{wt}, 2 = S-(4-Histidyl)-L-Cystein-Sulfoxid (Wiebe, 2010).

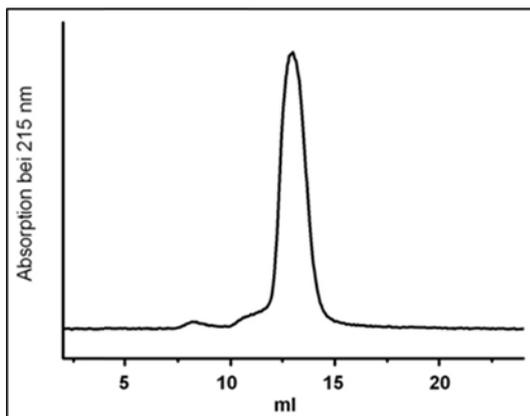
Arginin¹⁸³:

Um zu überprüfen, ob das konservierte Arg¹⁸³ aus OvoA_{wt} für die Funktion von OvoA_{wt} essentiell ist, wurde die Mutante OvoAR183A hergestellt. Um die Vermutung zu überprüfen, dass Arg¹⁸³ das Substrat Cystein koordiniert, wurde des Weiteren die Mutante OvoAR183K hergestellt. Da Lysin eine gewisse Strukturähnlichkeit mit Arginin aufweist, könnte Lysin die Koordinations-Funktion von Arginin teilweise übernehmen. OvoAR183K erzeugt unter den gewählten Inkubationsbedingungen im Vergleich zu OvoA_{wt} eine sehr geringfügige Menge an S-(4-Histidyl)-L-Cystein-Sulfoxid (2), wohingegen OvoAR183A einen vollständigen Aktivitätsverlust aufweist (Abb. 58). Es kann daraus geschlossen werden, dass Arg¹⁸³ essentiell für die Funktion von OvoA_{wt} ist. Die Lysinseitenkette besitzt eine Aminogruppe und kann die Funktion der Argininseitenkette, welche eine Guanidiniumgruppe besitzt, zu einem kleinen Teil übernehmen. An Position 183 ist vermutlich das Vorhandensein positiv geladener Stickstoffatome für die enzymatische Aktivität von OvoA notwendig.

3.3.2 Untersuchungen zu OvoB

3.3.2.1 Herstellung von OvoB

OvoB konnte erfolgreich in *E. coli* Arctic(DE3)-Zellen exprimiert, und aufgereinigt werden. Die SDS-PAGE zeigt eine Hauptbande zwischen der 50 kDa- und 36 kDa-Markerbande, was dem theoretischen OvoB-Molekulargewicht von 46 kDa entspricht (Abb. 52, Seite 94). Die OvoB-Ausbeute betrug 12 mg / Liter Bakterienkultur. Das molare Verhältnis PLP / OvoB betrug 0,87. OvoB wurde also überwiegend als Holoenzym aufgereinigt. Dem Reaktionspuffer der für OvoB durchgeführten Substratumsatzmessungen, wurde ein Überschuss an PLP zugesetzt, um ein vollständiges Vorliegen der OvoB als Holoenzym zu gewährleisten. Abbildung 59 zeigt die analytische Gelfiltration von OvoB mittels einer Superdex200-Säule. Das Chromatogramm zeigt einen Peak mit einem Elutionsvolumen von 13 ml. Entsprechend der Kalibrierung der genutzten analytischen Superdex200-Säule



(Abb. 56, Seite 95) und Gleichung [20] (Seite 96) ergibt sich für OvoB ein Molekulargewicht von 55 kDa. Dies entspricht eher dem Molekulargewicht eines OvoB-Monomers von 46 kDa (Abweichung: +19,6%), als dem eines OvoB-Dimers von 92 kDa (Abweichung: -67,3%). Aus der Gelfiltration kann also geschlossen werden, dass OvoB ausschließlich als Monomer vorliegt.

Abb. 59: Gelfiltration von OvoB mittels einer analytischen Superdex200-Säule

3.3.2.2 Charakterisierung der Substratspezifität von OvoB

Um zu überprüfen, ob es sich bei OvoB um die an der Ovothiol A-Biosynthese von *E. tasmaniensis* beteiligte β -Lyase handelt, wurde die Substratspezifität von OvoB bestimmt. Hierzu wurden mittels eines direkten Assays für D/L-Phenylserin und eines gekoppelten Assays für diverse Substrate und OvoB die Umsatzraten ermittelt und die kinetischen Parameter k_{cat} , und K_m bzw. k_{cat}/K_m aus den erhaltenen Daten berechnet. Die Messungen zur Bestimmung der Substratumsatzraten wurden von Tatjana Wiebe im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt. Es wurden die Umsatzgeschwindigkeiten für jeweils verschiedene Substratkonzentrationen bestimmt, so dass die kinetischen Parameter durch die direkte Auftragung von v (s^{-1}) gegen die molare Substratkonzentration, und

3. Ergebnisse und Diskussion

anschließende Anpassung der Michaelis-Menten Gleichung [11] (siehe Anhang) an die Datenpunkte, ermittelt werden konnten (Abb. 60 - 69). Da in den Graphen (Abb. 60 - 69) die Geschwindigkeit in

$$\text{umgesetztes Substrat (M) / (aktive Zentren (M) * s)}$$

angegeben ist, entspricht die ermittelte Maximalgeschwindigkeit der kinetischen Konstante k_{cat} . Sofern eine Substratsättigung nicht annäherungsweise erreicht wurde, und die Datenpunkte keinen hyperbolischen Verlauf zeigen, wurde Gleichung [1] (siehe Anhang) an die Datenpunkte angepasst. Die aus dieser linearen Funktionsanpassung hervorgehende Steigung b entspricht dabei k_{cat} / K_m . Die Datenpunkte mit Fehlerbalken in Abb. 60 - 69 entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Messungen und deren Standardabweichungen.

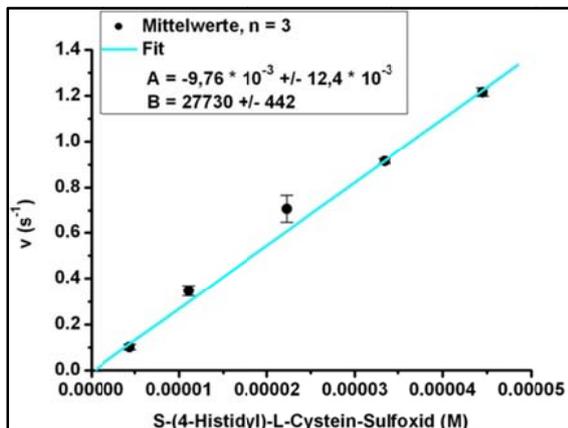


Abb. 60: Direkt lineare Auftragung für die Umsetzung von S-(4-Histidyl)-L-Cystein-Sulfoxid durch OvoB und Anpassung („Fit“) von Gleichung [1] an die Datenpunkte

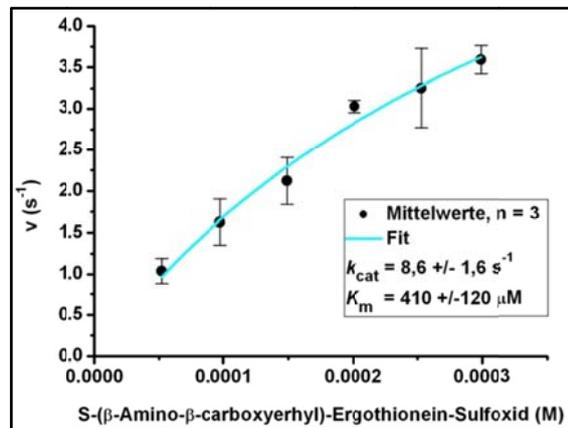


Abb. 61: Direkt lineare Auftragung für die Umsetzung von S-(β-Amino-β-carboxyethyl)-Ergothionein-Sulfoxid durch OvoB und Anpassung („Fit“) von Gleichung [11] an die Datenpunkte

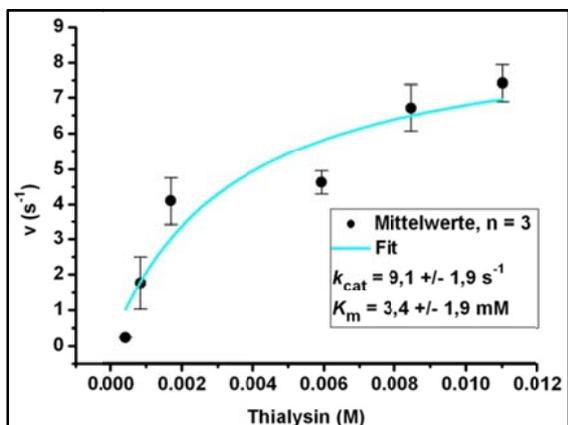


Abb. 62: Direkt lineare Auftragung für die Umsetzung von Thialysin durch OvoB und Anpassung („Fit“) von Gleichung [11] an die Datenpunkte

3. Ergebnisse und Diskussion

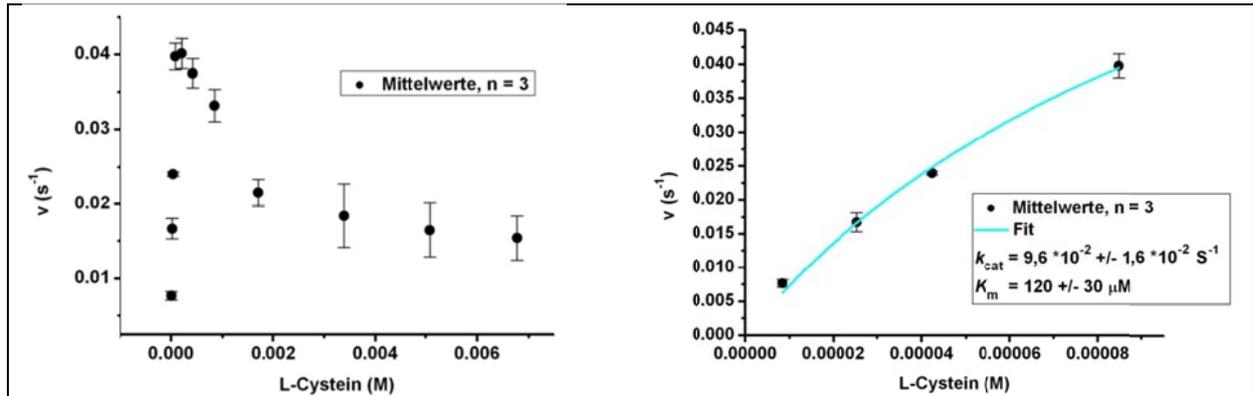


Abb. 63: Direkt lineare Auftragung für die Umsetzung von L-Cystein durch OvoB. Links: Substrathemmung für [L-Cystein] > ca. 85 µM. Rechts: Anpassung („Fit“) von Gleichung [11] an die Datenpunkte für die gilt [L-Cystein] < ca. 85 µM]

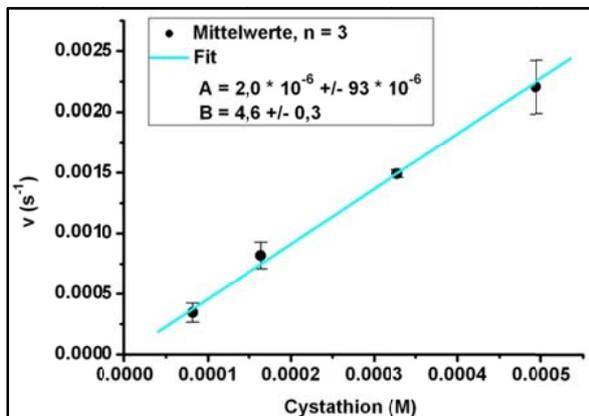


Abb. 64: Direkt lineare Auftragung für die Umsetzung von Cystathion durch OvoB und Anpassung („Fit“) von Gleichung [1] an die Datenpunkte

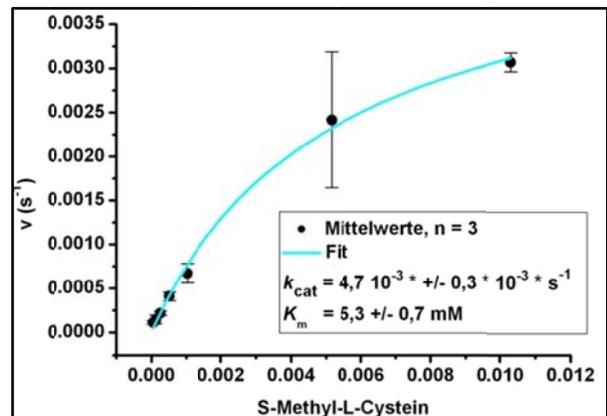


Abb. 65: Direkt lineare Auftragung für die Umsetzung von S-Methyl-L-Cystein durch OvoB und Anpassung („Fit“) von Gleichung [11] an die Datenpunkte

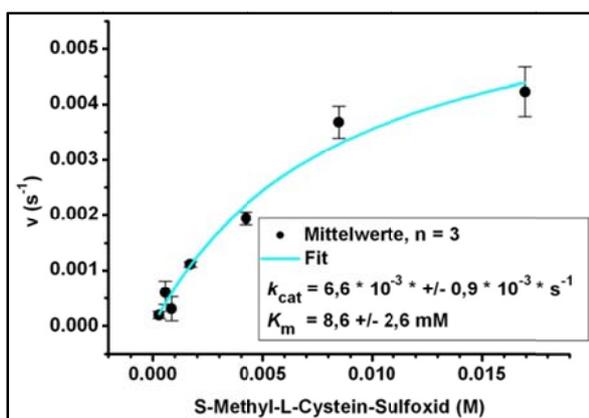


Abb. 66: Direkt lineare Auftragung für die Umsetzung von S-Methyl-L-Cystein-Sulfoxid durch OvoB und Anpassung („Fit“) von Gleichung [11] an die Datenpunkte

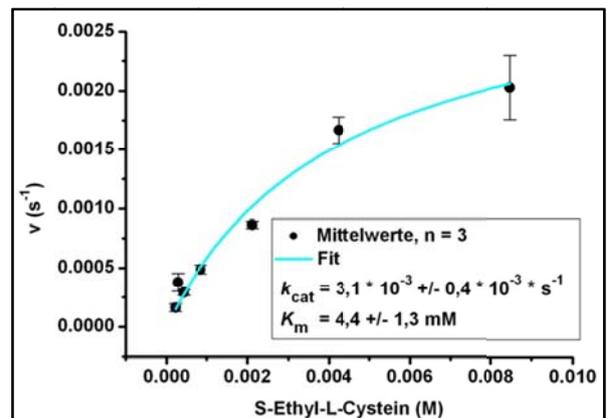


Abb. 67: Direkt lineare Auftragung für die Umsetzung von S-Ethyl-L-Cystein durch OvoB und Anpassung („Fit“) von Gleichung [11] an die Datenpunkte

3. Ergebnisse und Diskussion

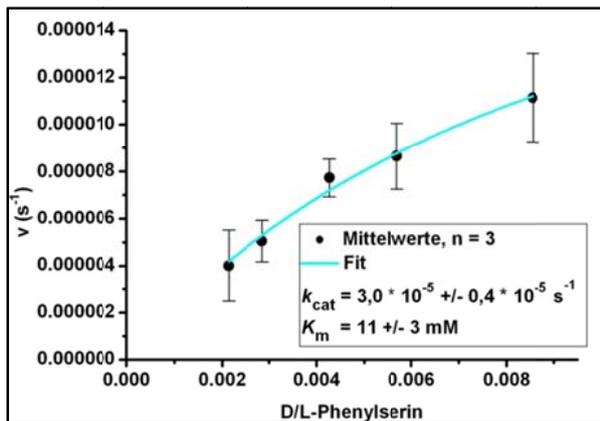


Abb. 68: Direkt lineare Auftragung für die Umsetzung von D/L-Phenylserin durch OvoB und Anpassung („Fit“) von Gleichung [11] an die Datenpunkte

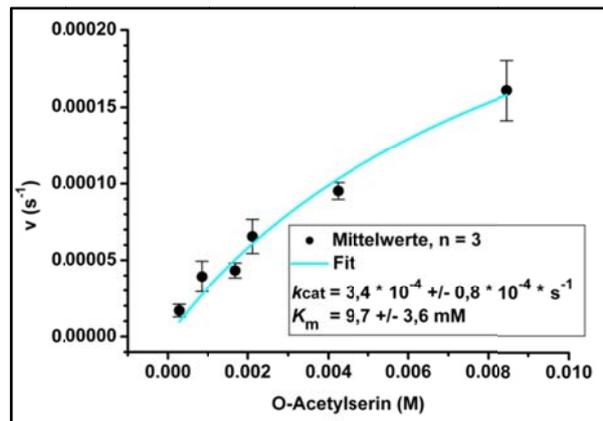


Abb. 69: Direkt lineare Auftragung für die Umsetzung von O-Acetylserin durch OvoB und Anpassung („Fit“) von Gleichung [11] an die Datenpunkte

Die für OvoB und die einzelnen Substrate ermittelten kinetischen Parameter k_{cat} und K_m bzw. die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m (Abb. 60-69) sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: ermittelte kinetische Parameter für die untersuchten Substrate und OvoB

Substrat	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ *M ⁻¹)
S-(4-Histidyl)-L-Cystein-Sulfoxid	-	-	28000
S-(β-Amino-β-carboxyethyl)-Ergothionein-Sulfoxid	8,6	0,41	21000
Thialysin	9,1	3,4	2700
L-Cystein	0,096	0.12	800
Cystathion	-	-	4,6
S-Methyl-L-Cystein	0,0047	5,3	0,89
S-Methyl-L-Cystein-Sulfoxid	0,0066	8,6	0,77
S-Ethyl-L-Cystein	0,0031	4,4	0,71
O-Acetylserin	0,00034	9,7	0,035
D/L-Phenylserin	0,00003	11	0,0027

Das von OvoA gelieferte Intermediat S-(4-Histidyl)-L-Cystein-Sulfoxid wird mit der höchsten katalytischen Effizienz von $28 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ durch OvoB umgesetzt. Eine ähnliche katalytische Effizienz ($21 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) weist OvoB für das von EgtC gelieferte Intermediat S-(β-Amino-β-carboxyethyl)-Ergothionein-Sulfoxid auf, wohingegen alle 8 weiteren untersuchten β-Lyase-Substrate (Thialysin, L-Cystein, Cystathion, S-Methyl-L-Cystein, S-Methyl-L-Cystein-Sulfoxid, S-Ethyl-L-Cystein und O-Acetylserin) mit einer 10 fach bis $8 \cdot 10^5$ fach geringeren katalytischen Effizienz als S-(4-Histidyl)-L-Cystein-Sulfoxid von OvoB umgesetzt werden. L-Cystein, eines der OvoA-Substrate, wirkt ab einer Konzentration von ca. 85 μM als OvoB-Inhibitor. Phenylserin, welches als Testsubstrat für eine mögliche

Aldolaseaktivität in die Untersuchung mitaufgenommen wurde, wird mit einer katalytischen Effizienz von $0,0027 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ von allen hier getesteten Substraten am langsamsten von OvoB umgesetzt. Als Testsubstrat für eine mögliche Transaminaseaktivität wurde L-Alanin genutzt. Es konnte keinerlei Umsatz von L-Alanin durch OvoB gemessen werden (Daten werden hier nicht aufgeführt). Insgesamt kann aus den hier erhaltenen Ergebnissen zur Charakterisierung der Substratspezifität von OvoB geschlossen werden, dass es sich bei OvoB wahrscheinlich um die an der Oovoithiol A-Biosynthese von *E. tasmaniensis* beteiligte β -Lyase handelt.

3.4. Diskussion

3.4.1 Untersuchungen zu OvoA

3.4.1.1 Fe(II)-Koordination:

Um die Annahme zu überprüfen, dass das in EgtB und OvoA konservierte Motiv His¹⁷⁰-X₃-H¹⁷⁴-X-E¹⁷⁶ der Koordination des Fe(II)-Ions im aktiven Zentrum dient, wurden für OvoA aus *E. tasmaniensis* die betreffenden drei Aminosäuren mittels zielgerichteter Mutagenese einzeln gegen Alanine ausgetauscht. OvoA_{wt} sowie alle drei Proteinmutanten konnten erfolgreich heterolog in *E. coli* exprimiert und anschließend mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Durch Größenausschlusschromatographie konnte ihnen als quarternäre Struktur ein Dimer zugeordnet werden. Der nahezu vollständige Aktivitätsverlust jeder der OvoA-Mutanten H170A, H174A und E176A lässt darauf schließen, dass es sich bei dem Motiv His¹⁷⁰-X₃-H¹⁷⁴-X-E¹⁷⁶ um das Eisenbindungsmotiv der OvoA handelt. OvoA lässt sich also in die Familie der Mononuklearen Nicht-Häm-Eisen(II) Enzyme einordnen, deren gemeinsames Merkmal es ist, das Fe(II)-Ion mittels einer katalytischen Triade aus 2 Histidinseitenketten und einer Glutamin- oder Asparaginsäureseitenkette zu koordinieren. Im Vergleich zu anderen Mitgliedern dieser Familie ist das Eisenbindungsmotiv von OvoA mit nur insgesamt vier dazwischen liegenden Aminosäuren eng zusammengedrückt. In anderen Mitgliedern dieser Enzymfamilie werden die drei Aminosäurereste des Eisenbindungsmotivs durch 34 bis 228 Aminosäuren voneinander getrennt (reviewed in Koehntop et al., 2005). Das in OvoA im Vergleich zu den anderen Mononuklearen Nicht-Häm-Eisen(II) Enzymen kompakte Motiv His¹⁷⁰-X₃-H¹⁷⁴-X-E¹⁷⁶ könnte auf eine andere Proteinfaltung oder Komplexgeometrie der OvoA hinweisen.

3.4.1.2 Arginin¹⁸³:

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den 240 EgtB-Homologen und 80 OvoA-Homologen ist, dass in den OvoA-Homologen ein Arginin in Nachbarschaft zum Eisenkoordinationsmotiv konserviert ist (Abb. 50, Seite 91). In OvoA aus *E. tasmaniensis* entspricht dieses Arginin der Position 183. Da EgtB und OvoA unterschiedliche Substrate umsetzen, könnte Arg¹⁸³ z.B. für die Substraterkennung notwendig sein. Arginin¹⁸³ könnte das Schwefelatom des Substrats L-Cystein in einer geeigneten räumlichen Orientierung zum Fe(II)-Ion fixieren, indem zwei Stickstoffatome der Argininseitenkette elektrostatische Wechselwirkungen mit den Sauerstoffatomen der Carboxygruppe des L-Cysteins eingehen. Um Anhaltspunkte für diese Hypothese zu erhalten, wurden die Punktmutationen R183A und R183K in OvoA eingeführt. Es zeigte sich, dass die OvoAR183A-Mutante einen vollständigen, und die OvoAR183K-Mutante einen signifikanten Aktivitätsverlust aufweist. Diese Ergebnisse unterstützen die oben dargelegte Hypothese, dass positiv geladene Stickstoffatome an Position 183 für die OvoA-Aktivität notwendig sind. Eine Alaninseitenkette kann mangels Aminogruppen keine elektrostatische Wechselwirkung mit der Carboxygruppe des L-Cysteins ausbilden, daher zeigt die OvoAR183A-Mutante einen vollständigen Verlust der Aktivität. Die OvoAR183K-Mutante stellt hingegen an Position 183 eine Aminogruppe in der Lysinseitenkette bereit, und kann so, bezüglich einer elektrostatischen Wechselwirkung mit der L-Cystein-Carboxygruppe, teilweise die Funktion der OvoA_{wt} übernehmen. Es wird zwar eine erhebliche Aktivitätsverringern, aber kein vollständiger Aktivitätsverlust durch die Mutation R183K hervorgerufen.

3.4.2 Untersuchungen zu OvoB

OvoB wurde heterolog in *E. coli* exprimiert, und zu ca. 90% als Holoenzym mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie zeigen, dass OvoB als Monomer vorliegt. Wie aus den Ergebnissen der Substratumsatzmessungen (Tabelle 11, Seite 101) verschiedener Thioether- und Thioester-Substrate (Abb. 51, Seite 93) durch OvoB hervorgeht, wird das von OvoA gelieferte Intermediat S-(4-Histidyl)-L-Cystein-Sulfoxid mit der höchsten katalytischen Effizienz ($2,8 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) von OvoB umgesetzt. Eine um nur ca. 25% geringere katalytische Effizienz zeigt OvoB gegenüber dem von EgtB gelieferten Intermediat S-(β -Amino- β -carboxyethyl)-Ergothionein-Sulfoxid der Ergothioneinbiosynthese. Thialysin wird mit einer 10 fach geringeren katalytischen Effizienz als das bevorzugte OvoA-Intermediat umgesetzt und L-Cystein mit einer ca. 30 fach geringeren katalytischen Effizienz.

3. Ergebnisse und Diskussion

Alle anderen untersuchten Substrate werden erheblich, $3 \cdot 10^4$ fach bis $8 \cdot 10^5$ fach, langsamer von OvoB umgesetzt. Inwieweit die *in vitro* ermittelten katalytischen Effizienzen den Eigenschaften von OvoB *in vivo* entsprechen ist unklar, jedoch unterstützen die Ergebnisse die Hypothese, dass es sich bei OvoB um die gesuchte β -Lyase der OvoA-Biosynthese in *E. tasmaniensis* handelt, da S-(4-Histidyl)-L-Cystein-Sulfoxid mit der höchsten katalytischen Effizienz von OvoB umgesetzt wird. Das auch das EgtB-Intermediat in ähnlichem Maße wie das OvoA-Intermediat von OvoB umgesetzt wird, beruht wahrscheinlich auf der Homologie der beiden Enzyme OvoB und der β -Lyase EgtE der Ergothioneinbiosynthese. Unerwartet ist der signifikante Umsatz des L-Cysteins und des Thioesters Thialysin. Ein Thioether ist offensichtlich keine Voraussetzung für ein OvoB-Substrat. OvoB zeigt eine geringe Substratspezifität. Eine Diskussion des Einflusses verschiedener Abgangsgruppen wird hier nicht vorgenommen, da keine ausreichende Datengrundlage vorhanden ist. Es wurden nur 8 β -Lyase-Substrate untersucht und aus den direkten linearen Auftragungen konnten aufgrund nicht erreichter Substratsättigung die katalytischen Effizienzen nicht exakt bestimmt werden. Vermutlich spielt die sterische Passgenauigkeit des Substrates und der Bindungstasche die entscheidendere Rolle bezüglich der katalytischen Effizienz als die Abgangsgruppe. Da keine Kristallstruktur für OvoB vorliegt, können hier keine Voraussagen getroffen werden. Bemerkenswert ist, das L-Cystein, eines der Substrate von OvoA, ab einer Konzentration von ca. $85 \mu\text{M}$ als Inhibitor der OvoB wirkt. Zusätzlich wird die Hypothese, dass es sich bei OvoB um die gesuchte β -Lyase der OvoA-Biosynthese in *E. tasmaniensis* handelt, dadurch gestützt, dass die β -Eliminierung die dominante Reaktion der OvoB ist. PLP-abhängige Enzyme katalysieren auch Transaminase- und Aldolasereaktionen. Mittels des Testsubstrates L-Alanin konnte OvoB keinerlei Transaminaseaktivität nachgewiesen werden. Die Aldolaseaktivität der OvoB, die an Hand des Testsubstrates D/L-Phenylserin untersucht wurde, ist gering. D/L-Serin wird mit einer katalytischen Effizienz von $2,7 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ von allen hier untersuchten Substraten am langsamsten von OvoB umgesetzt.

4. Material

4.1 Instrumentation

ABI 433A Peptidsynthesizer	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Abi Prism® 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Lincoln
ÄKTA purifier + Frac 920	GE Healthcare, München
Autoklaven:	
Varioklav	Steriltechnik AG, Magdeburg
Sanoklav	Wolf, Überkingen-Hausen
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrophorese:	
powerPac 300,	Biorad, München
DNA Sub Cell, Mini ProtFan	Biorad, München
Elektroporatorion:	
Gene Pulser	Biorad, München
Pulse Controller	Biorad, München
Capacitance Extender	Biorad, München
ESI-MS LCQ Advantage Max	Thermo, Erlangen
Gelfiltrationssäulen:	
Superdex75 10/300 GL	GE Healthcare, München
Superdex200 10/300 GL	GE Healthcare, München
HPLC-Säulen:	
C18 (250 x 4,6 mm, 5 µM) + Vorsäule 10 x 4,0 mm	Bischoff, Leonberg
C18 (250 x 20 mm, 5 µM) + Vorsäule 50 x 20 mm	Bischoff, Leonberg
HPLC System Gold	Beckman Coulter Inc. Brea, C.A., USA
Inkubatoren (Bakterienkulturen):	
CO2-AUTO-ZERO	Heraeus, Hanau
innova 4000	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Multitron	Infors-HT, Einsbach
ITC: VP-ITC, ThermoVac	MicroCal (Part of GE Healthcare), Freiburg
Kühl-/Gefrierschränke:	
-80 °C	Heraeus, Hanau
-20 °C, +4 °C	Liebherr, Ochsenhausen

4. Material

Magnetrührgerät Reo basic C	Ika Labortechnik, Staufen
Microfluidicer M110S	Microfluidics, Newton, USA
Mikrowelle R-207	Sharp, Hamburg
pH-Meter 671 Calimatik	Knick, Berlin
Photodokumentation	PEQ Lab, Erlangen
Plattenlesegerät: Safire ²	Tecan, Crailsheim
Reinstwasseranlage Milli-Q plus	Millipore, Schwalbach
Rollinkubator Cat RM5	Neolab, Heidelberg
Schüttelinkubatoren:	
KS 250 basic Ika	Labortechnik, Staufen
Minishaker	VWR, Darmstadt
Spektrometer/Photometer:	
Nanodrop 1000	PEQ Lab, Erlangen
DU650	Beckman, Krefeld
UV-2401PC	Schimadzu, Duisburg
OD ₆₀₀ -Spektrometer	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank Hera Safe	Kendro Laboratory Products, Langenselbold
Thermo Cycler MJ-Mini	Biorad, München
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
UV-Schirm Reprostar II	CAMAG, Berlin
Vortex Genie 2	Sciencific Industries
Waagen:	
APX-3202	Denver Instrument, Göttingen
ISO-9001	Denver Instrument, Göttingen
Zentrifugen:	
Centrifuge 5412	Eppendorf, Hamburg
Allegra X-15R	Beckman, Krefeld
Avanti J-26XP	Beckman, Krefeld
RC-28S	Sorval, Hamburg

3.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien sind von p.A.-Qualität und wurden bei den Firmen Alfa Aesar (Karlsruhe), Bachem Distribution Service (Weil am Rhein), Baker (Deventer), Becton Dickinson (Heidelberg), Berry Associates (Dexter, MI, USA), Gerbu (Wieblingen), ICN Biomedical (Frankfurt), Merck (Darmstadt), RheinPerChemie (Rheinfelden), Life

4. Material

Technologies (Carlsbad, CA., USA), Roth (Karlsruhe), Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Steinheim) geordert.

Amyloseresin, high flow	New England Biolabs, Frankfurt (Main)
Avidin, Egg White	Merck, Darmstadt
Caseinpepton-Sojapepton-Boullion	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxynukleotide	New England Biolabs, Frankfurt
Dialysekassetten Slide-A-Lyzer	Thermo Fisher, Bonn
DNA-Marker: 1 kb-, 100 bp-Ladder	New England Biolabs, Frankfurt (Main)
Fibrinogen (bovine plasma), Typ I-S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gene Pulser Cuvette, 0,2 cm	Biorad, München
Hefeextrakt	Becton Dickinson, Heidelberg
Konzentratoren:	
Amicon Ultra 3/10K	Millipore, Schwalbach
Vivaspin 500, 10K	Sartorius, Göttingen
LB-Agarplatten	Hauseigene Medienküche
Ni-NTA-Superflow Agarose	Quiagen, Hilden
pankreatisch abgebautes Casein	Becton Dickinson, Heidelberg
PCR-Film	Eppendorf, Hamburg
Protein-Marker:	
Seablue Plus 2	Invitrogen, Darmstadt
LMW-Marker	GE Healthcare, München
Säulen Proteinaufreinigung:	
Glass Econo-Column	Biorad, München
384well-plate, black, flat bottom	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96well-plate, transparent, U-Shape	Greiner Bio-One, Frickenhausen

4.3 Enzyme

Big Dye®	Applied Biosystems, Darmstadt
Lactatdehydrogenase	Sigma-Aldrich, Steinheim
NcoI	New England Biolabs, Frankfurt (Main)
NdeI	New England Biolabs, Frankfurt (Main)
Pfu-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase	Quiagen, Hilden
T4-DNA-Ligase	Invitrogen, Darmstadt

4. Material

XhoI New England Biolabs, Frankfurt (Main)

4.4 Kits

QIAquick Gel Extraktion Kit Qiagen, Hilden
 QIAprep Miniprep Kit Qiagen, Hilden
 QIAquick PCR Purification Kit Qiagen, Hilden

4.5 Bakterienstämme

Tabelle 12: verwendete Bakterienstämme

Spezies	Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>Escherichia coli</i>	Arctic(DE3)	B F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (_{r_B-m_B⁻}) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA</i> Hte [<i>cpn10 cpn60</i> Gent ^r]	Genomics
	XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44</i> <i>relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac</i> ^h ZΔM15 Tn 10(Tet ^r)]	Stratagene
	BL21(DE3)	B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (_{r_B-m_B⁻}) <i>gal</i> λ(DE3)	Stratagene
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM-Nr.346 ATCC6538P	Wildtyp	DSMZ

4.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden, sofern nicht anders vermerkt, bei der Firma Metabion (Martinsried) geordert.

Tabelle 13: für Sequenzierungen verwendete Oligonukleotide

Ziel / Name:	Ausrichtung (Oligonukleotid-Nr.)	Sequenz (5'→3')
OvoA1, Nukleotide 424-445	sense (17)	gttgagcagttattcagcaga
OvoA2, Nukleotide 870-790	sense (18)	gacctttggcgaggttcacc
OvoA3, Nukleotide 1317-1335	sense (19)	taccggcaatgaggccctg
T7-Promotor	sense (20)	taatacgactcactataggg
T7-Terminator	antisense (21)	ctagttattgctcagcgggtgg
pMAL MCS reverse*	antisense (22)	tgtcctactcaggagagcgttcac

*New England Biolabs, Frankfurt (Main)

4. Material

Tabelle 14: für Klonierungen verwendete Oligonukleotide

Name / Zielkonstrukt / Verwendung	Ausrichtung (Oligonukleotid-Nr.)	Sequenz (5' → 3')	Mod.
MBP-P1-PSR	sense (1)	catgggctgcaaatatgaagtgctgccgccgcatggcaaattcgtgtg gcggcgcgccgtctcgta	5' Pho
	antisense (2)	agcttaacgagacggcgcgccgcacacgaattgccatgcggcgg cagcactcatattgcagcc	5' Pho
P1-H ₆ -GFP	sense (3)	catgggctgcaaatatgaagtctgccgccgcatggcaaattcgtttg cggcgcgcaccatcaccatcacca	5' Pho
	antisense (4)	tatggtgatggtgatggtgcgcgccgcaaacgaattgccatgcggc ggcagaactcatattgcagc	5' Pho
P1 _{scrambled} -H ₆ -GFP	sense (5)	catgtatctgaaagaagtttgccgccatccgggcaaagtttcccggc gggctgccaccatcaccatcacca	5' Pho
	antisense (6)	tatggtgatggtgatggtggcagcccgcgggaaaactttgcccg atggccgcaaactctttcagata	5' Pho
OvoA _{Volllänge} (alle OvoA-Mutanten)	sense (7)	atatccatggcaaatgggagcac	-
	antisense (8)	atatctcgagacgttacgccacagggtt	-
OvoA _{Nukleotide1-508} (H170A, H174A, E176A)	antisense (9)	ctcgatccccatcaggataacctatgc	-
OvoAH170A	sense (10)	tctgatggggatcgaggctgagcgcacatccatctggaaac	-
OvoAH174A	sense (11)	tctgatggggatcgagcatgagcgcacatcctctggaacctcaag cgt	-
OvoAE176A	sense (12)	tctgatggggatcgagcatgagcgcacatccatctggctacctcaagc gtgctgat	-
OvoAR183A	sense (13)	gtgctgatcgcgcagctgccgctggcg	-
	antisense (14)	cggcagctgctgcvgatcagcacgcttga	-
OvoAR183K	sense (15)	gtgctgatcaaacagctgccgctggcg	-
	antisense (16)	cggcagctgtttgatcagcacgcttga	-

4.7 Vektoren

pMAL-c5E

New England Biolabs, Frankfurt (Main)

pET28a

Invitrogen, Darmstadt

4. Material

4.8 Puffer und Lösungen

Agarosegel-Laufpuffer / Gelpuffer	89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, 89 mM Tris, pH 8,0
Agarosegelprobenpuffer	89 mM Borsäure, 0,025% (w/v) Bromphenolblau, 2 mM EDTA, 10% (w/v) Ficoll, 89 mM Tris, 0,025% (w/v) Xylencyanol, pH 8,0
Amylosewaschpuffer	200 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,4
Amyloseelutionspuffer	200 mM NaCl, 10 mM D-Maltose, 20 mM Tris, pH 7,4
Aufschlusspuffer	300 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0
Gelfiltrations-Puffer	150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,4
Ni-NTA-Waschpuffer 1	10 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0
Ni-NTA-Waschpuffer 2	20 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0
Ni-NTA-Elutionspuffer	250 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0
OvoB-Puffer 1	50 mM NaCl, 20 µM PLP, 1 mM TCEP, 50 mM Tris, pH 8,0
OvoB-Puffer 2	50 mM NaCl, 0,15 mM NADH, 20 µM PLP, 1 mM TCEP, 50 mM Tris, pH 8,0
SDS-Entfärbungslösung	10% (v/v) Essigsäure; 5 % (v/v) Methanol
SDS-Färbelösung	0,1% (w/v) Coomasie Brilliant Blau, 10% (v/v) Essigsäure, 50% (v/v) Methanol
SDS-Laufpuffer	200 mM Glycin, 1% (w/v) SDS, 25 mM Tris
SDS-Probenpuffer	0,05% (w/v) Bromphenolblau, 35% (v/v) Glycerin, 3,55% (v/v) β-Mercaptoethanol, 6% (w/v) SDS, 500 mM Tris, pH 6,8
SDS-Trenngel	62,9% (v/v) 30%-Acrylamidlösung, 0,11% (w/v) APS, 0,11% (w/v) SDS, 27,3% (v/v) SDS-Trenngelpuffer, 0,03% (v/v) Temed
SDS-Trenngelpuffer	0,4% (w/v) SDS, 1,5 M Tris, pH 8,8
SDS-Sammelgel	67,8% (v/v) 30%-Acrylamidlösung, 0,1% (w/v) APS, 0,1%(w/v) SDS, 17% (v/v) SDS-Sammelgelpuffer, 0,1% (v/v) Temed
SDS-Sammelgelpuffer	0,4% (w/v) SDS, 0,5 M Tris, pH 6,8
SrtA-Aktivitätspuffer	5 mM CaCl ₂ , 5 mM Glycinamid, 150 mM NaCl, 1 mM TCEP, 300 mM Tris, pH 7,4
SrtA-Bindungspuffer	5 mM CaCl ₂ , 50 mM NaCl, 1 mM TCEP, 50 mM Tris, pH 7,4

4. Material

4.9 Medien

LB	0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) pankreatisch abgebautes Casein, pH 7,6
TSB	3% (w/v) Caseinpepton-Sojapepton Bouillon, 0,3% (w/v) Hefeextrakt, pH 7,1 (für Agarplatten zusätzlich 1,5% (w/v) Agar)
2YT	1% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, 2% (w/v) pankreatisch abgebautes Casein, pH 7,6

Alle Medien werden in H₂O_{dest.} angesetzt und anschließend 20 min. bei 121°C in einem Autoklaven sterilisiert. Antibiotika werden ggf. anschließend zugesetzt (Zugabe 0,1% (v/v) einer sterilfiltrierten 1000 x Stocklösung in H₂O_{dest.} bzw. 100% Ethanol (Chloramphenicol)).

4.10 Software

Expasy	(http://www.expasy.org)
GraFit 5.0	(Erithacus Software, UK)
MagTran	(Freeware)
Origin 7.0	(OriginLab, Northampton, MA, USA)

5. Methoden

5.1 Herstellung und Analytik der verwendeten Peptide (durchgeführt von Sascha Gentz)

5.1.1 Peptidherstellung

Die für diese Arbeit verwendeten Peptide (Tabelle 1, Seite 29) werden ausgehend von einem HMPB-BHA (4-(4-Hydroxymethyl-3-methoxyphenoxy)butyryl-benzhydrylamine) -Harz (0,7 - 1,3 mmol/g) von Sigma Aldrich (Taufkirchen) nach Fmoc-Strategie mittels automatisierter Festphasensynthese hergestellt (Merrifield, 1963, Kent, 1988).

5.1.1.1 Beladung Harz, Aufbau eines PPO-Linkers

Das HMPB-BHA-Harz wird dem Protokoll (NovaBiochem Catalog, Method 2-10, 2.32) folgend mittels symmetrischer Anhydride mit Fmoc-L-Ala-OH vorbeladen.

Der aus drei Einheiten bestehende PPO-Linker (Polyethylenglykol Polyamid Oligomer), (Peptide 1-10) wird nach Marsac (Marsac et al., 2006) synthetisiert.

5.1.1.2 Automatisierte Peptidsynthese

Die Peptidsynthese erfolgt an einem ABI 433A Peptidsynthesizer nach FastMoc (Applied Biosystems, jetzt Life Technologies, 433A Peptide Synthesizer User Guide, Revision D., 2004, Vol. 1) Protokoll. Für die Fmoc-Schutzgruppenchemie wird das Aktivierungsprotokoll nach Atherton und Sheppard (Atherton und Sheppard, 1989) verwendet. Aminosäuren und Basen werden im Überschuss eingesetzt um effiziente Kopplungen zu erzielen.

Folgende Seitenschutzgruppen werden verwendet: Arg(Pbf), Asn(Trt), Asp(OtBu), Cys(Mmt), Gln(Trt), Glu(OtBu), His(Trt), Lys(Boc), Ser(tBu), Thr(tBu), Trp(Boc), Tyr(tBu).

Für die Peptide 1 und 3 wird Fmoc-L-Cys(Me)-OH und Fmoc-L-Cys(Bzl)-OH und für Peptid 13 wird Fmoc-L-Lys(Biotin)-OH als Aminosäurebaustein verwendet. Der Ahx-Linker zwischen N-Terminus und Fluorophor (Peptid 2) wird als Baustein unter den gleichen Bedingungen wie die Fmoc-Aminosäuren gekoppelt.

5.1.1.3 Fluorescein-Markierung am Harz

Die N-terminale Fluoresceinmarkierung (Peptide 1, 2, 5, 7, 9, 11-13) erfolgt nach Peptidsynthese am Harz unter Verwendung eines Fluoresceinaktivesters, 5-FAM,SE,

(zweimal ein molares Äquivalent) und Basenzugabe (DIPEA) (10 molare Äquivalente) erstmals für 2 h bei Raumtemperatur unter inerter Atmosphäre (Stickstoff) und lichtgeschützt, und ein zweites Mal über Nacht (= 15 h).

5.1.1.4 Abspaltung vom Harz

Das vakuumgetrocknete Harz wird für 3 h bei Raumtemperatur in 2,5% Wasser und 5% TIS in TFA (15 ml pro 1 g Harz) abgespalten. Das abgespaltene Peptid wird mit eiskaltem Diethylether gefällt, das Harz zweifach mit Diethylether gewaschen, das Peptid filtriert und vom Harz abzentrifugiert, in Puffer (50% Wasser, 50% Acetonitril (+0,1% TFA)) aufgenommen und im Vakuum über Nacht gefriergetrocknet.

5.1.1.5 Intramolekulare Verbrückung der Cysteine

Die abschließende intramolekulare Verbrückung der Cysteine erfolgt nach Abspaltung vom Harz in einem Volumenanteil 100 mM Ammoniumbicarbonatpuffer (pH 8,5) + 0,2 mM TCEP und 0,67 Volumenanteilen einer frisch angesetzten 5 mM Lösung DBX (Peptide 2, 4-8) oder TBX (Peptide 9,10) in Acetonitril. Der Reaktionsumsatz wird mittels analytischer RP-HPLC, wie angegeben, verfolgt und die Reaktionszeit angepasst (1 - 4 h).

5.1.2 Peptidaufreinigung und Analytik

RP-HPLC wird an einem HPLC System Gold bestehend aus Autosampler 508, programmierbarem Pumpensystem 126, einem Dioden-Array Detektor 168 und einem Fraktionssammler SC 100 durchgeführt. Es werden vorgepackte C18-Säulen (ProntoSIL-AQ, 5 µm) in analytischem und präparativem Maßstab verwendet. Als Puffer wird A (Wasser mit 0,1% TFA) und B (Acetonitril mit 0,08% TFA) in einem linearen Gradienten gemischt.

Präparative HPLC-Läufe werden mit einer Flussrate von 8 ml / min. durchgeführt. Die Fraktionsgröße variiert von 15 s bis 30 s pro Fraktion. Ein linearer Gradient von 5% B auf 65% B in 60 min. wird gefahren. Die Detektion erfolgt bei 214 und 280 nm bzw. 445 nm (Fluorescein). Die Konzentration der Proben liegt bei 1 mg / ml.

Analytische HPLC-Läufe werden mit einer Flussrate von 1 ml / min. durchgeführt. Ein linearer Gradient von 5% B auf 65% B in 30 min. wird gefahren. Die Konzentration der Proben liegt bei 0,5 mg / ml. Die Detektion erfolgt bei 214 nm und 280 nm bzw. 445 nm (Fluorescein). Die Peak-Fractionen werden gesammelt.

Die Molmassen der in den Fraktionen enthaltenen Peptide werden mittels ESI-MS detektiert.

5.1.3 Bestimmung der Peptidkonzentration

Die Lichtabsorption (A_x) von Peptidlösungen in SrtA-Bindepuffer (DMSO-Gehalt < 1%(v/v)) wurden mittels des Spektrometers Nanodrop 1000 gemessen. Für die Peptide 1, 2, 5, 7, 9 und 11-13 wurde der ϵ_{492} ($79000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) des Fluoresceins, für die Peptide 3 und 4 ϵ_{274} ($1400 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) des Tyrosins und für die Peptide 6, 8 und 10 ϵ_{280} ($5600 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) des Tryptophans zur Bestimmung der Konzentrationen der Peptidlösungen zugrunde gelegt. Die Berechnung erfolgte nach dem Lambert Beerschen Gesetz. Es ergibt sich:

$$\text{Peptidkonzentration (M)} = (A_x / 1\text{cm}) / \epsilon_x$$

5.2 Herstellung und Analytik der verwendeten Proteine

5.2.1 Klonierung

P1-GFP, P1_{scrambled}-GFP und MBP-P1 wurden kloniert, indem die Insert-Sequenzen (P1 bzw. P1_{scrambled}) jeweils als sense- und antisense-Oligonukleotide bestellt (siehe Tabelle 14, Seite 109) und paarweise hybridisiert wurden (Annealing). Die Oligonukleotidsequenzen wurden so entworfen, dass die erhaltenen Annealingprodukte bereits die jeweils passenden überstehenden Enden für die Ligation mit den geschnittenen Vektoren aufwiesen. Der Vektor pMAL-c5E bzw. der bereits vorliegende pET28a-Vektor mit dem GFP-Gen als Insert wurden einer Restriktion unterzogen, mittels Agarosegelelektrophorese von den herausgeschnittenen DNA-Fragmenten befreit, und anschließend wurden die aufgereinigten, geschnittenen Vektoren und die Annealingprodukte ligiert (Details siehe unten).

Die OvoA-Mutanten wurden kloniert, indem der bereits vorliegende pET28a Vektor mit dem OvoA_{wt}-Gen als Insert als DNA-Template für Mutations-PCRs genutzt wurde. Hierbei wurden für jede Mutation jeweils 3 PCRs (A, B und C) durchgeführt. Für PCR A wurde ein sense Primer, komplementär zum Anfang des OvoA-Gens, und ein antisense Primer, komplementär zur Region unmittelbar strangaufwärts der gewünschten Mutation (Klonierung OvoAH170A, OvoAH174A und OvoAE176) bzw. abgesehen von der gewünschten Mutation komplementär zur Mutationszielstelle (Klonierung OvoAR183A und OvoAR183K) eingesetzt. Für PCR B wurde ein sense Primer, abgesehen von der gewünschten Mutation komplementär zur Mutationszielstelle, und ein antisense Primer, komplementär zum Ende des OvoA-Gens, eingesetzt. Um nach der PCR-Reaktion das als Vektor vorliegende OvoA_{wt}-Template aus dem PCR-Produkt zu entfernen, wurden die Produkte der PCRs A und B mittels Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. Für PCR C wurden die aufgereinigten und vereinigten Produkte der PCRs A und B als Template eingesetzt und zur Amplifikation der

sense Primer aus PCR A und der antisense Primer aus PCR B verwendet. Da die PCR-Produkte der PCRs A und B im Bereich der gewünschten Mutation überlappen, hybridisieren während des Annealingschrittes der PCR C nicht nur die Primer mit den Templates, sondern auch die Templates im Bereich der eingefügten Mutation miteinander. Das Produkt der PCR C ist ein vollständiges OvoA-Gen mit der gewünschten Mutation (Overlap-Extension-PCR). Das PCR-Produkt wurde mittels Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. Das Produkt der jeweiligen PCR C und der pET28a-Vektor wurden einer Restriktion unterzogen und der geschnittene Vektor wurde mittels Agarosegelelektrophorese und das geschnittene PCR C-Produkt mittels des „QIAquick PCR Purification Kit“s aufgereinigt. Anschließend wurden die aufgereinigten Restriktionsprodukte ligiert (Details siehe unten). Tabelle 15 zeigt die im Rahmen der oben beschriebenen Klonierungsstrategien genutzten Inserts, Vektoren und Restriktionsenzympaare im Überblick.

Tabelle 15: Überblick Klonierungsstrategien. *Sequenzen der Oligonukleotide siehe Tabelle 13 (Seite 109)

zu exprimierendes Protein	Insert*	Vektor	Restriktionsenzympaar
MBP-P1	Annealing Oligonukleotide Nr. 1 + 2	pMAL-c5E	NcoI, HindIII
P1-GFP	Annealing Oligonukleotide Nr. 3 + 4	GFPpET28a	NcoI, NdeI
P1 _{scrambled} -GFP	Annealing Oligonukleotide Nr. 5 + 6	GFPpET28a	NcoI, NdeI
OvoA-Mutanten	jeweilige PCR C (siehe Punkt 4.2.1.3.2)	pET28a	NcoI, XhoI

5.2.1.1 Gewinnung von Plasmid-DNA

Die Plasmide (PCR-Templates, Vektoren), wurden in ausreichender Menge vervielfältigt, indem die Plasmide wie unter Punkt 5.2.1.7 beschrieben in hitzekompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert wurden und anschließend mit den Singlekolonien der Transformationagarplatten Übernacht-Kulturen (2 ml LB, 37°C, 140 rpm) angesetzt wurden. Für pMAL-c5E-Plasmide wurde dem LB-Medium 100 µg / ml Ampicillin und für alle anderen Plasmide 50 µg / ml Kanamycin zugesetzt. Von je 1,5 ml der Übernacht-Kulturen wurde die Plasmid-DNA mittels des „QIAprep Miniprep Kit“s nach Herstellerangaben gewonnen. Grundsätzlich wurden alle DNA-Proben bei -20°C aufbewahrt.

5.2.1.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Absorption der DNA-Lösung bei 260 nm wurde mittels des UV-Vis-Spektrometers Nanodrop 1000 gemessen. Eine OD-Einheit entspricht dabei einer ds-DNA-Konzentration von 50 ng / µl.

5.2.1.3 Insertgewinnung

5.2.1.3.1 Annealing der Oligonukleotidpaare der P1-Inserts

Von jedem Oligonukleotid eines sense / antisense Paares (siehe Tabelle 14, Seite 109) wurde je 1 µl einer 100 µM-Lösung in H₂O_{dest.,steril} zu 58 µl Annealingpuffer gegeben und der Ansatz anschließend 30 min. bei 96°C in einem Heizblock inkubiert. Der Heizblock wurde nach Ablauf der Inkubationszeit abgeschaltet, so dass die Annealingansätze sich langsam mit dem Heizblock auf Raumtemperatur abkühlen konnten.

5.2.1.3.2 Herstellung modifizierter OvoA-Gene mittels Overlap Extension PCR

Die Reaktionsansätze aller PCRs waren wie folgt zusammengesetzt:

DNA-Template:	PCR A und PCR B: 25 ng OvoA _{wt} pET28a PCR C: 15 ng Produkt aus PCR A + 15 ng Produkt aus PCR B
Polymerase:	Pfu, 2,5 units
Primerpaar:	siehe Tabelle 16, je 100 pMol
Puffer:	5 µl 10 x Pfu-Polymerase-Puffer
Nukleotide:	dNTP Mix, je 10 nMol
H ₂ O _{dest.,steril} :	auffüllen auf 50 µl

Tabelle 16: Primerpaare der PCRs

Gewünschte Mutation	Primerpaar*		
	PCR A	PCR B	PCR C
OvoAH170A	(7) + (9)	(10) + (8)	(7) + (8)
OvoAH174A		(11) + (8)	
OvoAE176A		(12) + (8)	
OvoAR183A	(7) + (14)	(13) + (8)	
OvoAR183K	(7) + (16)	(15) + (8)	

*Nummerierung und Sequenzen der Oligonukleotide siehe Tabelle 14 (Seite 109)

5. Methoden

Die genutzten PCR-Programme sind der Tabelle 17 zu entnehmen.

Tabelle 17: PCR-Programme

	Schritt 1		Schritt 2		Schritt 3		Schritt 4		Schritt 5		Anzahl Wdh. der Schritte 2-4
	°C	min.									
PCR A	95	2	95	0,5	54	0,5	72	1	72	10	25
PCR B					50/64*			3			
PCR C					54			4			

*OvoAH170A, OvoAH174A, OvoAH176A: 50 °C; OvoAR183A, OvoAR183K: 64°C

Die PCR-Produkte wurden über Agarosegelelektrophorese (0,7% Agarosegel mit Ehtidiumbromid, 140 V, 1 - 2 h) aufgetrennt, die DNA-Banden der gewünschten Größe auf einem UV-Schirm ausgeschnitten und die DNA mittels des „QIAquick Gel Extraction Kit“ nach Herstellerangaben aus den ausgeschnittenen Gelstücken gewonnen.

5.2.1.4 Restriktionsverdau

Die Restriktionsverdauungen der Vektor- und Insert-DNA wurden als Doppelverdauungen durchgeführt. Die Restriktionsansätze wurden bei 37°C für 90 min. inkubiert.

Restriktionsansatz:

Je 10 units der beiden Restriktionsenzyme (siehe Tabelle 15, Seite 115)

500 ng der zu schneidenden DNA (siehe Tabelle 15, Seite 115)

5 µl NEB 10 x-Puffer: Nr. 4 für NcoI / NdeI und NcoI / XhoI, Nr. 2 für NcoI / HindIII

0,5 µl 100 x BSA (nur für NcoI / XhoI)

H₂O_{dest.,steril}: auffüllen auf 50 µl

Die Vektorverdaue wurden wie im vorausgehenden Unterpunkt für die PCR-Produkte beschrieben mittels Agarosegelelektrophorese aufgereinigt. Ein ebenfalls auf das Agarosegel zum Vergleich aufgetragenes Aliquot des jeweils ungeschnittenen Vektors diente der Identifikation der Bande die den linearisierten Vektor enthält. Die PCR-Produktverdaue wurden mittels des „QIAquick PCR Purification Kit“ nach Herstellerangaben aufgereinigt.

5.2.1.5 Ligation

Die geschnittenen, aufgereinigten Vektoren und die geschnittenen, aufgereinigten PCR C Produkte bzw. hybridisierten Oligonukleotide (Kombinationen siehe Tabelle 15, Seite 115) wurden ligiert.

Ligationsansatz:

50 - 100 ng Vektor

50 ng des jeweiligen PCR-C-Produkts bzw. 2 µl des jeweiligen Annealing-Ansatzes

400 units T4 DNA-Ligase

2 µl 10x T4 DNA-Ligase-Puffer

H₂O_{dest.,steril}: auffüllen auf 20 µl

Inkubationsbedingungen: 4°C, 16h

5.2.1.6 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* XL1-Blue-Zellen

Mit einer *E. coli* XL1-Blue-Einzelkolonie wurden 100 ml LB-Medium inokuliert. Der Kultur wurden 10 µg / ml Tetracyclin zugesetzt und sie wurde bei 37°C und 140 rpm über Nacht inkubiert. Mit 10 ml der Übernacht-Kultur wurden 1 l LB-Medium mit 10 µg / ml Tetrazyclin inokuliert und die Kultur bei 37°C und 140 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 inkubiert. Die Zellen wurden dann mittels Zentrifugation (5070 x g, 4°C, 15 min.) pelletiert und die Pellets viermal mit 100 ml kaltem Glycerin (5%) gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 5 ml kaltem Glycerin (10%) resuspendiert und die Zellsuspension in 100 µl Aliquots aufgeteilt. Diese wurden unverzüglich in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.2.1.7 Transformation der Ligationsansätze in *E. coli* XL1-Blue-Zellen

10 µl des jeweiligen Ligationsansatzes wurden 1:1 mit H₂O_{dest.,steril} verdünnt, auf Eis mit einem Aliquot frisch aufgetauter elektrokompetenter *E. coli* XL1-Blue-Zellen vermischt und einer Elektroporation (1,5 kV, 800 Ω, 25 µF) unterzogen. Sofort im Anschluss wurde die Zellsuspension mit 1 ml 2YT-Medium aufgefüllt und 1,5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden je 150 µl dieser Kultur auf je einer LB-Agarplatten mit 100 µg / ml Ampicillin (MBP-P1) oder 50 µg / ml Kanamycin (alle anderen Konstrukte) ausgestrichen und die

Agarplatten bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Agarplatten bei 4°C gelagert.

5.2.1.8 Sequenzierung

Von den Einzelkolonien der Transformationsplatten wurde wie unter Punkt 5.2.1.1 beschrieben die Plasmid-DNA gewonnen und die korrekte Positionierung des einklonierten Inserts mittels DNA-Sequenzierung überprüft.

Ansatz der Sequenzierreaktion:

150 ng Plasmid DNA
4 µl Big-Dye-Terminator-Mix
2 µl 10 x Sequenzierungspuffer
3 pmol eines Primers*
H₂O_{dest.,steril.}: auffüllen auf 20 µl

*pET28a-Plasmide wurden mit den Oligonukleotiden Nr. 20 oder Nr. 21 sequenziert und pMAL-c5E-Plasmide mit dem Oligonukleotid Nr. 22. Da das OvoA-Gen ca. 2000 bp umfasst, wurden für die Sequenzierung der OvoA-Mutanten außer Oligonukleotid Nr. 20 auch die Oligonukleotide Nr. 17, 18 oder 19 eingesetzt. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in Tabelle Nr. 13 (Seite 108) aufgeführt.

Programm der Sequenzierreaktion:

Schritt 1: 10 s, 96°C
Schritt 2: 5 s, 55°C
Schritt 3: 4 min., 60°C

Anzahl Wiederholungen Schritt 1 - 3: 25

Aufreinigung des Sequenzierreaktions-Produkts:

Die DNA der jeweiligen 20 µl Sequenzierreaktions-Produkte wurde durch die Zugabe von 1 µl 125 mM EDTA, 2 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 50 µl 100% Ethanol und anschließender Inkubation für 30 min. auf Eis gefällt. Die DNA wurde anschließend mittels Zentrifugation (10000 rpm, 10 min.) pelletiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das gewaschene DNA-Pellet luftgetrocknet.

Sequenzierung des Sequenzierreaktions-Produkts

Die aufgereinigten Sequenzierreaktions-Produkte wurden mittels des „Abi Prism® 3130 Genetic Analyzer“ chromatographisch aufgetrennt und die DNA-Sequenz mittels der zugehörigen Software aus den während der Auftrennung detektierten Wellenlängen berechnet.

5.2.1.9 Herstellung von Glycerolstocks

Von den Einzelkolonien mit gewünschtem Plasmid der Transformationsagarplatten wurden 5 ml LB mit den Transformationsagarplatten entsprechendem Antibiotikagehalt inokuliert. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C und 140 rpm inkubiert. Anschließend wurden je 800 µl der Kultur mit 200 µl 80% Glycerin vermischt, 20 min. auf Eis gestellt und danach in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Glycerolstocks wurden bei -80°C gelagert.

5.2.2 Proteingewinnung

5.2.2.1 Herstellung hitzekompetenter *E. coli*-Zellen (Expressionsstämme)

Mit einer Einzelkolonie der Expressionsstämme BL21(DE3) oder Arctic(DE3) wurde eine 5 ml Übernachtskultur in LB-Medium inokuliert und bei 37°C und 140 rpm inkubiert. Den Arctic(DE3)-Kulturen wurde 20 µg / ml Gentamycin zugesetzt. Mit den 5 ml Übernachtskulturen wurden 500 ml LB-Medium in einem 2 l-Schikanekolben inokuliert und bei 37°C und 140 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Dann wurde die Kultur 10 min. auf Eis gestellt und anschließend die Zellen mittels Zentrifugation (8983 x g, 4°C, 5 min.) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml kaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und die Zellsuspension 20 min. auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen pelletiert (6084 x g, 4°C, 5 min.), das Zellpellet in 5 ml kaltem 0,1 M CaCl₂ +15% (v/v) Glycerin resuspendiert und die Suspension 30 min. auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Zellsuspension in 100 µl-Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

5.2.2.2 Hitzeschock-Transformation von Plasmiden in *E. coli*-Expressionsstämme

Die bereits zur Verfügung stehenden oder unter Punkt 5.2.1 klonierten Plasmide wurden zwecks heterologer Proteinexpression mittels Hitzeschock-Transformation in hitzekompetente *E. coli*-Expressionsstämme überführt. OvoBpET28a wurde in den Stamm

5. Methoden

Arctic(DE3) überführt und alle anderen Plasmide in BL21(DE3). Es wurden 50 - 100 ng des entsprechenden Plasmids mit einem 100 µl-Aliquot frisch aufgetauter hitzekompetenter Zellen vermischt und auf Eis 30 min. inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 2 min. in einem Heizblock bei 42°C inkubiert und sofort danach für einige Minuten auf Eis gestellt. Dann wurde der Ansatz mit 1 ml 2YT-Medium aufgefüllt und 1,5 h bei 37°C und 140 rpm inkubiert. Danach wurden je 150 µl der Kultur auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und Übernacht bei 37°C inkubiert. Für das auf dem pMAL-c5E-Vektor beruhenden Plasmid wurden Agarplatten mit 100 µg / ml Ampicillin und für alle anderen Plasmide Agarplatten mit 50 µg / ml Kanamycin genutzt. Um SrtA_{bio} zu exprimieren wurde eine Doppeltransformation durchgeführt. Es wurden je 50-100 ng des zur Verfügung stehenden Plasmids SrtA_{bio}pET28a (Kanamycin^r) und des Plasmids pBirAcm (Chloramphenicol^r, *Avidity Inc. (Denver, Co, USA)*) bei der Transformation eingesetzt, und LB-Agarplatten mit 50 µg / ml Kanamycin und 17 µg / ml Chloramphenicol zur Selektion verwendet. Wie unter Punkt 5.2.1.9 beschrieben, wurden von den Einzelkolonien der inkubierten Agarplatten Glycerolstocks hergestellt.

5.2.2.3 Proteinexpression

Für die Expression von MBP-P1 und MBP wurde LB-Medium mit 100 µg / ml Ampicillin verwendet, für die Expression aller anderen Proteine LB-Medium mit 50 µg / ml Kanamycin. Für die Expression von OvoB wurde dem LB-Medium zusätzlich zum Kanamycin 20 µg / ml Gentamycin zugesetzt. Für die Expression biotinylierter SrtA_{bio} wurde LB-Medium mit 50 µg / ml Kanamycin, 17 µg / ml Chloramphenicol und 50 µM Biotin genutzt. Für die Vorkulturen und die Hauptkulturen bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 wurden 37°C und 100 rpm als Inkubationsbedingungen genutzt. Es wurde mit 2 µl des entsprechenden Glycerolstocks eine Übernacht-Vorkultur angesetzt. Mit je 15 ml der Vorkultur wurden je 1,5 l Medium in 5 l Schikanekolben inokuliert.

Tabelle 18: Expressionsbedingungen

zu exprimierendes Protein	Kulturbehandlung unmittelbar vor der Induktion	Temperatur	Expressionsdauer
MBP-P1, MBP	-	37°C	2 h
SrtA _{ΔN59}	-	37°C	4 h
SrtA _{bio}	-	37°C	16 h
LPETG-GFP, P1-GFP, P1 _{scrambled} -GFP	-	30°C	16 h
OvoB, OvoA (wt und Mutanten)	30 min. auf Eis stellen + Zugabe von 3% (v/v) Ethanol	16°C	16 h

Bei einer OD_{600} von 0,6 wurde die heterologe Proteinexpression in den Hauptkulturen durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Kulturen wurden nach der Induktion weiterhin mit 100 rpm geschüttelt, die weiteren Expressionsbedingungen sind Tabelle 18 (Seite 121) zu entnehmen.

5.2.2.4 Proteinaufreinigung

Die Bakterienkulturen (1 - 9 Liter) wurden zentrifugiert ($8983 \times g$, 20 min., $4^{\circ}C$) und das Zellpellet anschließend (oder nach Lagerung bei $-20^{\circ}C$) in eiskaltem Aufschlusspuffer (50 - 100 ml) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde im Kühllabor mittels eines Mikrofluidicers aufgeschlossen (900 bar, 4 Durchgänge). Das gewonnene Zelllysate wurde zwecks Abtrennung unlöslicher Bestandteile zentrifugiert ($17210 \times g$, 30 min., $4^{\circ}C$) und der Überstand weiterverwendet.

Konstrukte mit His₆-Tag (alle Konstrukte exclusive MBP-P1 und MBP)

Der Zelllysateüberstand wurde mit Ni-NTA-Agarose versetzt (2 ml Ni-NTA-Agarose je Liter Bakterienkultur) und 1 h im Kühlraum mittels eines Rollinkubators inkubiert. Der Ansatz wird in eine leere Chromatographiesäule überführt und mit 50 ml Ni-NTA-Waschpuffer 1 gewaschen. Nach weiterem Waschen mit 25 ml Ni-NTA-Waschpuffer 2 wurden die an die Ni-NTA-Agarose gebundenen Proteine mittels Ni-NTA-Elutionspuffer in 500 μ l-Fractionen eluiert.

MBP-P1, MBP (Expression des Leervektors pMAL-c5E)

Der Zelllysateüberstand wurde mit Amylose-Harz versetzt (2 ml Amylose-Harz je Liter Bakterienkultur) und 1 h im Kühlraum mittels eines Rollinkubators inkubiert. Der Ansatz wurde in eine leere Chromatographiesäule überführt und mit 50 ml Amylosewaschpuffer gewaschen. Die über MBP an das Amylose-Harz gebundenen Proteine werden mittels Amylose-Elutionspuffer in 500 μ l-Fractionen eluiert.

Der relative Proteingehalt der Eluatfraktionen wurde mittels der Absorption bei 280 nm bestimmt. Die Hauptfraktionen wurden vereinigt und in Dialysekassetten über Nacht gegen 0,5 - 1 l Dialysepuffer 1 und anschließend 4 h gegen 0,5 - 1 l Dialysepuffer 2 im Kühlraum dialysiert (jeweilige Puffer siehe Tabelle 19, Seite 123).

5. Methoden

Tabelle 19: verwendete Dialysepuffer

Protein	Dialysepuffer 1	Dialysepuffer 2
OvoA (wt + Mutanten), OvoB	Gelfiltrationspuffer	Gelfiltrationspuffer mit 30% (v/v) Glycerolgehalt
SrtA Δ N59, SrtA _{bio} MBP-P1, MBP	SrtA-Bindungspuffer	SrtA-Bindungspuffer
LPETG-GFP P1-GFP, P1 _{scrambled} -GFP	SrtA-Bindungspuffer	SrtA-Bindungspuffer mit 30% (v/v) Glycerol-Gehalt

Nach der 2. Dialyse wurde die Proteinkonzentration mittels der Absorption bei 280 nm und dem Extinktionskoeffizienten (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) des jeweiligen Proteins bestimmt. Die Dialysate wurden anschließend aliquotiert (50 – 200 μ l), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.2.2.5 MBP-P1 Zyklisierung

Zur Zyklisierung von MBP-P1 mittels DBX wurde folgende Reaktion angesetzt und für 1,5 h bei RT inkubiert:

1 Volumen frisch aufgetaute MBP-P1-Aliquots (ca. 250 μ M)

3,9 Volumen SrtA-Bindungspuffer, pH 8,0

2,6 Volumen 2,1 mM DBX in Acetonitril (Kontrolle: 2,6 Volumen Acetonitril)

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Ansatz in SrtA-Bindungspuffer umgepuffert. Zunächst wurden 58,5 Volumen 0,6 fach SrtA-Bindepuffer pH 8,0 hinzugefügt und der Ansatz mittels 10 kDa Konzentratoren auf 1,5 Volumen reduziert (2097 x g, 24°C). Dann wurden 13,5 Volumen 0,6 fach SrtA-Bindungspuffer pH 8,0 hinzugefügt und der Ansatz erneut mittels 10 kDa Konzentratoren auf 1,5 Volumen reduziert (2097 x g, 24°C). Der Ansatz wurde dann in 10 kDa Dialysekassetten ein erstes Mal über Nacht und anschließend ein zweites Mal für 4 h gegen je 150 Volumen kalten SrtA-Bindungspuffers im Kühllabor dialysiert.

5.2.2.6 Gewinnung des (SrtA_{bio}:Avidinmonomer)₄-Komplexes

Es wurden 200 μ l 140 μ M aufgereinigter SrtA_{bio} in SrtA-Bindungspuffer und 50 μ l 300 μ M Avidintetramer in SrtA-Bindungspuffer gemischt und 1,5 h bei RT inkubiert. Der

Inkubationsansatz wurde anschließend auf eine analytische Superdex200-Säule aufgetragen. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0,5 ml / min. und SrtA-Bindungspuffer wurde als Laufpuffer verwendet. Die Proteinelution wurde bei 280 nM verfolgt. Es wurden drei Peaks detektiert. Dem Peak mit dem größten Elutionsvolumen wurde mittels SDS-PAGE SrtA_{bio} zugeordnet, und dem Peak mit dem mittleren Elutionsvolumen Avidin. Dem Peak mit dem geringsten Elutionsvolumen wurde mittels SDS-PAGE eine 1:1-Stöchiometrie von Avidinmonomeren und SrtA_{bio} zugeordnet. Die Fraktionen dieses Peaks wurden vereinigt, als (SrtA_{bio}:Avidinmonomer)₄-Komplex erachtet (da die quarternäre Struktur des Avidins ein Tetramer ist (Green, 1975), und bis zur zeitnahen Verwendung in Bindungsstudien bei 4°C aufbewahrt.

5.2.3 Proteinanalytik

SDS-PAGE

Um die Güte der Proteinaufreinigungen zu überprüfen, wurden 18% Lämmli-Gele gegossen, wobei die Sammelgellänge zwischen den unteren Taschenrändern und dem Trenngel ca. 1 cm betrug. Die Proben wurden mit einem Volumenanteil SDS-Probenpuffer vermischt und 2-3 min. in einem Heizblock bei 96°C inkubiert. Anschließend wurden sie in die Geltaschen übertragen. Die Gelelektrophorese wurde in SDS-Laufpuffer unter einer angelegten Spannung von 200 V für ca. 45-60 min. bei RT durchgeführt. Anschließend wurden die Gele mit H₂O_{dest.} gespült, in SDS-Färbelösung übertragen, zügig bis zum Siedepunkt erhitzt und anschließend 10 min. bei RT auf einem Schüttelinkubator gefärbt. Zur Entfärbung wurden die Gele mit H₂O_{dest.} gespült, in SDS-Entfärbelösung übertragen und einige Stunden oder über Nacht bei RT auf einem Schüttelinkubator entfärbt. Zur Dokumentation wurden die Gele nach dem Entfärben gescannt oder fotografiert.

Analytische Gelfiltration

Zur Charakterisierung von Protein-Tertiärstrukturen wurden bei RT Größenausschlusschromatographien unter nativen Bedingungen im analytischen Maßstab durchgeführt. Die Flussrate betrug 0,5 ml / min. und die Proteinelution wurde mittels Detektion der Lichtabsorption bei 280 nM verfolgt. Tabelle 20 (Seite 125) zeigt zusammenfassend die für die unterschiedlichen Proteine eingesetzten Gelfiltrationssäulen und Puffer. Die Auftrennung erfolgte an einer „ÄKTA purifier“-Anlage.

5. Methoden

Tabelle 20: eingesetzte Gelfiltrationssäulen und Puffer

Proteinprobe	Gelfiltrationssäule	Puffer
OvoA _w t	Superdex 200, Superdex 75	Gelfiltrationspuffer
OvoAH170A	Superdex 75	Gelfiltrationspuffer
OvoAH174A	Superdex 75	Gelfiltrationspuffer
OvoAE176E	Superdex 75	Gelfiltrationspuffer
OvoB	Superdex 200	Gelfiltrationspuffer
SrtA _{ΔN59}	Superdex 75	SrtA-Aktivitätspuffer
P1-GFP	Superdex 75	SrtA-Aktivitätspuffer
SrtA _{ΔN59} + P1-GFP	Superdex 75	SrtA-Aktivitätspuffer
SrtA _{ΔN59} + LPETG-GFP	Superdex 75	SrtA-Aktivitätspuffer
SrtA _{ΔN59} + P1 _{scrambled} -GFP	Superdex 75	SrtA-Aktivitätspuffer

5.3 Messungen

5.3.1 Fluoreszenzpolarisations-Messungen

Das Prinzip der Fluoreszenzpolarisierung wird unter 6.1 erläutert. Die Dissoziationskonstanten und IC₅₀-Werte der Peptide / Fusionsproteine bezüglich SrtA_{ΔN59} wurden mittels Endpunktkinetiken bestimmt.

5.3.1.1 K_d-Bestimmung direkt

Die K_d-Werte der fluoreszenzmarkierten Peptide und SrtA konnten direkt bestimmt werden. Eine 1:1-Verdünnungsreihe der SrtA_{ΔN59} bzw. des Komplexes (SrtA_{bio}:Avidinmonomer)₄ wurde in einer 384-Well-Platte vorgelegt und anschließend eine konstante Konzentration des Peptides (siehe Tabelle 21, Seite 126) hinzugegeben. Als Puffer wurde SrtA-Bindungspuffer verwendet. Das Endvolumen in jedem Well betrug 50 µl. Für jedes Peptid wurde die SrtA_{ΔN59}- bzw. (SrtA_{bio}:Avidinmonomer)₄-Verdünnungsreihe mindestens als Triplikat, und als Kontrolle eine Verdünnungsreihe des SrtA-Puffers (SrtA-Bindungspuffer) angefertigt.

5. Methoden

Tabelle 21: eingesetzte Peptidkonzentrationen für die direkte K_d -Bestimmung

Peptid	SrtA-Variante	Peptid-Endkonzentration
P1 _{5FAM} (linear)	SrtA $_{\Delta N59}$	46 nM
P1 _{5FAM} (zyklisch)	SrtA $_{\Delta N59}$	506 nM
P2 _{5FAM}	SrtA $_{\Delta N59}$	100 nM
P3 _{5FAM}	SrtA $_{\Delta N59}$	100 nM
P1 _{5FAM} (linear)	(SrtA _{bio} :Avidinmonomer) ₄	228 nM
P1 _{5FAM} (zyklisch)	(SrtA _{bio} :Avidinmonomer) ₄	253 nM

Die 384-Well-Platte wurde anschließend mit PCR-Film versiegelt, mit Alufolie abgedeckt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Fluoreszenzpolarisationswerte mittels des Plattenlesegerätes „Safire2“ bei RT ausgelesen. Es wurden folgende Einstellungen verwendet: Anregungswellenlänge: 470 nm, emittierte Wellenlänge: 520 nm, Bandweite: 5 nm, Anzahl Messungen: 50, „Gain“: optimal. Die K_d -Werte wurden aus den erhaltenen Fluoreszenzpolarisationswerten ermittelt, indem die Fluoreszenzpolarisationswerte als Mittelwerte der mehrfach angefertigten Verdünnungsreihen gegen den Logarithmus der SrtA-Konzentration aufgetragen wurden, und mittels der Software „GraFit 5.0“ Gleichung [2] (siehe Anhang) an die Datenpunkte angepasst wurde. Es wurde je eine Funktionsanpassung mit zum einen konstanter (siehe Tabelle 21), und zum anderen variabler Peptidkonzentration durchgeführt. Der K_d -Wert der Peptide und SrtA $_{\Delta N59}$ wird jeweils als gemittelter Wert der Ergebnisse dieser beiden Funktionsanpassungen angegeben.

5.3.1.2 K_d -Bestimmung indirekt

Die K_d -Werte der unmarkierten Peptide / Fusionsproteine und SrtA $_{\Delta N59}$ wurden indirekt über Verdrängungs-Titrationen im 384-Well-Format bestimmt. Hierbei wurde das unmarkierte Peptid / Fusionsprotein zu einer konstanten Konzentration des entsprechenden fluoreszenzmarkierten Peptids titriert und anschließend eine konstante Konzentration SrtA $_{\Delta N59}$ hinzugegeben (siehe Tabelle 22, Seite 127). Das Endvolumen in jedem Well betrug 50 μ l und als Puffer wurde SrtA-Bindungspuffer verwendet. Für jedes unmarkierte Peptid / Fusionsprotein wurden die Titrationen als Dreifachbestimmung, und als Kontrolle eine entsprechende Titration des Peptidlösemittels (DMSO) bzw. des Fusionsprotein-Puffers (SrtA-Bindungspuffer) durchgeführt.

5. Methoden

Tabelle 22: eingesetzte Peptid- und Proteinkonzentrationen für die indirekte K_d -Bestimmung

unmarkiertes Peptid / Fusionsprotein	fluoresceinmarkiertes Peptid	Endkonzentration fluoresceinmarkiertes Peptid	Endkonzentration SrtA Δ N59
P1 _{unmarkiert} (linear)	P1 _{5FAM} (linear)	18,24 nM	400 nM
P1 _{unmarkiert} (zyklisch)	P1 _{5FAM} (zyklisch)	20,24 nM	400 nM
P2 _{unmarkiert}	P2 _{5FAM}	50 nM	1 μ M
P3 _{unmarkiert}	P3 _{5FAM}	40 nM	800 nM
MBP-P1 _{nativ}	P1 _{5FAM} (linear)	18,24 nM	400 nM
MBP-P1 _{zyklisch}	P1 _{5FAM} (linear)	18,24 nM	400 nM
MBP-P1 _{Kontrolle}	P1 _{5FAM} (linear)	18,24 nM	400 nM

Die 384-Well-Platte wurde anschließend mit PCR-Film versiegelt, mit Alufolie abgedeckt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Fluoreszenzpolarisationswerte entsprechend Punkt 5.3.1.1 ausgelesen. Die K_d -Werte wurden aus den erhaltenen Fluoreszenzpolarisationswerten ermittelt, indem die Fluoreszenzpolarisationswerte als Mittelwerte der mehrfach angefertigten Verdünnungsreihen gegen den Logarithmus der Konzentration des verwendeten unmarkierten Peptids / Fusionsproteins aufgetragen wurden, und mittels der Software „Origin 7.0“ Gleichung [3] (siehe Anhang) an die Datenpunkte angepasst wurde. Aus den durch diese Funktionsanpassungen erhaltenen EC_{50} -Werten der jeweiligen Verdrängungskurve, sowie dem zuvor bestimmten K_d -Wert (Punkt 5.3.1.1) des jeweils eingesetzten fluoresceinmarkierten Peptids, dessen Konzentration und der eingesetzten SrtA Δ N59-Konzentration (Tabelle 22) wurden mittels Gleichungen [4] und [5] (siehe Anhang) die K_d -Werte der unmarkierten Peptide / Fusionsproteine und SrtA Δ N59 berechnet.

5.3.1.3 Ermittlung der IC_{50} -Werte der unmarkierten Peptide / Fusionsproteine bezüglich SrtA Δ N59

5.3.1.3.1 Etablierung des SrtA-Aktivitätsassays

Ermittlung der Bindungsaffinität von LPETGKG_{5FAM,Biotin} und Avidin

Zur Überprüfung des Bindungsvermögens zwischen dem SrtA-Substrat LPETGKG_{5FAM,Biotin} und Avidin wurde im 384-Well-Format Avidin zu einer konstanten Substratkonzentration von 360 nM titriert. Das Endvolumen in jedem Well betrug 50 μ l und als Puffer wurde SrtA-Aktivitätspuffer verwendet. Die Titration wurde als Triplikat angefertigt und als Kontrolle der Avidinpuffer (SrtA-Aktivitätspuffer) zu 360 nM Substrat titriert. Die 384-Well-Platte wurde

anschließend mit PCR-Film versiegelt, mit Alufolie abgedeckt und bei RT 30 min. inkubiert. Anschließend wurden die Fluoreszenzpolarisationswerte entsprechend Punkt 5.3.1.1 ausgelesen. Der K_d -Wert wurde aus den erhaltenen Fluoreszenzpolarisationswerten ermittelt, indem die Fluoreszenzpolarisationswerte als Mittelwerte der mehrfach angefertigten Verdünnungsreihen gegen den Logarithmus der Avidinmonomer-Konzentration aufgetragen wurden, und mittels der Software „GraFit 5.0“ Gleichung [2] (siehe Anhang) an die Datenpunkte angepasst wurde. Die Substratkonzentration wurde bei der Funktionsanpassung als Konstante von 360 nM definiert.

Ermittlung der optimalen SrtA $_{\Delta N59}$ -Konzentration

Um zu überprüfen, welche SrtA $_{\Delta N59}$ -Konzentration zur Substratspaltung optimaler Weise einzusetzen ist, wurde SrtA $_{\Delta N59}$ zu 360 nM LPETGKG $_{5FAM,Biotin}$ im 384-Well-Format titriert. Es wurde SrtA-Aktivitäts-Puffer als Puffer verwendet und das Endvolumen in jedem Well betrug 50 μ l. Die Titration wurde im Triplett angefertigt und als Kontrolle der SrtA $_{\Delta N59}$ -Puffer (SrtA-Aktivitätspuffer) zu 360 nM Substrat titriert. Die 384-Well-Platte wurde anschließend mit PCR-Film versiegelt, mit Alufolie abgedeckt und 17 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 μ l in SrtA-Aktivitätspuffer gelöstem 8 μ M tetramerem Avidin gestoppt und nach einer 30 min. Inkubation bei RT die Fluoreszenzpolarisationswerte entsprechend Punkt 5.3.1.1 ausgelesen.

Bestimmung von $K_{m,app.}$ und $k_{cat,app.}$ für LPETGKG $_{5FAM,Biotin}$ und SrtA $_{\Delta N59}$

Um die kinetischen Parameter $K_{m,app.}$ und $k_{cat,app.}$ für LPETGKG $_{5FAM,Biotin}$ und SrtA $_{\Delta N59}$ zu bestimmen, wurden im 384-Well-Format a) 14 μ M, b) 21 μ M, c) 28 μ M und d) 35 μ M LPETGKG $_{5FAM,Biotin}$ mit 0,5 μ M SrtA $_{\Delta N59}$ für, 2 h, 2,75 h, 3,5 h und 4,25 h bei 37°C in SrtA-Aktivitätspuffer inkubiert. Als Kontrollen für den P_{max} -Wert wurden a) 14 μ M, b) 21 μ M, c) 28 μ M und d) 35 μ M LPETGKG $_{5FAM,Biotin}$ ohne SrtA $_{\Delta N59}$ für 2h bei 37°C in SrtA-Aktivitätspuffer inkubiert. Als Kontrollen für den P_{min} -Wert wurden a) 14 μ M, b) 21 μ M, c) 28 μ M und d) 35 μ M LPETGKG $_{5FAM,Biotin}$ mit 127 μ M SrtA für 5h bei 37°C in SrtA-Aktivitätspuffer inkubiert. Während der Inkubation wurde die 384-Well-Platte mit PCR-Film versiegelt und mit Alufolie abgedeckt. Das Endvolumen in jedem Well betrug 50 μ l. Die Messreihe wurde als Triplikat angefertigt. Die Reaktionen wurden nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeit mit einem ca. dreifachen molaren Überschuss an tetramerem Avidin gegenüber Substrat gestoppt. Es wurden 10 μ l a) 280 μ M, b) 420 μ M, c) 560 μ M, d) 700 μ M tetrameres Avidin gelöst in SrtA-Aktivitätspuffer zugegeben. Nach

einer Inkubationszeit von wenigstens 30 min. wurden die Fluoreszenzpolarisationswerte entsprechend Punkt 4.3.1.1 ausgelesen. Die gemessenen Fluoreszenzpolarisationswerte wurden mittels der Gleichungen [6] und [7] (siehe Anhang) in Substratkonzentrationen umgerechnet. Da sich die Fluoreszenzintensität des Fluoresceins durch die Bindung an Avidin verringert, wurde eine Korrektur des S_t - Wertes vorgenommen. Mit Hilfe der Gleichungen [8], [9] und [10] (siehe Anhang) wurden die korrekten S_t -Konzentrationen berechnet. Die berechneten korrigierten S_t -Werte wurden gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Gleichung [1] (siehe Anhang) konnte linear an die Datenpunkte angepasst werden, und dadurch die $SrtA_{\Delta N59}$ -Geschwindigkeiten für jede S_0 -Konzentration ermittelt werden. Die Daten des Zeitpunktes $t = 2$ h wurden herangezogen um die kinetischen Parameter für $SrtA_{\Delta N59}$ und $LPETGKG_{5FAM,Biotin}$ zu bestimmen. Die Geschwindigkeiten v in s^{-1} wurden nach Lineweaver-Burk (Gleichung [12], siehe Anhang) aufgetragen. Gleichung [1] wurde linear an die Datenpunkte angepasst. Der Schnittpunkt mit der x-Achse entspricht $-1 / K_m$, der Schnittpunkt mit der y-Achse entspricht $1 / V_{max}$, und die Steigung b entspricht K_m / V_{max} .

5.3.1.3.2 Messung der IC_{50} -Werte

Die Ermittlung der IC_{50} -Werte der unmarkierten Peptide / Fusionsproteine / pHMB bezüglich $SrtA_{\Delta N59}$ wurde im 384-Well-Format in $SrtA$ -Aktivitätspuffer durchgeführt. Das jeweilige unmarkierte Peptid / Fusionsprotein / pHMB wurde zu $LPETGKG_{5FAM,Biotin}$ (360 nM) titriert und anschließend $SrtA_{\Delta N59}$ (0,5 μ M) hinzugegeben. Für den $SrtA$ -Inhibitor pHMB wurde außerdem eine P_{max} -Kontrolle ohne $SrtA_{\Delta N59}$ angefertigt. Das Endvolumen in jedem Well betrug 50 μ l. Die Titrations wurden im Triplikat durchgeführt und als Kontrolle wurde eine Titration des Peptid- / Fusionsprotein- / pHMB-Puffers ($SrtA$ -Aktivitätspuffer) durchgeführt. Die 384-Well-Platte wurde anschließend mit PCR-Film versiegelt, mit Alufolie abgedeckt und 17 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Reaktionen durch Zugabe von 17 μ l 8 μ M tetramerischem Avidin (gelöst in $SrtA$ -Aktivitätspuffer) gestoppt, und nach 30 min. Inkubation bei RT die Fluoreszenzpolarisationswerte entsprechend 5.3.1.1 ausgelesen. Die IC_{50} -Werte wurden aus den erhaltenen Fluoreszenzpolarisationswerten ermittelt, indem die Fluoreszenzpolarisationswerte als Mittelwerte der dreifach angefertigten Verdünnungsreihen gegen den Logarithmus der Konzentration des unmarkierten Peptids / Fusionsproteins / pHMB aufgetragen wurden, und mittels der Software „Origin 7.0“ Gleichung [3] (siehe Anhang) an die Datenpunkte angepasst wurde. Die aus diesen Funktionsanpassungen erhaltenen EC_{50} -Werte entsprechen den IC_{50} -Werten des jeweiligen unmarkierten Peptids / Fusionsproteins / pHMB an $SrtA_{\Delta N59}$.

5.3.1.4 Bestimmung des K_{off} -Wertes für den Komplex SrtA $_{\Delta N59}$:P1 $_{5FAM}$ (linear)

Es wurden im 384-Well-Platten-Format 384 nM SrtA $_{\Delta N59}$ und 40 nM P1 $_{5FAM}$ (linear) in SrtA-Bindungspuffer (Endvolumen = 125 μ l) 105 min. bei RT inkubiert. Während der Inkubation war die 384-Well-Platte mit PCR-Film versiegelt und mit Alufolie abgedeckt. Anschließend wurden 13,5 μ l 100 μ M P1 $_{\text{unmarkiert}}$ (linear) (gelöst in SrtA-Bindungspuffer) hinzugegeben, und sofort im Anschluss die Fluoreszenzpolarisationswerte des Ansatzes entsprechend 5.3.1.1 über 30 min. in 25 s-Intervallen ausgelesen. Der Verdrängungsansatz („Verdrängung“) wurde im Triplikat angefertigt und vermessen. Ebenfalls im Triplikat wurde ein P_{max} - und ein P_{min} -Kontrollansatz angefertigt und vermessen. Für den P_{max} -Kontrollansatz („ P_{max} “) wurden statt 13,5 μ l 100 μ M P1 $_{\text{unmarkiert}}$ (linear) 13,5 μ l SrtA-Bindungspuffer hinzugegeben, und für den P_{min} -Kontrollansatz („ P_{min} “) keine SrtA $_{\Delta N59}$ zugesetzt. Die erhaltenen Fluoreszenzpolarisationswerte wurden wie folgt ausgewertet. Für jeden Messzeitpunkt t wurde der mP-Mittelwert für P_{min} , P_{max} und den Verdrängungsansatz aus der jeweiligen Dreifachbestimmung berechnet. Aus diesen Werten wurde das Konzentrationsverhältnis des zum Messzeitpunkt t an SrtA $_{\Delta N59}$ gebundenen P1 $_{5FAM}$ (linear) (= „ EI_t “) und des zum Reaktionsstartzeitpunkts an SrtA $_{\Delta N59}$ gebundenen P1 $_{5FAM}$ (linear) (= „ EI_0 “) durch folgende Gleichung ermittelt:

$$EI_t / EI_0 = \frac{\text{Verdrängung}_t - P_{\text{min}_t}}{P_{\text{max}_t} - P_{\text{min}_t}}$$

$\ln((EI)_t/(EI)_0)$ wurde gegen die Reaktionszeit (s) aufgetragen und Gleichung [1] (siehe Anhang) wurde linear an die Datenpunkte angepasst. Mit Hilfe dieser Funktionsanpassung können der K_{off} -Wert und die Halbwertszeit des Komplexes SrtA $_{\Delta N59}$:P1 $_{5FAM}$ (linear) berechnet werden. Der Kehrwert von K_{off} ergibt sich aus dem Zeitpunkt, für den $\ln((EI)_t/(EI)_0)$ den Wert -1 annimmt. Die Halbwertszeit ergibt sich aus der Multiplikation des Kehrwertes von K_{off} mit 0,6931 (Copeland, 2005).

5.3.2. ITC-Messungen

Die für eine Messung eingesetzten Bindungspartner wurden in 10 kDa- (SrtA $_{\Delta N59}$) oder 30 kDa- (MBP-Fusionsproteine) Dialysekassetten gegen ein gemeinsames Pufferreservoir (SrtA-Bindungspuffer) über Nacht im Kühllabor dialysiert, dann wurde das Pufferreservoir erneuert und die Dialyse für weitere 4 h fortgesetzt. Das Pufferreservoir entsprach dem 100 fachen des Volumens der Proteinlösungen. Nach der zweiten Dialyse wurden die Konzentrationen der beiden Proteinlösungen mit Hilfe der Absorption bei 280 nm und dem

5. Methoden

entsprechenden Extinktionskoeffizienten (<http://expasy.org/tools/protparam.html>, die AS-Sequenzen der hergestellten Proteine sind unter 6.4 aufgeführt) ermittelt. Der Puffer des jeweiligen Dialyse-Reservoirs der zweiten Dialyse wurde genutzt, um die Proteinlösungen auf eine gewünschte Konzentration einzustellen, das ITC-Gerät zu spülen und die jeweiligen Pufferkontrollmessungen durchzuführen. Die ITC-Messungen wurden unverzüglich nach Beendigung der Dialyse durchgeführt. Für die Proben-Entgasung und -Temperierung wurde die dem ITC-Gerät zugehörige ThermoVac-Einheit genutzt. Tabelle 23 zeigt die in den einzelnen Messungen eingesetzten Bindungspartner-Konzentrationen.

Tabelle 23: eingesetzte Proteinkonzentrationen der ITC-Messungen

Messung	Zelle		Spritze	
	Bindungspartner	Konzentration	Bindungspartner	Konzentration
1	Puffer	-	SrtA Δ N59	515 μ M
2	MBP	75 μ M	SrtA Δ N59	1,4 mM
3	MBP-P1 _{nativ}	30 μ M	SrtA Δ N59	515 μ M
4	MBP-P1 _{zyklisch}	29 μ M	SrtA Δ N59	507 μ M
5	MBP-P1 _{Kontrolle}	32 μ M	SrtA Δ N59	524 μ M

Für alle ITC-Messungen wurden folgende Einstellungen verwendet: Zelltemperatur: 25° C, „Reference Power“: 18 μ cal / sec., „Initial Delay“: 60 sec., Rührgeschwindigkeit: „307“, Anzahl Injektionen: 60. Für die erste Injektion wurden folgende Einstellungen verwendet: Volumen: 2 μ l, Dauer: 4 s, „Spacing“: 240 s, Filter: 2. Für die Injektionen Nummer 2 – 60 wurden folgende Einstellungen verwendet: Volumen: 8 μ l, Dauer: 16 s, „Spacing“: 240 s, Filter: 2. Die aufgezeichneten Rohdaten entsprechen der aufgezeichneten Wärmeänderung (Δ H) während der gesamten Messdauer. Jede Injektion erzeugt einen Δ H-Peak. Mittels der Gerätesoftware werden die Rohdaten umgerechnet in die integrierte Reaktionswärme pro Injektion bzw. molares Verhältnis der Bindungspartner. Die graphische Auftragung der integrierten Reaktionswärme gegen das molare Verhältnis der Bindungspartner ergibt einen sigmoidalen Kurvenverlauf. Gleichung [3] (siehe Anhang) wird an die Datenpunkte angepasst. Die Differenz zwischen A1 (hier entspricht A1 dem maximalen Δ H-Wert) und A2 (hier entspricht A2 dem minimalen Δ H-Wert) entspricht der Bindungsenthalpie Δ H der Reaktionspartner pro Mol. Mit Hilfe der aus den Funktionsanpassungen erhaltenen Parameter und der Gleichungen [13] - [15] (siehe Anhang) wurde die jeweilige Bindungsstöchiometrie N berechnet. Die Bindungsentropie Δ S pro Mol Bindungspartner wurde mittels Gleichungen [17] - [18] (siehe Anhang) und den ermittelten K_d -Werten (5.3.1.2) der Bindungspartner berechnet.

5.3.3 HPLC-Messungen

5.3.3.1 Umsetzung des Substrates LPETGKG_{5FAM,Biotin} durch SrtA_{ΔN59}

Es wurden 166 μM SrtA_{ΔN59} mit 15,5 μM LPETGKG_{5FAM,Biotin} in SrtA-Aktivitätspuffer 15 h bei 37° C inkubiert. Das Reaktionsvolumen betrug 1 ml und die Endkonzentration des Peptidlösemittels DMSO betrug 2,2% (v/v). Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne SrtA_{ΔN59}. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 100 μl 125 mM EDTA, welches die SrtA-Bindungstasche durch Komplexbildung des Ca²⁺-Ions denaturiert, gestoppt. Substrat- oder Produktmoleküle werden dadurch aus der SrtA-Bindungstasche freigesetzt. Nach 105 min. EDTA-Inkubation bei RT und 600 rpm wurde SrtA_{ΔN59} (19 kDa) mittels eines 10 kDa-Konzentrators von Edukt und Reaktionsprodukten (<1,3 kDa) getrennt. Der Durchfluss wurde mittels eines 1 ml-Loops auf eine analytische C18-Säule gegeben und mittels eines Acetonitrilgradienten (5 – 65% in 30 min., Flussrate 1 ml / min.) aufgetrennt. Die Elution wurde bei 445 nM verfolgt. Die Auftrennung erfolgte an einer „ÄKTA purifier + Frac920“-Anlage. Mittels ESI-MS wurden die Molmassen der in den gesammelten Peak-Fractionen enthaltenen Moleküle detektiert. Die Peakflächen des Haupt- und des Nebenproduktes wurden mittels der Software „Origin 7.0“ berechnet.

5.3.3.2 Inhibitionsmechanismus der fluoresceinmarkierten Peptide an SrtA_{ΔN59}

Die fluoresceinmarkierten Peptide und SrtA_{ΔN59} wurden in SrtA-Aktivitätspuffer bei 37°C über Nacht inkubiert (siehe Tabelle 24). Als Kontrollen dienten entsprechende Ansätze ohne SrtA_{ΔN59}. Die Kontrollansätze ohne SrtA wurden nach der Inkubation nicht weiter behandelt. Sie wurden mittels eines 1ml-Loops auf eine analytische C18-Säule aufgegeben. Der Kontrollansatz von P1_{5FAM} (linear) wurde mittels eines 10 ml-Loops aufgegeben. Als zusätzliche Kontrolle wurde eine entsprechende Molmenge P1_{5FAM} (linear) ohne jegliche Inkubation mit SrtA-Aktivitätspuffer auf 1 ml aufgefüllt (Endkonzentration DMSO: 33,3%) und mittels eines 1 ml-Loops auf die C18-Säule gegeben.

Tabelle 24: Inkubationsansätze von SrtA_{ΔN59} und den fluoresceinmarkierten Peptiden

Peptid	[Peptid]	[DMSO]	[SrtA _{ΔN59}]	Reaktionsvolumen
P1 _{5FAM} (linear)	1,52 μM	3,3% (v/v)	16,6 μM	10 ml
P1 _{5FAM} (zyklisch)	16 μM	3,2% (v/v)	166 μM	1 ml
P2 _{5FAM}	15,5 μM	4,24% (v/v)	166 μM	1 ml
P3 _{5FAM}	16 μM	3,6% (v/v)	166 μM	1 ml

Die Ansätze mit SrtA_{ΔN59} wurden nach der Inkubation über Nacht bei 37°C mit je 500 µl Ni-NTA-Agarose versetzt und 3 h bei RT gerollt. Anschließend wurden sie in eine leere Säule (Glass Econo Column, Biorad, München) gegeben und mit 500 µl SrtA-Aktivitätspuffer gewaschen. Dann wurden die Peptidinhibitoren mit 6 M Guanidinium-Puffer in 150 µl Fraktionen eluiert. Die drei Hauptfraktionen (identifiziert anhand der gelben Farbe des Fluoresceins) wurden jeweils vereinigt und mittels eines 1 ml-Loops auf eine analytische C18-Säule gegeben. Die Auftrennung aller Proben erfolgte durch einen Acetonitrilgradienten (5 - 65% in 30 min., Flussrate 1 ml / min.). Die Elution wurde bei 445 nM verfolgt. Die Auftrennung erfolgte an einer „ÄKTA purifier + Frac920“-Anlage. Mittels ESI-MS wurden die Molmassen der in den gesammelten Peaks enthaltenen Moleküle detektiert.

5.3.3.3 Vergleich der Aktivität von OvoA_{wt} und diverser OvoA-Mutanten

Es wurden Reaktionsansätze mit jeweils 1 µM (Vergleich OvoA_{wt} mit OvoAR183A und OvoAR183K) oder 6,3 µM (Vergleich von OvoA_{wt} mit OvoAH170A, OvoAH174A und OvoAE176A) der entsprechenden OvoA-Variante, 1 mM Histidin, 3 mM Cystein, 20 mM Tris-HCl, pH 8, 20 mM NaCl, 2 mM TCEP und 0,1 mM FeSO₄ angesetzt. Um Fe²⁺-abgereicherte OvoA_{wt} zu vermessen, wurde dem entsprechenden Reaktionsansatz 5 mM EDTA zugesetzt. Die Reaktionen wurden 1 h bei 25° C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 0,2 Volumen 1% TFA abgestoppt. Die abgestoppten Reaktionen wurden auf eine Kationentauschersäule gegeben. Als mobile Phase diente 10 mM H₃PO₄ pH 2. Die Auftrennung erfolgte mittels eines NaCl-Gradienten. Die Elution wurde bei 220 nM verfolgt. Die Auftrennung erfolgte an einer „HPLC System Gold“-Anlage. Mittels ESI-MS wurden die Molmassen der in den gesammelten Peaks enthaltenen Moleküle detektiert.

5.3.4 *In vivo*-Studien an *S. aureus*-Zellen

S. aureus-Flüssigkulturen wurden mit TSB-Medium angesetzt und bei 37°C und, soweit nicht anders vermerkt, 130 rpm inkubiert. *S. aureus*-Einzel-Kolonien wurden auf TSB-Agarplatten bei 37°C gezogen und die Agarplatten anschließend bei 4°C aufbewahrt.

5.3.4.1 Bindung der fluoresceinmarkierten Peptide an *S. aureus*-Zellen

Eine *S. aureus*-Übernacht-Kultur wurde 1:100 mit Medium verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 heranwachsen lassen. Diese Kultur wurde erneut 1:100 mit frischem Medium verdünnt und je 40 ml dieser Verdünnung mit 50 nM des zu untersuchenden

fluoresceinmarkierten Peptids versetzt. In 250 ml-Erlenmeyerkolben ohne Schikanen wurden für jedes fluoresceinmarkierte Peptid mindestens drei unabhängige 40 ml-Kulturen angesetzt. Diese wurden bei 160 rpm inkubiert. Während des Wachstums der Kulturen wurden alle 20 min. 1 ml Proben genommen und die OD₆₀₀ der Proben bestimmt. Die Proben wurden in einem Eisbad aufbewahrt. Im Kühllabor wurden alle Proben der Messreihe eines Peptids für 10 min. bei 14000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und die Überstände in eine 384-Well-Platte überführt. Für jede Probe wurden je vier Wells mit je 50 µl Überstand befüllt. Die Fluoreszenzintensitäten wurden unverzüglich mit dem Plattenlesegerät „Safire2“ gemessen. Es wurden folgende Einstellungen verwendet: Anregungswellenlänge: 488 nm, emittierte Wellenlänge: 520 nm, Bandweite: 5 nm, „Gain“: optimal, Anzahl der Messungen: 20, „integration time“: 2000 µs, „Lag time“: 0 s, „FlashMode“: „High sensitivity“. Für jedes Peptid wurden alle Proben und eine Kontrolle zur Hintergrundfluoreszenz (= Überstand von 10 min. bei 14000 rpm zentrifugiertem TSB-Medium) in derselben 384-Well-Platte zum gleichen Zeitpunkt vermessen. Die erhaltenen Fluoreszenzintensitätsdaten einer 384-Well-Platte (= der Messreihe zu einem Peptid) wurden wie folgt ausgewertet. Zunächst wurden für jeden Probenzeitpunkt bzw. OD₆₀₀-Wert der Fluoreszenzintensitätsmittelwert für die 3 – 6 Kulturen und die prozentuale Standardabweichung berechnet. Dann wurde von den erhaltenen Mittelwerten die Hintergrundfluoreszenz subtrahiert. Die dadurch erhaltenen Fluoreszenzintensitätswerte wurden mit der vorher ermittelten jeweiligen prozentualen Standardabweichung gegen die OD₆₀₀-Mittelwerte der 3-6 Kulturen zum entsprechenden Probenahmezeitpunkt aufgetragen. Gleichung [1] (siehe Anhang) wurde linear an die Datenpunkte angepasst um den 100%-Fluoreszenzintensitätswert für OD₆₀₀ = 0 zu ermitteln. Bezogen auf diesen 100%-Wert wurden dann die von der Hintergrundfluoreszenz bereinigten Fluoreszenzintensitätsmittelwerte der einzelnen Probenahmezeitpunkte in % umgerechnet, und die Datenpunkte als RUF (%) gegen die OD₆₀₀ aufgetragen. Durch die lineare Anpassung von Gleichung [1] an die Datenpunkte wurde die Steigung m (in Gleichung [1] = b) in $\Delta RUF (\%) / OD_{600}$ erhalten.

5.3.4.2 Untersuchungen zur *in vivo* Inhibition von SrtA durch das Peptid P2_{unmarkiert} anhand der Bestimmung des Fibrinogen-Clumpingtiters

Es wurde TSB-Medium mit einer *S. aureus*-Einzel-Kolonie angeimpft und bei 37°C und 130 rpm über Nacht inkubiert. Dann wurde die Kultur 1:100 mit frischem TSB-Medium verdünnt und ein Volumen von 40 ml in einem 250 ml-Erlenmeyerkolben bei 37°C und 130 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 inkubiert. Dann wurde die Kultur mit sterilem Glycerol (75%) gemischt, auf Eis für 20 min. inkubiert und anschließend aliquotiert. Die Aliquots

wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Zur Bestimmung der Fibrinogen-Clumpingtiter wurden die Aliquots 1:50 mit TSB-Medium verdünnt, wobei Medienzusätze einer Endkonzentration von entweder 1% (v/v) DMSO, oder 27,8 µM P2_{unmarkiert} und 1% (v/v) DMSO, oder 27,8 µM P2_{scrambled,unmarkiert} und 1% (v/v) DMSO verwendet wurden. Für jeden Medienzusatz wurden 3 unabhängige Kulturen angesetzt. Ein Kulturvolumen von 40 ml wurde je in 250 ml Erlenmeyerkolben bei 37°C bei 160 rpm inkubiert. Es wurden von jeder Kultur vier Proben im Laufe der exponentiellen Wachstumsphase genommen und die OD₆₀₀ bestimmt. Jede Probe wurde unverzüglich einmal mit TSB-Medium gewaschen, mit TSB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 2,3 eingestellt, und im Volumenverhältnis 9:5 (Endvolumen: 140 µl) zu einer Fibrinogenverdünnungsreihe in TSB-Medium (96-Well-Platten-Format) gegeben. Sofort im Anschluss wurden die Ansätze 6 min. bei RT und 600 rpm geschüttelt und danach unverzüglich die geringste Fibrinogenendkonzentration, die zu einer sichtbaren Verklumpung führte (= Fibrinogen-Clumpingtiter), notiert.

5.3.5 UV / VIS-Messungen zur Bestimmung der katalytischen Effizienz von OvoB bezüglich diverser Substrate

Die Absorption bei 340 nM der entsprechend Tabelle 25 (Seite 136) in OvoB-Puffer 1 angesetzten Reaktionsansätze wurde in einer Quarzküvette mittels eines UV-2401PC-Spektrometers (118 µl-Ansätze) oder eines DU650-Spektrometers (354 µl-Ansätze) verfolgt. Die OvoB-Konzentration wurde so gewählt, dass die Absorptionsabnahme bei 340 nM sich über einige Minuten linear zur Inkubationszeit verhielt. Der Lichtweg durch den Reaktionsansatz in der Küvette beträgt 1 cm. Mittels der Software UV-Probe 2.21 wurde aus den Messdaten die Absorptionsabnahme in ΔmA / min. erhalten. Die Umsatzgeschwindigkeit von OvoB in s⁻¹ wurde wie folgt berechnet:

$$v(s^{-1}) = \frac{\Delta mA * -1}{60s * 1cm * 6200000mA * M^{-1} * 1cm^{-1} * OvoB(M)}$$

Die Messungen wurden als Triplikate durchgeführt. Die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen der erhaltenen OvoB-Umsatzgeschwindigkeiten v (s⁻¹) wurden gegen die jeweiligen molaren Substratkonzentrationen aufgetragen, und Gleichung [11] (siehe Anhang) an die Datenpunkte angepasst. Aus den Funktionsanpassungen wurden K_m und k_{cat} erhalten. Zeigten die Graphen keinen hyperbolischen Verlauf, so wurde (Gleichung [1]) (siehe Anhang) linear an die Datenpunkte angepasst, wobei der Betrag der erhaltenen Steigung b der katalytischen Effizienz k_{cat} / K_m entspricht.

5. Methoden

Tabelle 25: Reaktionsansätze zur Bestimmung der katalytischen Effizienz von OvoB bezüglich diverser Substrate

Substrat	Eingesetzte Substrat-konzentrationen (mM)	OvoB (µM)	LDH (units)	Reaktionsvolumen
S-(4-Histidyl)-L-Cystein-Sulfoxid	0,045 / 0,033 / 0,022 / 0,011 / 0,0045	0,848	1	118 µl
S-(β-Amino-β-Carboxyethyl)-Ergothionein-Sulfoxid	0,30 / 0,25 / 0,20 / 0,15 / 0,097 / 0,052	0,51	1	118 µl
Thialysin	11 / 8,5 / 3,4 / 1,7 / 0,88 / 0,42	0,051	1	118 µl
L-Cystein	6,8 / 5,1 / 3,4 / 1,7 / 0,88 / 0,42	8,5	1	118 µl
Cystathion	0,82 / 0,66 / 0,49 / 0,33 / 0,16 / 0,082	0,051	3	354 µl
S-Methyl-L-Cystein	10 / 5,2 / 1,0 / 0,52 / 0,26 / 0,13 / 0,052	0,051	3	354 µl
S-Methyl-L-Cystein-Sulfoxid	17 / 8,5 / 4,2 / 1,7 / 0,57 / 0,85 / 0,28	0,051	3	354 µl
S-Ethyl-L-Cystein	8,5 / 4,2 / 2,2 / 0,85 / 0,42 / 0,28 / 0,21	0,051	3	354 µl
O-Acetylserin	8,5 / 4,2 / 2,1 / 1,7 / 0,85 / 0,28	0,85	3	354 µl

Der Umsatz von D/L-3-Phenylserin durch OvoB wurde anhand der Lichtabsorption des Reaktionsproduktes Benzaldehyd bei 279 nm verfolgt. Es wurden in OvoB-Puffer 1 354 µl-Reaktionsansätze mit 2,5 µM OvoB und 1,7 mM, 4,2 mM, 5,7 mM, 11 mM oder 17 mM D/L-3-Phenylserin angesetzt und in einer Quarzküvette die Absorptionszunahme bei 279 nm mittels eines DU650-Spektrometers verfolgt. Der Lichtweg durch den Reaktionsansatz in der Küvetten beträgt 1 cm. Mittels der Software UV-Probe 2.21 wurde aus den Messdaten die Absorptionsabnahme in $\Delta mA / \text{min}$. erhalten. Die Umsatzgeschwindigkeit von OvoB in s^{-1} wurde wie folgt berechnet:

$$v(s^{-1}) = \frac{\Delta mA}{60s * 1cm * 1400000mA * M^{-1} * 1cm^{-1} * OvoB(M)}$$

Die Messungen wurden als Triplikate durchgeführt. Die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen der erhaltenen OvoB-Umsatzgeschwindigkeiten $v (s^{-1})$ wurden gegen die eingesetzte molare Substratkonzentration aufgetragen und Gleichung [11] (siehe Anhang) an die Datenpunkte angepasst. Aus der Funktionsanpassung wurden K_m und k_{cat} erhalten.

6.1 Prinzip der Fluoreszenzpolarisation

Moleküle bzw. Molekülkomplexe rotieren in Lösung um die eigene Achse. Sie tun dies umso langsamer, je größer sie sind. So kann z.B. ein Bindungsereignis anhand der Verminderung der Rotationsgeschwindigkeiten der Bindungspartner nachgewiesen werden. Ein Komplex rotiert langsamer um die eigene Achse, als die entsprechenden freien Bindungspartner, da er größer ist. Umgekehrt kann man die Dissoziation eines Komplexes anhand der Erhöhung der Rotationsgeschwindigkeiten der Bindungspartner nachweisen. Die Rotationsgeschwindigkeiten von fluorophormarkierten Molekülen lassen sich über Fluoreszenzpolarisationsmessungen miteinander vergleichen. Wird ein Fluorophor mit polarisiertem Licht seiner Anregungswellenlänge bestrahlt, so weist das von ihm emittierte Licht die gleiche Polarisation auf, sofern der Fluorophor keine Molekülbewegung erfährt. In Lösung rotiert das Molekül jedoch innerhalb der Zeitspanne zwischen Fluoreszenzanregung und Fluoreszenzemission (= Fluoreszenzlebensspanne), weshalb es zu einer teilweisen Depolarisation des emittierten Lichts kommt (siehe Abb. 70).

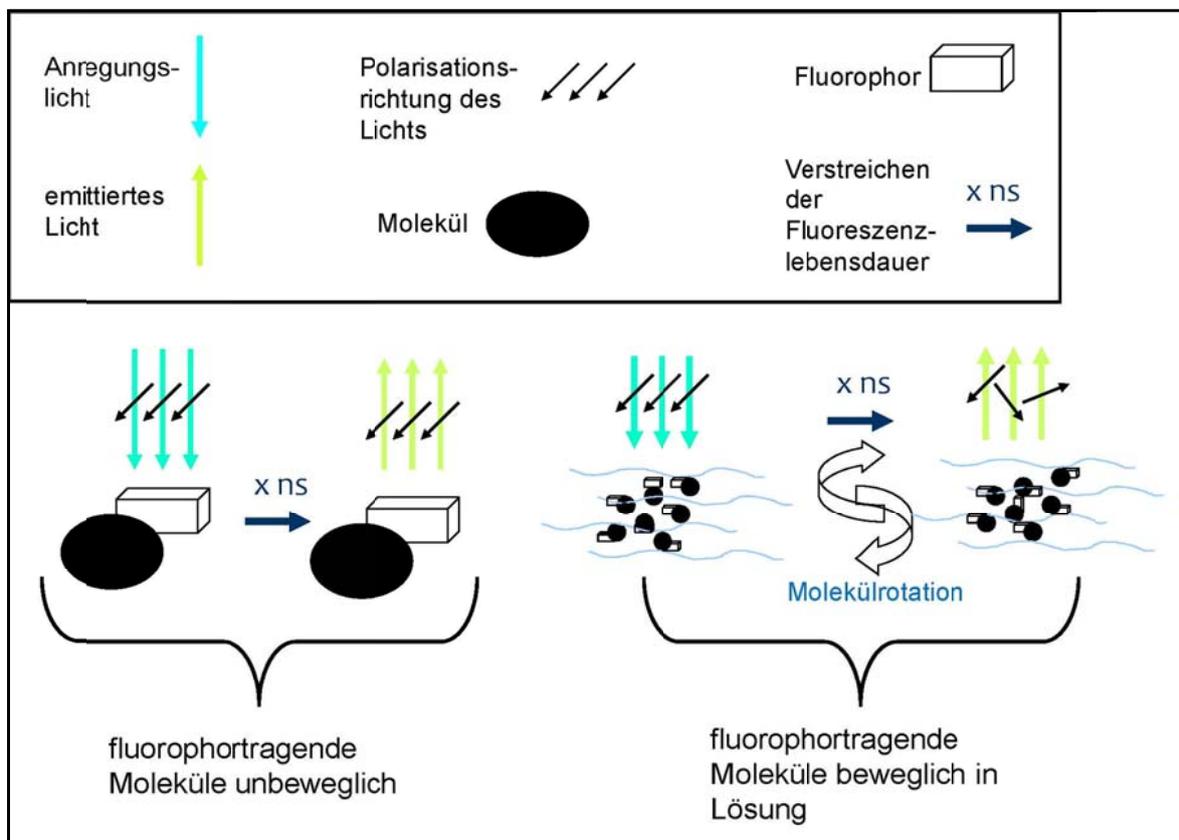


Abb.70: Schematische Darstellung des Prinzips der Fluoreszenzpolarisation

Je größer das fluoreszenzmarkierte Molekül (oder der fluoreszenzmarkierte Molekülkomplex) ist, desto langsamer ist die Rotationsgeschwindigkeit, und desto geringer ist der Anteil depolarisierten Emissionslichtes. Ein Fluoreszenzpolarisationsdetektor misst die Fluoreszenzintensität des emittierten Lichts sowohl in paralleler (I_{vv}), als auch in orthogonaler Polarisationsrichtung (I_{vh}) bezogen auf die Polarisationsrichtung des Anregungslichtes. Aus dem Verhältnis der beiden gemessenen Fluoreszenzintensitäten ergibt sich nach Gleichung [16] (siehe Seite 143) der Wert für die Fluoreszenzpolarisation (P), der üblicherweise als Millipolarisation (mP) angegeben wird. Je niedriger der Anteil depolarisierten Emissionslichtes ist, je höher ist die gemessene I_{vv} im Vergleich zur gemessenen I_{vh} und desto höher ist der resultierende mP-Wert. Geht ein freies fluorophormarkiertes Molekül eine Bindung ein, so hat dies eine Verringerung der Rotationsgeschwindigkeit und somit eine Verringerung des Anteils depolarisierten Emissionslichtes zur Folge, was sich in einem Anstieg der mP-Werte niederschlägt. Dissoziiert der Komplex, fallen die mP-Werte wieder ab. Der Bereich der differenzierbaren Rotationsgeschwindigkeiten hängt von der Fluoreszenzlebenszeit des gewählten Fluorophors ab. Die obere Grenze ist gegeben durch eine Rotation um 360° während der Fluoreszenzlebenszeit. Schnellere Rotationen führen zu keiner weiteren Verringerung der mP-Werte und sind daher nicht mehr differenzierbar.

Da die Sensitivität des Fluoreszenzpolarisationsdetektors begrenzt ist, muss die Größe des freien fluoreszenzmarkierten Moleküls um ein Mehrfaches kleiner als die des Komplexes sein. Für Bindungsstudien sollte also grundsätzlich der kleinste Bindungspartner fluoreszenzmarkiert sein. Des Weiteren muss die Konzentration des Fluorophors innerhalb einer Messreihe konstant sein. In Titrationsstudien muss also die Konzentration des unmarkierten Bindungspartners variiert werden. Hier sollten Kontrolltitrationen des Puffers des unmarkierten Bindungspartners vermessen werden, da Änderungen der Viskosität des Lösemittels die Rotationsgeschwindigkeiten und dadurch die mP-Werte gegebener Moleküle beeinflussen.

6.2 Prinzip der Isothermalen Titrations Kalorimetrie (ITC)

Mittels ITC-Messungen können die thermodynamischen Parameter einer Reaktion, z.B. einer Komplexbildung, (ΔG , ΔH , ΔS und K_d) ermittelt werden. Eine Komplexbildung zweier Moleküle läuft dann freiwillig ab, wenn die freie Energie ΔG einen negativen Wert annimmt. Die freie Energie ΔG lässt sich für eine Bindung anhand ihres K_d -Wertes und der herrschenden Temperatur mittels Gleichung [17] (siehe Seite 143) berechnen. Diese Information lässt aber die Frage nach den der Bindung zugrundeliegenden Ursachen offen. Nach der Gibbs-Helmholtz-Gleichung [18] (siehe Seite 143) setzt sich die freie Energie ΔG aus der Enthalpie ΔH und der Entropie ΔS zusammen. Eine Bindung wird demnach durch negative Enthalpie- und positive Entropiewerte begünstigt, bzw. durch negative Werte des Terms $-T\Delta S$. Eine negative freie Energie ΔG könnte also durch drei unterschiedliche Reaktionsprofile zustande kommen. Die Reaktion könnte erstens enthalpisch oder zweitens entropisch getrieben sein, oder drittens ein hoher, die Bindung verhindernder, Entropieverlust könnte durch einen höheren, die Bindung begünstigenden Enthalpiewertverlust kompensiert werden. Die Entropie ist ein Maß für die Unordnung eines Systems. Durch ein Bindungsereignis verringert sich die Unordnung, da die Bindungspartner durch die Bindung Rotations- und Translationsfreiheiten einbüßen. Der Entropieverlust ist hierbei geringer, wenn es sich um starre Moleküle mit geringer Rotationsfreiheit handelt. Dieser bei einem Bindungsereignis auftretende Entropieverlust kann ausgeglichen werden. Während der Ausbildung einer Bindung werden von den Bindungsstellen Lösemittelmoleküle freigesetzt, welche dadurch einen Gewinn an Bewegungsfreiheiten erfahren und einen Entropiegewinn herbeiführen. Die Enthalpie ist ein Maß für die Bindungsstärke. Negative ΔH -Werte einer Bindung werden insbesondere durch die Ausbildung von Salz- und Wasserstoffbrücken hervorgerufen. Die Kenntnis der Werte für ΔH und ΔS ermöglicht also Einblicke in das Bindungsgeschehen. Wie ist das Verhältnis zwischen Rotationsfreiheitsverlusten und der Freisetzung von Lösemittelmolekülen? Werden viele Salz- und oder Wasserstoffbrücken ausgebildet? Eine direkte Bestimmung von ΔH einer Bindung ist mittels ITC möglich. Ist der K_d -Wert bekannt, so ergibt sich die Entropie ΔS der Bindung aus der Enthalpie ΔH und dem K_d -Wert mittels Gleichungen [17] und [18].

Bei der ITC wird die Änderung der Temperatur ΔH einer Lösung während des Ablaufs einer exothermen Reaktion, wie z. B. einer Komplexbildung, gemessen. Hierzu werden eine Messzelle und eine Referenzzelle auf die gleiche Temperatur gebracht. Soll eine Komplexbildung charakterisiert werden, wird in die Messzelle, in der ein Bindungspartner vorgelegt ist, der zweite Bindungspartner mittels Injektionen aus einer Spritze hinzutitriert. Die durch jede Titrationsinjektion gestartete Bindungsreaktion in der Messzelle setzt

entweder Wärme frei oder verbraucht sie. Die elektrische Energie, die aufgewendet werden muss, um Referenzzelle und Messzelle auf der gleichen Temperatur zu halten, wird während der gesamten Titration aufgezeichnet und die in der Messzelle umgesetzte Wärme daraus berechnet. Integriert man die Reaktionswärme und trägt sie gegen das molare Verhältnis der Bindungspartner auf, so erhält man einen sigmoidalen Kurvenverlauf. Die Steilheit der sigmoidalen Kurve wird von dem Verhältnis Rezeptorkonzentration / K_d bestimmt (C-Wert). Liegt er unter 10, ist die Kurve so flach, dass sie nicht charakterisiert werden kann. Ein C-Wert zwischen 10 und 100 führt zu mittelsteilen Kurven, aus denen der K_d -Wert gut bestimmt werden kann. C-Werte über 5000 sind geeignet, um sehr genau ΔH und N zu bestimmen, der K_d -Wert hingegen kann bei hohen C-Werten nicht bestimmt werden.

Welche Parameter mit welcher Sicherheit für eine gegebene Bindungsreaktion mittels ITC bestimmbar sind, hängt also von der Löslichkeit der Bindungspartner, dem K_d -Wert und der auftretenden Wärmedifferenz pro Mol Reaktionspartner ab. Bei einem K_d -Wert im millimolaren Bereich kann ein C-Wert von >10 oft nicht erreicht werden, da die Bindungspartner nicht die hierzu erforderliche Löslichkeit aufweisen. Bei K_d -Werten im nanomolaren Bereich können häufig keine Messungen mit C-Werten <100 durchgeführt werden, da die hierzu zu verwendenden Bindungspartnerkonzentrationen zu gering sind, um eine detektierbare Wärmeänderung hervorzurufen.

6.3 Verwendete Gleichungen

Gleichung [1]:

$$y = a + b * x$$

Gleichung [2]:

$$y = f_{\min} + \frac{\left[(p + L + K) - \left[(p + L + K)^2 - 4 * p * L \right]^{0.5} \right] * (f_{\max} - f_{\min})}{2 * p}$$

p = Peptidkonzentration, L = SrtA-Konzentration (= x-Variable), K = K_d -Wert,
 f_{\max} = P_{\max} , f_{\min} = P_{\min} , P = Fluoreszenzpolarisation

Gleichung [3]:

$$y = \frac{A1 - A2}{1 + (x / EC_{50})^p} + A2$$

$A1$ = P_{\max} , $A2$ = P_{\min} , p = power, P = Fluoreszenzpolarisation

Gleichungen [4], [5]:

$$K_{d,u} = \frac{EC_{50} * K_{d,l} * 0.5 * B}{(L_T + R_T) + 0.5 * B * (R_T - L_T + 0.5 * B - K_{d,l})} \quad [4]$$

$$B = \frac{K_{d,l} + L_T + R_T - \sqrt{\left[(K_{d,l} + L_T + R_T)^2 - 4 * R_T * L_T \right]}}{2} \quad [5]$$

$K_{d,u}$ = Dissoziationskonstante des unmarkierten Peptides und SrtA $_{\Delta N59}$,

$K_{d,l}$ = Dissoziationskonstante des fluoresceinmarkierten Peptides und SrtA $_{\Delta N59}$,

L_T = totale Konzentration des fluoresceinmarkierten Peptides,

R_T = totale Konzentration an SrtA $_{\Delta N59}$,

B = Konzentration des an SrtA $_{\Delta N59}$ gebundenen fluoresceinmarkierten Peptides

Gleichungen [6], [7]

$$P_t = P_{\max} [S_t] + P_{\min} [S_0 - S_t] \quad [6]$$

$$S_t = (P_t - P_{\min} [S_0]) / (P_{\max} - P_{\min}) \quad [7]$$

S_0 = Startkonzentration des Substrates, S_t = Substratkonzentration zum Zeitpunkt t ,
 P_t = Fluoreszenzpolarisation zum Zeitpunkt t , P = Fluoreszenzpolarisation

Gleichungen [8], [9], [10]:

$$S_t = (R - P_{\min}) [S_0] / (P_{\max} - P_{\min}) \quad [8]$$

$$R = \frac{\{(\partial * P_{\max}) + P_{\min}\}}{1 + \partial} \quad [9]$$

$$\partial = \{(P_{\text{obs}} - P_{\min}) / (P_{\max} - P_{\text{obs}})\} I_{\min} / I_{\max} \quad [10]$$

I_{\min} bzw. I_{\max} = entsprechende totale Fluoreszenzintensitäten zu P_{\min} bzw. P_{\max} ,
 P_{obs} = gemessene Fluoreszenzpolarisation zum Zeitpunkt t ,
 P = Fluoreszenzpolarisation

Gleichungen [11], [12]:

$$v = \frac{V_{\max} * [A]}{K_m + [A]} \quad [11] \text{ Michaelis-Menten-Gleichung}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} * \frac{1}{[A]} \quad [12] \text{ reziproke Darstellung von Gleichung [11]}$$

$[A]$ = Substratkonzentration, v = Geschwindigkeit bei gegebener $[A]$

V_{\max} = maximale Geschwindigkeit bei Substratsättigung,

K_m = Substratkonzentration, bei der die Geschwindigkeit halbmaximal ist

Gleichungen [13], [14], [15]

Aus der 1. Ableitung der Gleichung [3] am Wendepunkt EC_{50} ergibt sich die Steigung m der Tangente am Wendepunkt EC_{50} :

$$m = \frac{-p * (A1 - A2)}{2} \quad [13]$$

Die Tangentengleichung am Wendepunkt EC_{50} der Gleichung [6] lautet also:

$$f(x) = (y(EC_{50}) - m * EC_{50}) + m * x \quad [14]$$

Setzt man die Tangentengleichung = $A2$ und löst nach x (in diesem Fall ist $x = N$) auf, so ergibt sich für die Berechnung von N :

$$N = \frac{A2 - (y(EC_{50}) - m * x)}{m} \quad [15]$$

Gleichung [16]:

$$P = (I_{vv} - G * I_{vh}) / (I_{vv} + G * I_{vh})$$

P = Polarisation, I_{vv} = Fluoreszenzintensität in, im Vergleich zum Anregungslicht, paralleler Polarisationsrichtung, I_{vh} = Fluoreszenzintensität in, im Vergleich zum Anregungslicht, orthogonaler Polarisationsrichtung, G = Gewichtungsfaktor: korrigiert Empfindlichkeitsunterschiede zwischen den Detektorsystemen für die Fluoreszenzintensitäten in paralleler und orthogonaler Polarisationsrichtung

Gleichungen [17], [18]

$$\Delta G = -RT * \ln(K_a) \quad [17]$$

$$\Delta G = \Delta H - T * \Delta S \quad [18] \quad \text{Gibbs-Helmholtz-Gleichung}$$

ΔG = freie Energie, R = Gaskonstante, T = Temperatur in ° Kelvin,

K_a = Assoziationskonstante, ΔH = Enthalpie, ΔS = Entropie

Referenzen: [2]: Copeland, 2005; [4],[5]: Kenakin, 1993; [6],[7]: Bolger und Checovich, 1995, Dandiker et al., 1981; [8],[9], [10]: Levine et al., 1997

6.4 Aminosäuresequenzen der hergestellten Proteine

SrtA_{ΔN59}:

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMQAKPQIPKDKSKVAGYIEIPDADIKEPVYPGPATPEQLNR
 GVSFAEENESLDDQNISIAGHTFIDRPNYQFTNLKAAKKGSMVYFKVGNETRKYKMTSIRDV
 KPTDVGVLDEQKGGKDKQLTLITCDDYNEKTGVWEKRKIFVATEVK

SrtA_{bio}:

MGHHHHHHSLNDIFEAQKIEWHEHMQAQKQIPKDKSKVAGYIEIPDADIKEPVYPGPATPEQ
 LNRGVSFAEENESLDDQNISIAGHTFIDRPNYQFTNLKAAKKGSMVYFKVGNETRKYKMTSI
 RDVKPTDVGVLDEQKGGKDKQLTLITCDDYNEKTGVWEKRKIFVATEVK

MBP-P1_{nativ}:

MKIEEGKLVWINGDKGYNGLAEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIIFW
 AHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYNKDLLPNP
 PKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENKDYDIKDVGVDNA
 GAKAGLTFLVDLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVNYGVTVLP
 TFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAVALKSYYYY
 LVKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKDAQTNSSSN
 NNNNNNNNLGDDDDKVPHMSMGCKYEVLPPHGKFCVCGAPSR

GFP-Fusionsproteine:

X_nMGSGASKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVP
 WPTLVTTLCYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEG
 DTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNVSHNVYIMADKQKNGIKVNFKTRHNIEDGSVQLA
 DHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYK

P1-GFP:	X _n = M G C K Y E V L P P H G K F V C G A H H H H H H
P1 _{scrambled} -GFP:	X _n = M Y L K E V C G H P G K V F P A G C H H H H H H
LPETG-GFP:	X _n = M C H H H H H H L P E T G

OvoA_{wt}: die in den jeweiligen Mutanten ausgetauschten Aminosäuren sind hervorgehoben

MAKWEHDVTAQQHQTGLPAPTRMLTSSGGDPQQKRLQILSDFSKTWELYESLFDCLTDER
AWYTKAISLRHPLIFYGHTATFYINKLMAGGLIDARVDDRIEATMAIGVDEMSSWDDLDNSHY
SWPSLAELRDYRGKVRHLVEQFIQQMPLTLPIGWDSPAUVILMGIEHERIHLETSSVLIRQLP
LAWVSAQPHWPACPDARHDRMAVPANSLVQVAGRRVTQGKTDDTYGWDNEYGSLVTEV
KPFQASRMLVSHAEEFAFVAAGGYQNQRWWDEGWGWREFSAAEMPTFWRGSPQQPE
ELRLRLLAEEVAMPWDWPAEVNQLAAAFCRWKAEEETGLSIQLPAESEWMSLREQVEGDQ
PDWNDAPGNINLACWASSCPIDRFAQGEFFDLVGNVWQWTTTPINGFPGRVHPLYDDFS
TPTFDGKHTLIKGGSWISTGNEALKSARYAFRRHFFQHAGFRYVVSQHQESLHSNPYETDS
MVSQYLDYFQYGPYFAVENYAKALAKIACGISQHHQRALDIGCATGRASFELARHFEQVVG
MDYSARFIDVALQLTRGEDFRYVTQEEGDLVEYRQVHLPDFDLGPEQASRIRFVQGDACNL
KPQQEAWDLVLAANLIDRLRQPARFLADIAPMIRPGGVMLSSPYTWLEEFTPKENWLGIR
ENGEALSTYQALQRLLAADFEELAPPQDVPFVIRETARKYQHSVA-QLTLWRKRLEHHHHHH

OvoB:

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMLQLTESDIMPFNFDQRIDRRHSDSLKWKKYADRDILPLWI
ADTDFRAADCIIDALQQRVQQGVFGYGVTSALAEVAIERMESRFGWKIQPEWLVLPLGVV
TGINIAVRAFTEAHQSTVSATPIYPPFFLAPKLAGRQHLSAALRLEQQRWVLDLDSHEDRMS
GNEKLLLLCNPHNPGGTVYRRKELEAQLRFAQRHDLLVCSDEIHCDLVLEPGVQHIPFASLS
DDAAQRSITLMSPSKSFNIAGLGASLAVIPNPELRARFNMRKGMVPDVDVLAYVAASAAW
REGQPWLDALDYLRANRDLAQLHVNRLPGLSMVTPEASFLGWIDASGLGVADPALFFEK
HGL GFSSGRDFGN DRFVRFNFGC PRQLLEEALQ RMTRALTSY

7. Literaturverzeichnis

Albert, A.C., Spirito, F., Figueroa-Bossi, N., Bossi, L., and Rahmouni, A.R. (1996). Hyper-negative template DNA supercoiling during transcription of the tetracycline-resistance gene in topA mutants is largely constrained in vivo. *Nucleic Acids Res* 24, 3093-3099.

Andersson, S., and Kurland, C.G. (1987). Elongating ribosomes in vivo are refractory to erythromycin. *Biochimie* 69, 901-904.

Applied Biosystems, jetzt Life Technologies, 433A Peptide Synthesizer User Guide, Revision D., 2004, Vol. 1

Ariyanayagam, M.R., and Fairlamb, A.H. (2001). Ovothiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 115, 189-198.

Atherton, E., Sheppard, R.C. (1989). *Solid Phase Synthesis: A Practical Approach*. IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289, 905-920.

Becker, C. F. W., Oblatt-Montal, M., Kochendoerfer, G. G., Montal, M. (2004). Chemical synthesis and single channel properties of tetrameric and pentameric TASP (template-assembled synthetic proteins) derived from the transmembrane domain of HIV virus protein u (Vpu). *J Biol Chem* 279, 17483-17489.

Bennett, P.M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1, S347-357.

Bierbaum, G., Szekat, C., Josten, M., Heidrich, C., Kempter, C., Jung, G. and Sahl, H.-G. (1996). Engineering of a novel thioether bridge and role of modified residues in the lantibiotic Pep5. *Appl Environ Microbiol*, 62(2), 385-392.

Bolger, R., and Checovich, W. (1995). *Beacon Fluorescence Polarization System Applications Guide*. Pan Vera Corp., Madison, WI

Braunshausen, A., and Seebeck, F.P. (2011). Identification and Characterization of the First Ovothiol Biosynthetic Enzyme. *J Am Chem Soc*, 133, 1757–1759.

Bruice, P. Y. (2011). *Organische Chemie Studium kompakt*. Pearson Deutschland GmbH, München

Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T., and Ramakrishnan, V. (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* 407, 340-348.

7. Literaturverzeichnis

- Chabbert, Y. (1956).** Antagonisme in vitro entre l'erythromycine et la spiramycine. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 90, 787–790.
- Chang, Y.H., Shin, D., Na, Z., Lee, H.S., Kim, D.D., Oh, K.B., and Shin, J. (2008).** Dihydroxystyrene metabolites from an association of the sponges *Poecillastra wondoensis* and *Jaspis* sp. *J Nat Prod* 71, 779-783.
- Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L. and van der Donk, W.A. (2005).** Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem Rev*, 105(2), 633-684.
- Chenna, B.C., King, J.R., Shinkre, B.A., Glover, A.L., Lucius, A.L., and Velu, S.E. (2010).** Synthesis and structure activity relationship studies of novel *Staphylococcus aureus* Sortase A inhibitors. *Eur J Med Chem* 45, 3752-3761.
- Chenna, B.C., Shinkre, B.A., King, J.R., Lucius, A.L., Narayana, S.V., and Velu, S.E. (2008).** Identification of novel inhibitors of bacterial surface enzyme *Staphylococcus aureus* Sortase A. *Bioorg Med Chem Lett* 18, 380-385.
- Chopra, I., and Roberts, M. (2001).** Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 232-260 ; second page, table of contents.
- Copeland, R.A. (2005).** Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug discovery. John Wiley & sons, Inc., Hoboken, New Jersey
- Courvalin, P. (2006).** Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* 42 Suppl 1, 25-34.
- Culver, G.M. (2001).** Meanderings of the mRNA through the ribosome. *Structure* 9, 751-758.
- Dandliker, W. B., Hsu, M. L., Levin, J., and Rao, B. R. (1981).** *Methods Enzymol.* 74, 3–29.
- Dossett, J.H., Kronvall, G., Williams, R.C., Jr., and Quie, P.G. (1969).** Antiphagocytic effects of staphylococcal protein A. *J Immunol* 103, 1405-1410.
- Drlica, K., and Zhao, X. (1997).** DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 377-392.
- Eliot, A.C., and Kirsch, J.F. (2004).** Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annu Rev Biochem* 73, 383-415.
- Fischetti, V.A., Pancholi, V., and Schneewind, O. (1990).** Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci. *Mol Microbiol* 4, 1603-1605.

- Flock, J.I., Froman, G., Jonsson, K., Guss, B., Signas, C., Nilsson, B., Raucci, G., Hook, M., Wadstrom, T., and Lindberg, M. (1987).** Cloning and expression of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*. *EMBO J* 6, 2351-2357.
- Forsgren, A. (1969).** Protein A from *Staphylococcus aureus*. 8. Production of protein A by bacterial and L-forms of *S. aureus*. *Acta Pathol Microbiol Scand* 75, 481-490.
- Fournier, B., Truong-Bolduc, Q.C., Zhang, X., and Hooper, D.C. (2001).** A mutation in the 5' untranslated region increases stability of *norA* mRNA, encoding a multidrug resistance transporter of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 183, 2367-2371.
- Frankel, B.A., Bentley, M., Kruger, R.G., and McCafferty, D.G. (2004).** Vinyl sulfones: inhibitors of SrtA, a transpeptidase required for cell wall protein anchoring and virulence in *Staphylococcus aureus*. *J Am Chem Soc* 126, 3404-3405.
- Fujimura, S., Tokue, Y., Takahashi, H., Kobayashi, T., Gomi, K., Abe, T., Nukiwa, T., and Watanabe, A. (2000).** Novel arbekacin- and amikacin-modifying enzyme of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 190, 299-303.
- Garrod, L. P. (1957).** The erythromycin group of antibiotics. *British Medical Journal*, 2, 57-63.
- Green, N.M. (1975).** Avidin. *Adv Protein Chem* 29, 85-133.
- Grundling, A., and Schneewind, O. (2006).** Cross-linked peptidoglycan mediates lysostaphin binding to the cell wall envelope of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 188, 2463-2472.
- Harrison, P.M., and Arosio, P. (1996).** The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta* 1275, 161-203.
- Hausinger, R.P. (2004).** Fell/alpha-ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 39, 21-68.
- Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., and Ito, T. (2001).** The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 9, 486-493.
- Holler, T.P., and Hopkins, P.B. (1989).** A qualitative fluorescence-based assay for tyrosyl radical scavenging activity: ovoidiol A is an efficient scavenger. *Anal Biochem* 180, 326-330.
- Holler, T.P., and Hopkins, P.B. (1995).** Ovoidiols. *Methods Enzymol* 252, 115-123.
- Holler, T.P., Spaltenstein, A., Turner, E., Klevit, R.E., Shapiro, B.M., and Hopkins, P.B. (1987).** Synthesis and structure reassignment of mercaptohistidines of marine origin. Synthesis of L-ovoidiols A and C. *J Org Chem* 52, 4420-4421.

- Huang X., Aulabaugh A., Ding W., Kapoor B., Alksne L., Tabei K., and Ellestad G. (2003).** Kinetic mechanism of *Staphylococcus aureus* sortase SrtA. *Biochemistry*. 42(38), 11307-15.
- Ilangovan, U., Ton-That, H., Iwahara, J., Schneewind, O., and Clubb, R.T. (2001).** Structure of sortase, the transpeptidase that anchors proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6056-6061.
- Imhoff, J.F., Labes, A., and Wiese, J. (2011).** Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. *Biotechnol Adv* 29(5), 468-482.
- Jang, K.H., Chung, S.C., Shin, J., Lee, S.H., Kim, T.I., Lee, H.S., and Oh, K.B. (2007).** Aaptamines as sortase A inhibitors from the tropical sponge *Aaptos aaptos*. *Bioorg Med Chem Lett* 17, 5366-5369.
- Jeon, J.E., Na, Z., Jung, M., Lee, H.S., Sim, C.J., Nahm, K., Oh, K.B., and Shin, J. (2010).** Discorhabdins from the Korean marine sponge *Sceptrella* sp. *J Nat Prod* 73, 258-262.
- Jones, W. F., Nichols, R.L., Finland, M. (1956).** Development of resistance and cross-resistance in vitro to erythromycin, carbomycin, oleandomycin, and streptogramin. *Proc Soc Exp Biol Med* 93:388–391.
- Jonsson, I.M., Mazmanian, S.K., Schneewind, O., Bremell, T., and Tarkowski, A. (2003).** The role of *Staphylococcus aureus* sortase A and sortase B in murine arthritis. *Microbes Infect* 5, 775-780.
- Jonsson, I.M., Mazmanian, S.K., Schneewind, O., Verdrengh, M., Bremell, T., and Tarkowski, A. (2002).** On the role of *Staphylococcus aureus* sortase and sortase-catalyzed surface protein anchoring in murine septic arthritis. *J Infect Dis* 185, 1417-1424.
- Jonsson, K., Signas, C., Muller, H.P., and Lindberg, M. (1991).** Two different genes encode fibronectin binding proteins in *Staphylococcus aureus*. The complete nucleotide sequence and characterization of the second gene. *Eur J Biochem* 202, 1041-1048.
- Josefsson, E., McCrea, K.W., Ni Eidhin, D., O'Connell, D., Cox, J., Hook, M., and Foster, T.J. (1998).** Three new members of the serine-aspartate repeat protein multigene family of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 144 (Pt 12), 3387-3395.
- Kang, S.S., Kim, J.G., Lee, T.H., and Oh, K.B. (2006).** Flavonols inhibit sortases and sortase-mediated *Staphylococcus aureus* clumping to fibrinogen. *Biol Pharm Bull* 29, 1751-1755.
- Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, and J., Lindemann, J. (1993).** *Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Kenakin, T. (1993).** *Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interaction*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia
- Kent, S.B. (1988).** Chemical synthesis of peptides and proteins. *Am. Rev. Biochem.*, 57, 957-989

- Kim, S.H., Shin, D.S., Oh, M.N., Chung, S.C., Lee, J.S., Chang, I.M., and Oh, K.B. (2003).** Inhibition of sortase, a bacterial surface protein anchoring transpeptidase, by beta-sitosterol-3-O-glucopyranoside from *Fritillaria verticillata*. *Biosci Biotechnol Biochem* 67, 2477-2479.
- Kim, S.H., Shin, D.S., Oh, M.N., Chung, S.C., Lee, J.S., and Oh, K.B. (2004).** Inhibition of the bacterial surface protein anchoring transpeptidase sortase by isoquinoline alkaloids. *Biosci Biotechnol Biochem* 68, 421-424.
- Koehntop, K.D., Emerson, J.P., and Que, L., Jr. (2005).** The 2-His-1-carboxylate facial triad: a versatile platform for dioxygen activation by mononuclear non-heme iron(II) enzymes. *J Biol Inorg Chem* 10, 87-93.
- Kreier, J.P., and Baker, J.R. (1987).** Parasitic protozoa. Allen & Unwin, London
- Kruger, R.G., Barkallah, S., Frankel, B.A., and McCafferty, D.G. (2004a).** Inhibition of the *Staphylococcus aureus* sortase transpeptidase SrtA by phosphinic peptidomimetics. *Bioorg Med Chem* 12, 3723-3729.
- Kruger, R.G., Dostal, P., and McCafferty, D.G. (2004b).** Development of a high-performance liquid chromatography assay and revision of kinetic parameters for the *Staphylococcus aureus* sortase transpeptidase SrtA. *Anal Biochem* 326, 42-48.
- Kruger, R.G., Otvos, B., Frankel, B.A., Bentley, M., Dostal, P., and McCafferty, D.G. (2004c).** Analysis of the substrate specificity of the *Staphylococcus aureus* sortase transpeptidase SrtA. *Biochemistry* 43, 1541-1551.
- Lai, C.J., and Weisblum, B. (1971).** Altered methylation of ribosomal RNA in an erythromycin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 856-860.
- Lee, Y.J., Han, Y.R., Park, W., Nam, S.H., Oh, K.B., and Lee, H.S. (2010).** Synthetic analogs of indole-containing natural products as inhibitors of sortase A and isocitrate lyase. *Bioorg Med Chem Lett* 20, 6882-6885.
- Lengauer, T., and Rarey, M. (1996).** Computational methods for biomolecular docking. *Curr Opin Struct Biol* 6, 402-406.
- Levine, L.M., Michener, M.L., Toth, M.V., and Holwerda, B.C. (1997).** Measurement of specific protease activity utilizing fluorescence polarization. *Anal Biochem* 247, 83-88.
- Lu, C., Zhu, J., Wang, Y., Umeda, A., Cowmeadow, R.B., Lai, E., Moreno, G.N., Person, M.D., and Zhang, Z. (2007).** *Staphylococcus aureus* sortase A exists as a dimeric protein in vitro. *Biochemistry* 46(32), 9346-9354.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. (2000).** Spektrum Akademischer Verlag, Berlin

7. Literaturverzeichnis

- Maresso, A.W., and Schneewind, O. (2008).** Sortase as a target of anti-infective therapy. *Pharmacol Rev* 60, 128-141.
- Marsac, Y., Cramer, J., Olschewski, D., Alexandrov, K., and Becker, C. F. (2006)** Site-specific attachment of polyethylene glycol-like oligomers to proteins and peptides. *Bioconjug Chem* 17, 1492-1498.
- Mathias, U., and Jung, M. (2007).** Determination of drug-serum protein interactions via fluorescence polarization measurements. *Anal Bioanal Chem* 388, 1147-1156.
- Mazmanian, S.K., Liu, G., Jensen, E.R., Lenoy, E., and Schneewind, O. (2000).** Staphylococcus aureus sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5510-5515.
- Mazmanian, S.K., Liu, G., Ton-That, H., and Schneewind, O. (1999).** Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science* 285, 760-763.
- Mazmanian, S.K., Skaar, E.P., Gaspar, A.H., Humayun, M., Gornicki, P., Jelenska, J., Joachmiak, A., Missiakas, D.M., and Schneewind, O. (2003)** Passage of heme-iron across the envelope of Staphylococcus aureus. *Science*. 299(5608), 906-909.
- Mbughuni, M.M., Chakrabarti, M., Hayden, J.A., Bominaar, E.L., Hendrich, M.P., Munck, E., and Lipscomb, J.D. (2010).** Trapping and spectroscopic characterization of an FeIII-superoxo intermediate from a nonheme mononuclear iron-containing enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16788-16793.
- Missiakas, D.M., and Schneewind, O. (2003).** Passage of heme-iron across the envelope of Staphylococcus aureus. *Science* 299, 906-909.
- Mazmanian, S.K., Ton-That, H., and Schneewind, O. (2001).** Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of Staphylococcus aureus. *Mol Microbiol* 40, 1049-1057.
- Mazmanian, S.K., Ton-That, H., Su, K., and Schneewind, O. (2002).** An iron-regulated sortase anchors a class of surface protein during Staphylococcus aureus pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2293-2298.
- McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P., and Foster, T.J. (1994).** Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of Staphylococcus aureus. *Mol Microbiol* 11, 237-248.
- Meka, V.G., Pillai, S.K., Sakoulas, G., Wennersten, C., Venkataraman, L., DeGirolami, P.C., Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C., Jr., and Gold, H.S. (2004).** Linezolid resistance in sequential Staphylococcus aureus isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. *J Infect Dis* 190, 311-317.

7. Literaturverzeichnis

Merrifield, R.B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. 1. Synthese of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc*, 85, 2149-2156

Mingeot-Leclercq, M.P., Glupczynski, Y., and Tulkens, P.M. (1999). Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 727-737.

Murphy, E. (1985). Nucleotide sequence of *ermA*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B determinant in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 162, 633-640.

Neyfakh, A.A., Borsch, C.M., and Kaatz, G.W. (1993). Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrob Agents Chemother* 37, 128-129.

Ng, E.Y., Trucksis, M., and Hooper, D.C. (1994). Quinolone resistance mediated by *norA*: physiologic characterization and relationship to *flqB*, a quinolone resistance locus on the *Staphylococcus aureus* chromosome. *Antimicrob Agents Chemother* 38, 1345-1355.

Ni Eidhin, D., Perkins, S., Francois, P., Vaudaux, P., Hook, M., and Foster, T.J. (1998). Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 30, 245-257.

Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289, 920-930.

NovaBiochem Catalog, Method 2-10, 2.32

Oh, I., Yang, W.Y., Chung, S.C., Kim, T.Y., Oh, K.B., and Shin, J. (2011). In vitro sortase A inhibitory and antimicrobial activity of flavonoids isolated from the roots of *Sophora flavescens*. *Arch Pharm Res* 34, 217-222.

Oh, K.B., Kim, S.H., Lee, J., Cho, W.J., Lee, T., and Kim, S. (2004). Discovery of diarylacrylonitriles as a novel series of small molecule sortase A inhibitors. *J Med Chem* 47, 2418-2421.

Oh, K.B., Nam, K.W., Ahn, H., Shin, J., Kim, S., and Mar, W. (2010). Therapeutic effect of (Z)-3-(2,5-dimethoxyphenyl)-2-(4-methoxyphenyl) acrylonitrile (DMMA) against *Staphylococcus aureus* infection in a murine model. *Biochem Biophys Res Commun* 396, 440-444.

Oh, K.B., Oh, M.N., Kim, J.G., Shin, D.S., and Shin, J. (2006). Inhibition of sortase-mediated *Staphylococcus aureus* adhesion to fibronectin via fibronectin-binding protein by sortase inhibitors. *Appl Microbiol Biotechnol* 70, 102-106.

Pan, X.S., and Fisher, L.M. (1997). Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 471-474.

- Park, B.S., Kim, J.G., Kim, M.R., Lee, S.E., Takeoka, G.R., Oh, K.B., and Kim, J.H. (2005).** Curcuma longa L. constituents inhibit sortase A and Staphylococcus aureus cell adhesion to fibronectin. *J Agric Food Chem* 53, 9005-9009.
- Patel, R., Rouse, M.S., Piper, K.E., and Steckelberg, J.M. (2001).** Linezolid therapy of vancomycin-resistant Enterococcus faecium experimental endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 621-623.
- Paterson, G.K., and Mitchell, T.J. (2004).** The biology of Gram-positive sortase enzymes. *Trends Microbiol* 12, 89-95.
- Patti, J.M., Jonsson, H., Guss, B., Switalski, L.M., Wiberg, K., Lindberg, M., and Hook, M. (1992).** Molecular characterization and expression of a gene encoding a Staphylococcus aureus collagen adhesin. *J Biol Chem* 267, 4766-4772.
- Ramos, J.L., Martinez-Bueno, M., Molina-Henares, A.J., Teran, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M.T., Brennan, R., and Tobes, R. (2005).** The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 326-356.
- Reynolds, P.E. (1989).** Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 8, 943-950.
- Roche, F.M., Massey, R., Peacock, S.J., Day, N.P., Visai, L., Speziale, P., Lam, A., Pallen, M., and Foster, T.J. (2003).** Characterization of novel LPXTG-containing proteins of Staphylococcus aureus identified from genome sequences. *Microbiology* 149, 643-654.
- Ruiz, J., Sierra, J.M., De Anta, M.T., and Vila, J. (2001).** Characterization of sparfloxacin-resistant mutants of Staphylococcus aureus obtained in vitro. *Int J Antimicrob Agents* 18, 107-112.
- Scheel, O., Lyon, D.J., Rosdahl, V.T., Adeyemi-Doro, F.A., Ling, T.K., and Cheng, A.F. (1996).** In-vitro susceptibility of isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus 1988-1993. *J Antimicrob Chemother* 37, 243-251.
- Schlunzen, F., Zarivach, R., Harms, J., Bashan, A., Tocilj, A., Albrecht, R., Yonath, A., and Franceschi, F. (2001).** Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* 413, 814-821.
- Schmitz, F.J., Fluit, A.C., Gondolf, M., Beyrau, R., Lindenlauf, E., Verhoef, J., Heinz, H.P., and Jones, M.E. (1999).** The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals. *J Antimicrob Chemother* 43, 253-259.
- Schneewind, O., Mihaylova-Petkov, D., and Model, P. (1993).** Cell wall sorting signals in surface proteins of gram-positive bacteria. *EMBO J* 12, 4803-4811.

- Scott, C.J., McDowell, A., Martin, S.L., Lynas, J.F., Vandenbroeck, K., and Walker, B. (2002).** Irreversible inhibition of the bacterial cysteine protease-transpeptidase sortase (SrtA) by substrate-derived affinity labels. *Biochem J* 366, 953-958.
- Seebeck, F.P. (2010).** In vitro reconstitution of Mycobacterial ergothioneine biosynthesis. *J Am Chem Soc* 132, 6632-6633.
- Shapiro, B.M., and Hopkins, P.B. (1991).** Ovothiols: biological and chemical perspectives. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 64, 291-316.
- Shapiro, B.M., and Turner, E. (1988).** Oxidative stress and the role of novel thiol compounds at fertilization. *Biofactors* 1, 85-88.
- Signas, C., Raucchi, G., Jonsson, K., Lindgren, P.E., Anantharamaiah, G.M., Hook, M., and Lindberg, M. (1989).** Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus aureus*: use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 699-703.
- Spies, H.S., and Steenkamp, D.J. (1994).** Thiols of intracellular pathogens. Identification of ovothiol A in *Leishmania donovani* and structural analysis of a novel thiol from *Mycobacterium bovis*. *Eur J Biochem* 224, 203-213.
- Steenkamp, D.J., and Spies, H.S. (1994).** Identification of a major low-molecular-mass thiol of the trypanosomatid *Crithidia fasciculata* as ovothiol A. Facile isolation and structural analysis of the biman derivative. *Eur J Biochem* 223, 43-50.
- Suree, N., Yi, S.W., Thieu, W., Marohn, M., Damoiseaux, R., Chan, A., Jung, M.E., and Clubb, R.T. (2009).** Discovery and structure-activity relationship analysis of *Staphylococcus aureus* sortase A inhibitors. *Bioorg Med Chem* 17, 7174-7185.
- Switalski, L.M., Speziale, P., and Hook, M. (1989).** Isolation and characterization of a putative collagen receptor from *Staphylococcus aureus* strain Cowan 1. *J Biol Chem* 264, 21080-21086.
- Robert Koch Institut, Epidemiologisches Bulletin, 26/2011.**
(http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2011/26__11.html)
- Takei, M., Fukuda, H., Kishii, R., and Hosaka, M. (2001).** Target preference of 15 quinolones against *Staphylococcus aureus*, based on antibacterial activities and target inhibition. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 3544-3547.
- Taylor, J.M., and Heinrichs, D.E. (2002).** Transferrin binding in *Staphylococcus aureus*: involvement of a cell wall-anchored protein. *Mol Microbiol* 43, 1603-1614.

- Ton-That, H., Liu, G., Mazmanian, S.K., Faull, K.F., and Schneewind, O. (1999).** Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12424-12429.
- Ton-That, H., Mazmanian, S.K., Alksne, L., and Schneewind, O. (2002).** Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. Cysteine 184 and histidine 120 of sortase form a thiolate-imidazolium ion pair for catalysis. *J Biol Chem* 277, 7447-7452.
- Ton-That, H., Mazmanian, S.K., Faull, K.F., and Schneewind, O. (2000).** Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. Sortase catalyzed in vitro transpeptidation reaction using LPXTG peptide and NH(2)-Gly(3) substrates. *J Biol Chem* 275, 9876-9881.
- Tsiodras, S., Gold, H.S., Sakoulas, G., Eliopoulos, G.M., Wennersten, C., Venkataraman, L., Moellering, R.C., and Ferraro, M.J. (2001).** Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 358, 207-208.
- Turner, E., Hager, L.J., and Shapiro, B.M. (1988).** Ovothiol replaces glutathione peroxidase as a hydrogen peroxide scavenger in sea urchin eggs. *Science* 242, 939-941.
- Turner, E., Klevit, R., Hager, L.J., and Shapiro, B.M. (1987).** Ovothiols, a family of redox-active mercaptohistidine compounds from marine invertebrate eggs. *Biochemistry* 26, 4028-4036.
- Vogt, R.N., Spies, H.S., and Steenkamp, D.J. (2001).** The biosynthesis of ovothiol A (N-methyl-4-mercaptohistidine). Identification of S-(4'-L-histidyl)-L-cysteine sulfoxide as an intermediate and the products of the sulfoxide lyase reaction. *Eur J Biochem* 268, 5229-5241.
- Vollmer, A., Dingermann, T. (2005).** *Immunologie - Grundlagen und Wirkstoffe*. Wiss. Verl. Ges. Stuttgart, Stuttgart
- Walsh, C. (2003).** *Antibiotics - Actions, Origins, Resistance*. ASM Press, Washington, D.C.
- Weaver, K.H. Rabenstein, D.L. (1995).** Thiol/Disulfide exchange reactions of Ovothiol A with glutathione. *J Org Chem* 60, 1904-1907.
- Weiss, W.J., Lenoy, E., Murphy, T., Tardio, L., Burgio, P., Projan, S.J., Schneewind, O., and Alksne, L. (2004).** Effect of *srtA* and *srtB* gene expression on the virulence of *Staphylococcus aureus* in animal models of infection. *J Antimicrob Chemother* 53, 480-486.
- Weldrick, D.P., Chodacka, B., Vogt, R., and Steenkamp, D.J. (1999).** The effect of buthionine sulfoximine on the growth of *Leishmania donovani* in culture. *FEMS Microbiol Lett* 173, 139-146.
- Wiebe, T. (2010).** Charakterisierung von Ovothiollyase (OvoB) und zielgerichtete Mutation an Arginin183 in Ovothiol-synthase (OvoA). Bachelorarbeit, Fakultät für Chemie, TU Dortmund, Dortmund

7. Literaturverzeichnis

Wong, S.S., and Jameson, D.M. (2011). Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida

Wunderlich, M., and Glockshuber, R. (1993). In vivo control of redox potential during protein folding catalyzed by bacterial protein disulfide-isomerase (DsbA). *J Biol Chem* 268, 24547-24550.

Yusupova, G.Z., Yusupov, M.M., Cate, J.H., and Noller, H.F. (2001). The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell* 106, 233-241.

Zong, Y., Bice, T.W., Ton-That, H., Schneewind, O., and Narayana, S.V. (2004). Crystal structures of *Staphylococcus aureus* sortase A and its substrate complex. *J Biol Chem* 279, 31383-31389.

8. Abkürzungsverzeichnis

A _x	Absorptionseinheiten bei x nm
Abb.	Abbildung
Abz	o-Aminobenzoessäure
Ahx	6-aminohexanoic acid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Boc	tertiäres Butoxycarbonyl
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumine
Bzl	Benzyl
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius, bzw. Cytosin, bzw. Cystein
ca.	circa
C-Terminus	Carboxyterminus
Da	Dalton
Dabcyl	4-((4-(dimethylamino)phenyl)azo)benzoic acid
DBX	α,α'-Dibromo-m-xylene
dest.	destilliert
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMMA	(Z)-3-(2,5-dimethoxyphenyl)-2-(4-methoxyphenyl) acrylonitrile
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dnp	2,4-Dinitrophenol
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTAF	Dichlorotriazinylaminofluorescein
ε _x	Extinktionskoeffizient für die Wellenlänge x nm
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
edans	5-[(2-aminoethyl)amino]naphthalene-1-sulfonic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI-MS	Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
et al.	et altera
<i>E. tasmaniensis</i>	<i>Erwinia tasmaniensis</i>
etc.	et cetera
5FAM	5-Carboxyfluorescein
5FAM,SE	5-Carboxyfluorescein, succinimidyl ester
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl

8. Abkürzungsverzeichnis

FPLC	fast performance liquid chromatography
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
ΔG	Änderung der Gibb'schen freien Energie
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunden
ΔH	Änderung der Enthalpie
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HMPB-BHA	4-(4-Hydroxymethyl-3-methoxyphenoxy)butyryl-benzhydrylamine
HPLC	high performance liquid chromatography
HTS	High Throughput Screening
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITC	Isothermale Titrations Kalorimetrie (isothermal titration calorimetry)
K	Kelvin, bzw. Lysin
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LDH	Laktatdehydrogenase
mA	Milliabsorptionseinheiten
max	maximal
MBP	Maltose-Binding Protein
Me	Methyl
min	minimal
min.	Minuten
Mmt	Monomethoxytrityl
Mod.	Modifikation
mP	Millipolarisationseinheiten
MSCRAMMs	microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
N	Stöchiometrie, bzw. Asparagin
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
Ni-NTA	nickel-nitrilo-triacetic acid
Nr.	Nummer
N-Terminus	Aminoterminus
OD ₆₀₀	optische Dichte gemessen bei 600 nm
OE	Overlap Extension
ORF	open reading frame
OSH / OSSO	Redoxpaar: OvothiolA-SH / OvothiolA-S-S-OvothiolA
OtBu	tertiärer Butylester
P	Polarisationseinheiten, bzw. Prolin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

8. Abkürzungsverzeichnis

PAMPs	pathogen-associated molecular pattern
Pbf	2,2,5,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
pHMB	4-(Hydroxymercuri)-benzoesäure
Pho	phosphoriliert
PLP	Pyridoxalphosphat
PPO	Polyethylenglykol Polyamid Oligomer
RP	Reversed phase
rpm	revolutions per minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RUF	relative units of fluorescence
S	Svedberg-Einheit, bzw. Serin
ΔS	Änderung der Entropie
SAR	Structure-activity relationship
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	sodium dodecyl sulfate
T	Temperatur, bzw. Tyrosin, bzw. Threonin
tBu	tertiäres Butyl
TBX	1,3,5-Tris(bromomethyl)benzene
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
Temed	N,N,N',N'-Tetramethyl ethylene diamine
TFA	Trifluoroacetic acid
TIS	Triisopropylsilane
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
Trt	Trityl
TRX	Thioredoxin Protein
TSB	Tryptic Soy Broth
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vis	visible
v/v	Volumen pro Volumen
Wdh.	Wiederholungen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
2YT	Hefeextrakt und pankreatisch abgebautes Casein zweifach konzentriert
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

8. Abkürzungsverzeichnis

Nukleotide:

A:	Adenin
C:	Cytosin
G:	Guanin
T:	Thymin

Aminosäuren:

A:	Ala:	Alanin
C:	Cys:	Cystein
D:	Asp:	Asparaginsäure
E:	Glu:	Glutaminsäure
F:	Phe:	Phenylalanin
G:	Gly:	Glycin
H:	His:	Histidin
I:	Ile:	Isoleucin
K:	Lys:	Lysin
L:	Leu:	Leucin
M:	Met:	Methionin
N:	Asp:	Asparagin
P:	Pro:	Prolin
Q:	Gln:	Glutamin
R:	Arg:	Arginin
S:	Ser:	Serin
T:	Thr:	Threonin
V:	Val:	Valin
W:	Trp:	Tryptophan
Y:	Tyr:	Tyrosin

9. Danksagung

Mein Dank gilt:

Prof. Dr. Florian Seebeck für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die große Diskussionsbereitschaft, die intensive Betreuung und die vielseitigen Projekte

Prof. Dr. Roger S. Goody für die Aufnahme in seine Abteilung, die Diskussionsbereitschaft und die Übernahme des Erstgutachtens

Prof. Dr. Roland Winter für die Übernahme des Zweitgutachtens

Dr. Ralf Seidel für das ausführliche Korrekturlesen

Sascha Gentz für die Synthese, Aufreinigung und Analytik der verwendeten Peptide und unzählige Tipps zu deren Handhabung

Tatjana Wiebe für die von ihr zur Verfügung gestellten Klone und Proteine sowie die Messung der Umsatzraten diverser OvoB-Substrate

Allen Mitgliedern der Abteilung III und insbesondere den Mitgliedern der Arbeitsgruppen Seebeck und Engelhard für die technische Einarbeitung, die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft und die großartige Arbeitsatmosphäre

Der Max-Planck-Gesellschaft für die Gewährung eines dreieinhalbjährigen Promotions-Stipendiums