# Strukturelle Charakterisierung der Fettsäuresynthase Typ-I in Bakterien

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt dem Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Von

Mathias Enderle
aus Herbolzheim

Frankfurt 2015
D30

Vom Fachbereich

Biochemie, Chemie und Pharmazie (FB14) der

Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

| | |
|---|---|
| Dekan: | Prof. Dr. M. Karas |
| 1. Gutachter: | Prof. Dr. V. Dötsch |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr. M. Grininger |

Datum der Disputation: 23.11.2015

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Arbeit selbstständig verfasst, noch nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt, keine anderen als die angegebenen Quellen als Hilfsmittel benutzt, sowie wörtliche und sinngemäße Zitate als solche gekennzeichnet habe.

Frankfurt, den 12.02.2015

Gez. Mathias Enderle

*Für Papa*

## Zusammenfassung

Die Biosynthese der Fettsäuren (FS) ist in Eukaryoten und Bakterien ein hochkonserviert zentraler Stoffwechselweg, der in zwei strukturell verschiedenen Systemen ausgeführt wird. Die meisten Bakterien, Parasiten, Pflanzen und Mitochondrien nutzen ein Fettsäuresesynthase Typ-II (FAS-II) System. Bei FAS-II Systemen sind alle katalytischen Domänen separate lösliche Proteine. In Eukaryoten wie auch den Bakterien *Corynebakteria*, *Mycobakteria*, *Nocardia* (Klasse der CMN-Bakterien) liegen die katalytischen Domänen fusioniert auf einer Polypeptidkette vor, die zu einem Multienzymkomplex der Fettsäuresynthase Typ-I (FAS-I) assemblieren. Die Architektur der FAS-I zeigt große Unterschiede; die X-förmige Säuger-FAS-I (Maier *et al.*, 2006), sowie die fassartigen Enzyme der Pilz-FAS-I (Jenni *et al.*, 2007; Leibundgut *et al.*, 2007; Lomakin *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2008) und der bakteriellen FAS-I (Boehringer *et al.*, 2013; Ciccarelli *et al.*, 2013). Zwischen Pilz- und bakterieller FAS-I gibt es trotz des ähnlichen Aufbaus bedeutende Unterschiede. *Mycobakterium tuberculosis,* der Auslöser von Tuberkulose (TB), an der jährlich über eine Million Menschen weltweit sterben (WHO, 2014), synthetisiert durch eine Symbiose von FAS-I, FAS-II und der Polyketidsynthase-13 Mykolsäuren. Durch die Mykolsäuren ist *M. tuberculosis* resistent gegen äußere Einflüsse. FAS-I ist in die Synthese der Vorstufen der Mykolsäuren involviert. Sie stellt im Kampf gegen TB ein potentielles Inhibierungstarget dar.

Strukturell war die bakterielle FAS-I beim Beginn der vorliegenden Arbeit, nur durch *negative-stain*-Elektronenmikroskopie (EM) Aufnahmen aus dem Jahr 1982 charakterisiert (Morishima *et al.*, 1982). In dieser Arbeit konnte die bakteriellen FAS-I aus *M. tuberculosis* (MtFAS), sowie *Corynebakterium ammoniagenes* (CaFAS) und *Corynebakterium efficiens* (CeFAS) strukturell untersucht werden. Dies geschah mit den Methoden *negative-stain*-EM, Einzelmolekül-Cryo-EM (Cryo-EM), Cryo-EM-Tomographie (CET) und Röntgenkristallographie.

Anhand von CeFAS-Kristallen konnte erstmals durch Röntgenkristallographie die Struktur einer bakteriellen FAS-I bestimmt werden. Zudem wurde die hohe konformationelle Flexibilität der bakteriellen FAS-I mit mehreren Methoden gezeigt. Für die CaFAS konnte mit Cryo-EM initiale Prozesse der Proteinkristallbildung abgebildet werden.

**Summary**

Eukaryotes and bacteria perform the synthesis of fatty acids in repetitive cycle. The synthetic machineries are termed fatty acid synthase (FAS) and can be divided into two groups: In most bacteria, plant cells and mitochondria, the catalytic functions for fatty acid synthesis are encoded by single genes, termed FAS type-II (FAS-II) system. In eukaryotes and the CMN-group (*Corynebacterium*, *Mycobacterium, Nocardia*), the synthesis is instead performed in highly organized multienzyme complexes the FAS type-I (FAS-I) systems. FAS-I carries all catalytic domains on one or two polypeptide chains. FAS-I systems can be subdivided into three structural folds, representing the mammalian (Maier *et al.*, 2006), fungal FAS-I (Jenni *et al.*, 2007; Leibundgut *et al.*, 2007; Lomakin *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2008) and the bacterial FAS-I (Boehringer *et al.*, 2013; Ciccarelli *et al.*, 2013).

Tuberculosis (TB) is caused by *Mycobacterium tuberculosis* and responsible for over one million deaths per year (WHO, 2014). FAS-I in *M. tuberculosis* is directly involved in the synthesis of mycolic acids. These long-chain fatty acids are important compounds of the cell wall and provide an efficient barrier for chemicals. FAS-I synthesizes the precursor of mycolic acids. As such it is a highly relevant target for rational drug design.

Until recently, the structural knowledge about the bacterial FAS-I complex was very poor, and essentially based on negative-stain electron microscopy (EM) images (Morishima *et al.*, 1982). In this thesis, the FAS-I from *M. tuberculosis* (MtFAS), *Corynebacterium ammoniagenes* (CaFAS) and *Corynebacterium efficiens* (CeFAS) were structurally analysed. This was performed with negative-stain-EM, single-practical-cryo-EM (cryo-EM), cryo-EM-tomography, and X-ray crystallography. For the CaFAS the nucleation and growth of protein-crystals could be analysed with cryo-EM.

With protein crystals from CeFAS it was possible to present the first X-ray structural model of the bacterial FAS-I complex at low resolution. The flexibility of the bacterial FAS-I complex was shown to be an intrinsic characteristic of bacterial FAS-I. Furthermore, snapshots of the crystal nucleation and crystal growth were shown with the help of a cryo-EM study on CaFAS.

# INHALTSVERZEICHNIS


**1. EINLEITUNG 1**

**1.1 Bedeutung der Fettsäuresynthese 2**

**1.2 Die Fettsäuresynthese 2**

1.2.1 Die Polyketidsynthese 5

**1.3 Details zur Klassifizierung von Fettsäuresynthasen 5**

1.3.1 Die drei FAS-I-Systeme 6
1.3.2 Ausbildung von Reaktionskammern bei FAS-I-Systemen 11

**1.4 Strukturelle Untersuchung der FAS-I 12**

**1.5 Relevanz der FAS-I in Prokaryoten 14**

**1.6 Die Krankheit Tuberkulose, ausgelöst durch *M. tuberculosis* 15**

**1.7 Proteinkristallisation und Kristallographie 18**

**1.8 Aufgabenstellung 23**

**2. MATERIAL UND METHODEN 24**

**2.1 Material 24**

2.1.1 Geräte 24
2.1.2 Chemikalien 26
2.1.3 Kulturmedien, Pufferlösungen, Stammlösungen 27
2.1.4 Genomische DNA, *E. coli*-Stämme, Vektoren, Plasmide, Oligonukleotide 31
2.1.6 Kristallographie 35
2.1.7 Elektronenmikroskopie 36
2.1.8 Software und Datenbanken 37

**2.2 Methoden 38**

2.2.1 Mikrobiologische Methoden 38
2.2.2 Molekularbiologische Methoden 38
2.2.3 Proteinchemische Methoden 41

**2.3 Biochemische Methoden 44**

2.3.1 Aktivitäts- und Produktassay der bakteriellen FAS-I 44

**2.4 Kristallographie 45**

2.4.1 Kristallisation der bakteriellen FAS-I 45
2.4.2 Dehydratisierung der CaFAS und CeFAS 45
2.4.3 Kristallographische Datensammlung der bakteriellen FAS-I 46

2.4.4 Datenprozessierung 47
2.4.5 Strukturlösung der CeFAS mittels Molekularem Ersatz und anschließende Strukturverfeinerung 48

**2.5 Elektronenmikroskopie 47**

2.5.1 *Negative-stain* Elektronenmikroskopie 47
2.5.2 Elektronmikroskopische Visualisierung des Kristallkeimbildung und Cryo-EM Tomographie 49

**3. ERGEBNISSE 50**

**3.1 Proteinherstellung und Charakterisierung 50**

3.1.1 Proteinherstellung und Präparation 50
3.1.2 Instabilität der MtFAS Oligomere 51
3.1.3 Analytische Ultrazentrifugation (AUZ) 53
3.1.4 Circulardichroismus-Spektroskopie und Thermofluor 54
3.1.5 Aktivitätsassay und Produktspektrumsanalyse der CaFAS und CeFAS 56
3.1.6 *Negative-stain* EM der CaFAS, TriS-CaFAS und MtFAS 58

**3.2 Strukturlösung einzelner CaFAS Moleküle durch Cryo-EM Tomographie 62**

**3.3 Einzelpartikel Cryo-EM Struktur der MtFAS-I 64**

**3.4 Röntgenkristallographische Untersuchung der bakteriellen FAS-I 68**

3.4.1 Phasenbestimmung durch molekularen Ersatz (MR) 72
3.4.2 Interpretation der Elektronendichte 75
3.4.3 Röntgenkristallographische Struktur der CeFAS 75
3.4.4 Vergleich der bakteriellen- und der Pilz-FAS-I Struktur 77
3.4.5 Unterschiede im zentralen Rad Bereich zwischen der Pilz- und bakteriellen FAS-I 79
3.4.6 Beweglichkeit der MAT der CeFAS 80
3.4.8 Unterschiedliche Raumgruppe an drei verschiedenen Stellen eines Kristalles 83

**3.5 Bildung von Kristallisationskeimen und Nanokristallen der CaFAS 84**

**4. DISKUSSION 87**

**4.1 Pilz- und bakterielle FAS-I sind verwandte Proteine 88**

**4.2 Proteinpräparation, Charakterisierung, biophysikalische Untersuchung 90**

**4.3 Proteinengineering zur Optimierung der Kristallisierbarkeit 92**

**4.4 Strukturlösung der bakteriellen FAS-I in drei verschiedenen Teilprojekten 93**

**4.5 Röntgenkristallographische Strukturlösung und strukturelle Analyse 94**

4.5.1 Kristallisation der bakteriellen FAS-I 94
4.6.2 Strukturlösung der CeFAS mittels Röntgenkristallographie 95
4.6.3 Struktureller Vergleich mit der Pilz-FAS-I 97
4.6.4 Zwei große Öffnungen bei der bakteriellen FAS-I 99
4.6.5 Kristallographische B-Faktoren 99
4.6.6 Mobilität MAT in der bakteriellen FAS-I 100
4.6.7 Dynamik im zentralen Rad 102

**4.7 Kristallkeimbildung und Cryo-EM Tomographie 103**

**4.8 Resümee und Ausblick 105**

**5. ANHANG 108**

**5.1 Abbildungs-, Tabellen- und Abkürzungsverzeichnis 108**

5.1.1 Abbildungsverzeichnis 108
5.1.2 Tabellenverzeichnis 110
5.1.3 Abkürzungsverzeichnis 111

**5.2 Literaturverzeichnis 114**

**5.3 Alignement Pilz- und bakterieller FAS-I 128**

**5.4 Sequenzen 134**

5.4.1 MtFAS Sequenzen 134
5.4.2 CaFAS Sequenzen 138
5.4.3 CeFAS Sequenzen 142
5.4.4 AcpS Sequenzen 146

**5.5 Vektorkarten 147**

**6. DANKSAGUNG 149**

# 1. Einleitung

## 1.1 Bedeutung der Fettsäuresynthese

Die Fettsäuren (FS) besitzen trotz des einfachen chemischen Aufbaus vielfältige und wichtige Funktionen. Sie fungieren als strukturelle Bausteine der Zellmembran, Botenstoffe z. B. Prostaglandine, kovalent gebundene Modifikatoren eukaryotischer Proteine und Energiespeicher der Zelle (Schweizer & Hofmann, 2004). Beim Aufbau der Zellmembran werden FS als Phospholipide in die Lipiddoppelschicht der Zellmembran eingebettet. In höheren Organismen dienen FS auch als Energiespeicher, die bei Säugern als Triglyceride in Fettdepots gespeichert und bei Bedarf mobilisiert werden können.

FS werden aus Coenzym A (CoA)-gebundenen Acetyl- und Malonyl-Einheiten aufgebaut und unter der Verwendung von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) als Reduktionsmittel in einer Abfolge von vier modifizierenden Schritten hergestellt. Chemisch gesehen bestehen FS aus einer hydrophilen Monocarbonsäure und einer hydrophoben Kohlenwasserstoffkette (KW-Kette), woraus ihre amphiphilen Eigenschaften resultieren. KW-Ketten der FS können sich in der Anzahl der Kohlenstoffatome und ihrem Sättigungsgrad unterscheiden. Die Möglichkeit FS zu synthetisieren ist in der Natur weitverbreitet, und man findet FS sowie die entsprechenden Enzyme für deren Synthese in Eukaryoten wie auch in Prokaryoten (Lynen, 1980). Die Fettsäuresynthese stellt einen zentralen Stoffwechselvorgang dar. Das Reaktionsmuster der Fettsäuresynthese folgt einem konserviert iterativen Schema, bei dem die KW-Kette pro Zyklus um eine $C_2$-Einheit verlängert wird. In der Natur finden wir für diese Synthese der FS zwei unterschiedliche Systeme.

Zum einen werden FS in Fettsäuresynthase (FAS) Typ-II (FAS-II)-Systemen hergestellt. Dort werden alle katalytischen Funktionen separat von monofunktionalen Proteinen bereitgestellt. Zum anderen werden FS auch durch die Multienzymkomplexe der FAS Typ-I (FAS-I)-Systeme hergestellt. In der FAS-I liegen alle katalytischen Domänen fusioniert zu Polypeptidketten vor. Diese

Polypeptidketten können durch Assemblierung offene Reaktionskammern (Säuger-FAS-I) und geschlossene Reaktionskammern (Pilz- und bakterielle FAS-I) bilden. In beiden Systemen wird der Substrat- und Intermediattransfer zwischen den Domänen durch das Acyl-Carrier-Protein (ACP) ausgeführt. Die gebundene prosthetische Gruppe Phosphopantethein spielt dabei eine Schlüsselrolle und erlaubt so ACP Edukte und Intermediate als Thioester zu binden (Leibundgut *et al.*, 2007). Bei FAS-I ist ACP Teil der Polypeptidkette. Im FAS-II System diffundiert ACP zur nächsten katalytischen Domäne, weshalb FAS-II Systeme mit einer hohen Kopienzahl von ACP einhergehen (White *et al.*, 2005). Eine detaillierte Beschreibung des molekularen Aufbaus der Systeme erfolgt unter 1.3.

## 1.2 Die Fettsäuresynthese

Die hochkonservierte Abfolge der Fettsäuresyntheseschritte wird im folgenden Abschnitt beschrieben. Ein schematischer Ablauf des ersten Zyklus der FS-Synthese befindet sich am Ende dieses Kapitels. Dieser Ablauf ist in drei Abschnitte unterteilt, dem Be- und Entladen, der Kondensation sowie der Modifikation (siehe Abbildung 1.1).

Das Startersubstrat Acetyl-CoA (AcCoA) der FS-Synthese entsteht größtenteils durch den Abbau von Kohlenhydraten bei der Glykolyse. Malonyl-CoA (MaCoA), das Elongationssubstrat selbiger Synthese, entsteht durch die Carboxylierung von AcCoA, katalysiert durch die Biotin-abhängige AcCoA-Carboxylase.

Die Selektion der Substrate AcCoA und MaCoA wird durch die beiden Transferasen Acetyl-Transferase (AT) und Malonyl/Acyl-Transferase (MAT) bewerkstelligt. Durch sie werden die Reste auf eine kleine bewegliche Domäne geladen, dem ACP. Ein grundlegendes Konzept bei der Fettsäuresynthese ist, dass alle Substrate und produzierten Intermediate zu jedem Zeitpunkt kovalent am Enzym gebunden bleiben. Dies impliziert, dass diese Domäne strukturell alle katalytischen Zentren erreichen können muss.

ACP spielt in den Stoffwechselwegen der Fettsäuresynthese und in den verwandten Proteinen, den Polyketidsynthasen (PKS) eine wichtige Rolle im Transport von Substrat und Zwischenprodukten (Perham, 2000).

Beladen von ACP durch Substrattransfer von AT bzw. MAT

Jeder FS-Synthesezyklus wird durch den Transfer des Startsubstrats AcCoA zum Serin-Rest im aktiven Zentrum der AT initiiert. Acetyl bindet an AT unter Freisetzung des CoA. Dieses Acetyl wird im Anschluss an die Thiolgruppe des Phosphopantetheins von ACP gebunden. ACP überträgt den Acetyl-Rest schließlich an den katalytischen Cystein-Rest der Ketoacyl-Synthase (KS). Das Elongationssubstrat Malonat wird von der MAT, wiederum unter Freisetzung eines CoAs, an ACP gebunden und gelangt so ebenfalls zur KS.

Die FS-Synthese kann erst nach einer posttranslationalen Modifikation, der Phosphopantetheinylierung von ACP durch die Acyl-Carrier-Protein-Synthase (AcpS) (Homolog der Phosphopantetheintransferase in *Saccharomyces cerevisiae*), initiiert werden (Dym *et al.*, 2009; Johansson *et al.*, 2009).

Kondensation der Substrate

In der KS findet die entscheidende C-C-Verknüpfung statt, durch die es letztendlich zu der Kettenverlängerung der FS kommt. Dieser zentrale Schritt im Zyklus ist eine einfache Claisen-Kondensation zwischen dem an die Synthase gebundenen Acetyl oder einem Acyl-Zwischenprodukten und dem an ACP gebundene Malonyl-Rest. Durch die Decarboxylierung des Malonyl-Restes kommt es zu einer direkten Addition an den Rest der an die Synthase gebundenen ist. Dies führt zum Zwischenprodukt *β*-Ketoacyl-ACP.

Modifikation der Zwischenprodukte

In den folgenden drei Schritten bleibt das Intermediat kovalent an ACP gebunden und wird am *β*-Kohlenstoff modifiziert. Die Ketoacyl-Reduktase (KR) katalysiert die erste dieser drei Reaktionen. Unter NADPH-Verbrauch wird *β*-Ketoacyl-ACP zu *β*-Hydroxyl-ACP reduziert. Eine sich anschließende Dehydration, katalysiert durch die Dehydratase (DH), führt zur *β*-Enoyl-ACP, und schlussendlich wird der Enoyl-Rest in einer weiteren Reaktion wieder unter NADPH-Verbrauch durch die Enoyl-Reduktase (ER) zu einer gesättigten Acylkette reduziert. In der Pilz- und der bakteriellen FAS-I bindet die ER ein Flavinmononukleotid (FMN), welches als kurzzeitiger $H^+$-Carrier fungiert (Jenni *et al.*, 2007). FMN bedingt auch die gelbliche Farbe der fungalen und bakteriellen FAS-I (Lynen, 1980).

Das vollständig reduzierte Zwischenprodukt wird von ACP wiederum am katalytischen Cystein-Rest der KS zwischengelagert und dient im nächsten

Reaktionszyklus als Ausgangssubstrat. ACP, welches nach dem Entladevorgang frei geworden ist, wird durch MAT mit Malonyl beladen.

Produkt-Freisetzung

Die Sequenz aus Kondensation und Modifikation wird nach sechs bis sieben Zyklen (FS hat eine Länge von $C_{16}$ oder $C_{18}$) terminiert. Dabei wird die FS durch die MAT von ACP auf die Thiol-Gruppe eines freien CoA-SH übertragen. Die Kettenlänge wird durch verschiedene Affinitäten der MAT und KS zu Acyl-Ketten verschiedener Länge bestimmt (Sumper *et al.*, 1969).

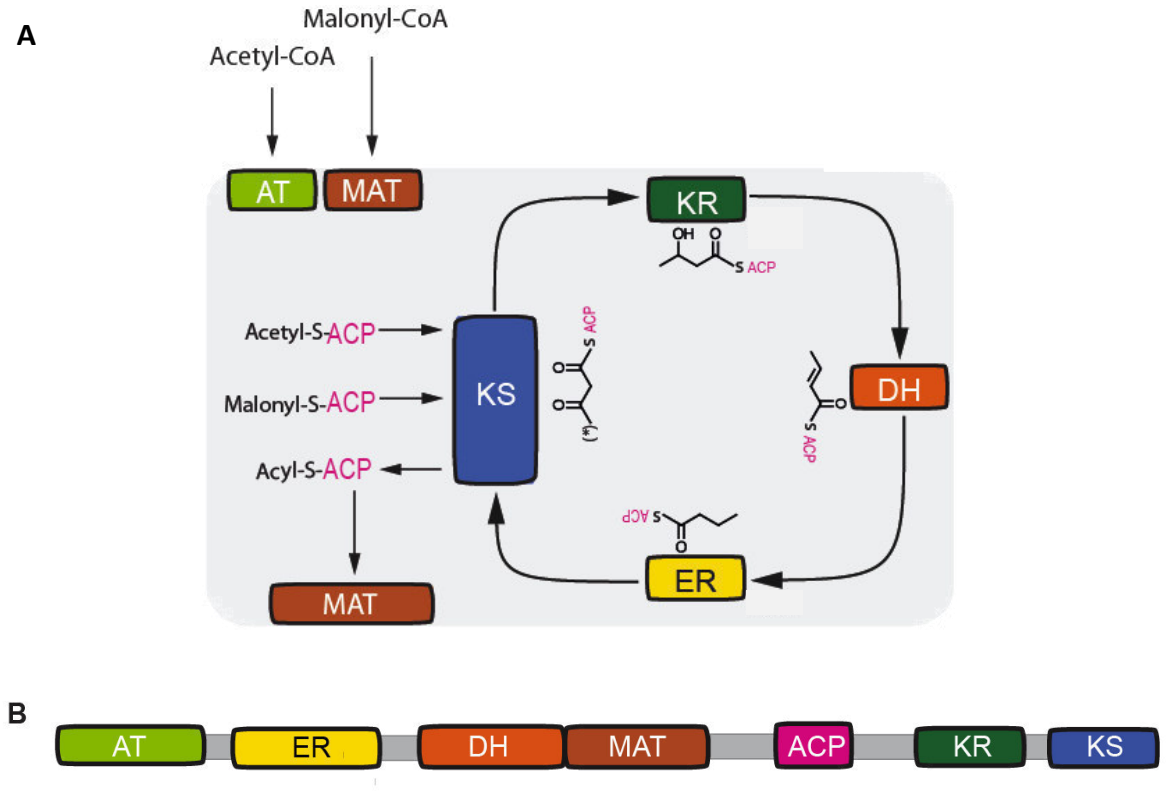



**Abbildung 1.1: Reaktionszyklus und Domänenorganisation der bakteriellen FAS-I.**
(A) In dieser Abbildung wird schematisch der Ablauf der Biosynthese von Fettsäuren gezeigt mit der entsprechenden Domänennomenklatur: Acetyl-Transferase (AT), Malonyl/acyl-Transferase (MAT), Acyl-Carrier-Proteins (ACP), Ketoacyl-Synthase (KS), Ketoacyl-Reduktase (KR), Dehydratase (DH), Enoyl-Reduktase (ER). Dieser wird durch die einmalige Übertragung des Startsubstrates AcCoA von AT auf ACP gestartet. Die Synthese durchläuft den Zyklus insgesamt sechs bis sieben Mal und startet jeweils mit dem Transfer von MaCoA von MAT auf ACP. Dieser Rest wird an AcCoA oder die wachsende Kette durch KS fusioniert und im Anschluss modifiziert. Nach sechs Zyklen wird die gesättigte FS von ACP durch MAT auf CoA gehoben. Die posttranslationale Modifikation von ACP, durch die Übertragung der prosthetischen Gruppe Phosphopantethein durch die Acyl-Carrier-Protein-Synthase (AcpS) ist hier nicht gezeigt. (B) Katalytische Domänen auf der Polypeptidkette der bakteriellen FAS-I.

### 1.2.1 Die Polyketidsynthese

Die beschriebenen Reaktionen der FAS-I gleichen dem verwandten PKS-I-System. Beide Systeme nutzen eine gemeinsame Chemie, und unterscheiden sich nur im Reaktionsablauf nach der Kondensation (Hopwood & Sherman, 1990). Genauer gesagt variiert bei PKS-Systemen der Grad der Modifikation in der *β*-Position, bevor das Zwischenprodukt in einem nächsten Kondensationsschritt wieder verlängert wird (Hertweck, 2009; Weissman, 2014). Durch den zusätzlich modularen Aufbau der PKS-I-Systeme, kann der strikt iterative Reaktionszyklus der FAS-I verloren gehen. Modulare aufgebaute Systeme zeichnen sich dadurch aus, dass jeweils ein Modul für einen Monomer-Einbau in die Polyketidkette verantwortlich ist und dafür alle katalytischen Zentren bereitstellt. Mit dem Eingriff in die Abfolge der katalysierten Reaktionen kommt es zu dieser Variationsmöglichkeit der Produkte. Polyketide können hoch komplexe kleine organische Moleküle sein und besitzen teilweise hohe biologische Aktivität und dienen als Vorstufen für Antibiotika z. B. Erythromycin. Somit kann die FAS-I im Schema der PKS-Systeme als vollständig reduzierendes PKS-I System gesehen werden.

## 1.3 Details zur Klassifizierung von Fettsäuresynthasen

Wie eingangs beschrieben wird die Fettsäuresynthese in zwei grundlegend unterschiedlichen Systemen (FAS-I und FAS-II) ausgeführt. Die beiden Systeme weisen strukturelle Unterschiede auf, wohingegen die katalytischen Schritte der Biosynthese von FS hoch konserviert sind (Smith *et al.*, 2003; Schweizer & Hofmann, 2004).

<u>FAS-II</u>

Beim FAS-II System liegen alle katalytischen Zentren als separate lösliche Proteine vor. Diese werden von einzelnen Genen kodiert (Campbell & Cronan, 2001). Man findet dieses System in Mitochondrien, Pflanzen, Bakterien und Parasiten (White *et al.*, 2005). Die bakteriellen monofunktionalen Proteine bildeten den Grundstein für komplexe Multienzymsysteme wie die FAS-I (Bukhari *et al.*, 2014).

FAS-I

Die eukaryotische Fettsäuresynthese wird in großen Multienzymkomplexen ausgeführt, welche als FAS-I bezeichnet werden (Wakil, 1961; Brindley *et al.*, 1969; Singh *et al.*, 1985; Maier *et al.*, 2010; Grininger, 2014). Als große Ausnahme im Reich der Bakterien findet die FS-Synthese in den Gattungen *Corynebakteria*, *Mycobakteria*, *Nocordia* (Klasse der CMN-Bakterien) ebenfalls in FAS-I Systemen statt, während alle übrigen Bakterien ein FAS-II System besitzen (Schweizer & Hofmann, 2004; Gago *et al.*, 2011). Bei allen FAS-I Systemen sind die katalytischen Domänen auf einer Polypeptidkette bei Säuger- und bakterieller FAS-I oder zwei Polypeptidkette bei der Pilz-FAS-I fusioniert. Der Säuger-FAS-I Komplex besitzt einen X-förmigen Aufbau, die Pilz- und bakterielle FAS-I einen fassartigen Aufbau. Bei diesem fassartigen Aufbau zeigen alle katalytischen Zentren in die Reaktionskammer und sind entsprechend der Reaktionsfolge zirkulär angeordnet (Maier *et al.*, 2010).

### 1.3.1 Die drei FAS-I-Systeme

Säuger FAS-I

Der homodimere Multienzymkomplex der Säuger-FAS-I, mit einem Molekulargewicht von 540 kDA, liegt in X-Form vor. In der Polypeptidkette sind die Domänen von N- nach C-Terminus folgendermaßen geordnet: KS, Malonyl-Acetyl-Transferase, DH, Pseudo-Methyltransferase ( Ψ ME), Pseudo-KR ( Ψ KR), ER, KR, ACP und Thioesterase (TE) (siehe Abbildung 1.4). Die beiden Hälften des Komplexes werden aufgrund der katalytischen Eigenschaften der Domänen in die obere modifizierende (DH, KR, ER, TE) und die untere kondensierende Hälfte (KS, Malonyl-Acetyl-Transferase) unterteilt. Beide Hälften sind nur über einen schmalen Linker (zwischen KS und DH) miteinander verbunden (Maier *et al.*, 2008) und somit an dieser Taille konformationell flexibel. Die relative Beweglichkeit der kondensierenden und modifizierenden Hälfte ist für die FS-Synthese der Säuger-FAS-I entscheidend, damit ACP alle katalytischen Zentren erreicht (Maier *et al.*, 2008; Brignole *et al.*, 2009). Der Substrattransfer von beiden Substraten AcCoA und MaCoA auf ACP wird hier durch die bifunktionale Malonyl-Acetyl-Transferase katalysiert. Eine Auswahl des Substrates trifft Malonyl-Acetyl-Transferase nach dem Zufallsprinzip, es findet dadurch ein ständiges

Be- und Entladen zwischen CoA und ACP statt, bis das für den Reaktionsschritt richtige Substrat gebunden ist (Smith *et al.*, 2003). Die TE ist für die Kettenlängenkontrolle der entstehenden Acyl-Kette verantwortlich sowie für die Freisetzung der Produkte, welche als freie Fettsäuren (nicht an CoA gebunden) abgespalten werden (Burton *et al.*, 1969). Säuger-FAS-I trägt zwei katalytisch inaktive Domänen; die sogenannten Pseudodomänen Ψ ME und Ψ KR. Die Pseudodomänen der Säuger-FAS-I erhielten ihren Namen erstens aufgrund des homologen Aufbaus zu der Methyl-Transferase (Ψ ME) und zweitens durch die Ausbildung eines Dimers zur KR-Domäne (Ψ KR) (Maier *et al.*, 2006). Bei der Säuger-FAS kodieren 9% der Aminosäuereste für Linker und 16% für die nicht-aktiven Pseudodomänen Ψ KR und Ψ ME (Maier *et al.*, 2006). Die Säuger FAS-I ist in der Forschung von großem Interesse, da in Krebszellen dieses Enzym im großen Überschuss hergestellt: Hier korreliert das Expressionslevel mit der Bösartigkeit des Tumors (Maier *et al.*, 2006; Hardwicke *et al.*, 2014). Neben der medizinischen Relevanz sind strukturelle Aspekte der Säuger-FAS-I von Bedeutung, da sie strukturell sehr homolog zu PKS-I-Systemen ist (Jenke-Kodama & Dittmann, 2005; Smith & Tsai, 2007; Smith & Sherman, 2008; Maier *et al.*, 2008) und gilt als *master-fold* für die modular angeordneten PKS-I-Systeme. Infolge der modularen Organisation der PKS-I-Systeme stellen diese ein breites Spektrum an Produkten her und sind so interessante Enzyme in der Synthetischen Biologie (Kittendorf & Sherman, 2006; Menzella & Reeves, 2007).

Pilz-FAS-I

Der $\alpha_6\beta_6$ heterododecamere Multienzymkomplex der Pilz-FAS-I, mit einem Molekulargewicht von 2,6 MDa, liegt als fassartige Struktur vor (siehe Abbildung 1.2). Pilz-FAS-I kommen in Varianten vor, die sich in der Verteilung der Domänen auf eine oder zwei Polypeptidketten unterscheiden (Grininger, 2014). In der *S. cerevisiae* FAS-I (ScFAS), welche die am besten untersuchte FAS-I darstellt, sind die Domänen folgendermaßen verteilt: AT, ER, DH sowie ein Teil der Malonyl/Palmityl-Transferase (MPT) liegen auf der 230 kDa großen *β*-Kette. Auf der 210 kDa großen *α*-Kette bildet die MPT den N-Terminus, gefolgt von ACP, KR, KS und PPT (siehe Abbildung 1.4). In der Pilz-FAS-I ist die Phosphopantetheinyl-Transferase zur posttranslationalen Modifikation von ACP Teil des Komplexes.

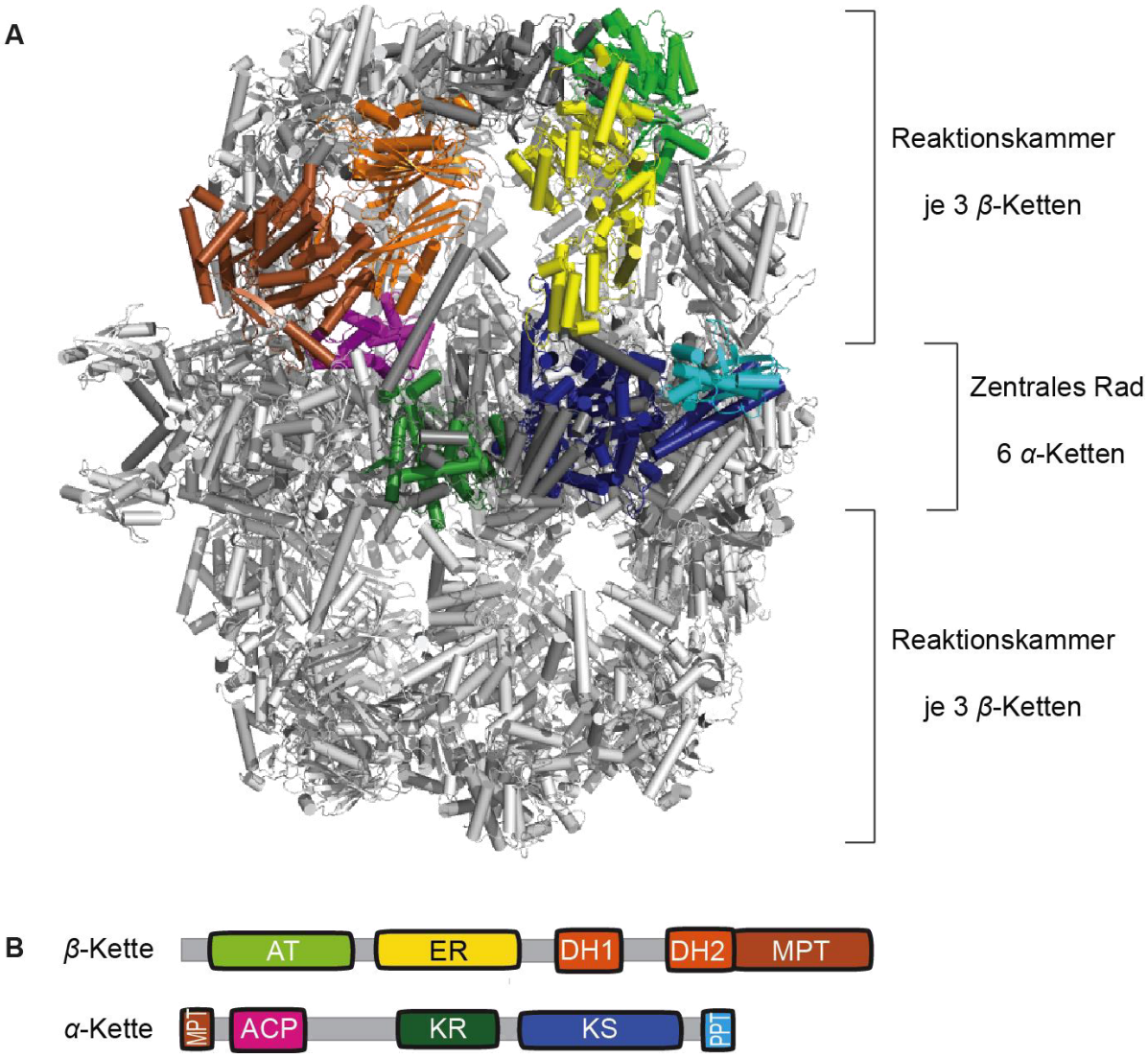



**Abbildung 1.2: Kristallstruktur bei 4.5 Å und Domänenorganisation der Pilz-FAS-I.**
(A) Die ScFAS ist ein $\alpha_6\beta_6$ heterododecamerer Komplex mit zwei Reaktionskammern bestehend aus je 3 *β*-Ketten und einer zentralen Scheibe aus 6 *α*-Ketten (pdb: 2vkz) (Johansson *et al.*, 2008). Farbkodiert dargestellt ist die räumliche Anordnung eines Satzes katalytischer Zentren, dazwischen befinden sich, in dunkelgrauer Farbe dargestellt, strukturelle Domänen, die den Komplex stabilisieren. (B) Die verschiedenen Domänen sind auf zwei Ketten aufgeteilt. In der Domänenorganisation der ScFAS lässt sich der Kettenbruch in der MPT-Domäne erkennen. Domänennomenklatur: Acetyl-Transferase (AT), Enoyl-Reduktase (ER), Dehydratase (DH), Malonyl/Palmityl-Transferase (MPT), Acyl-Carrier-Protein (ACP), Ketoacyl-Reduktase (KR) und Ketoacyl-Synthase (KS).

Der fassartige Aufbau der Pilz-FAS-I wurde bereits 1967 durch *negative-stain*-EM Aufnahmen gezeigt (Lynen, 1967). 1974 konnte auch gezeigt werden, dass ScFAS aus zwei Polypeptidketten, einer *α*- und *β*-Untereinheit besteht (Tauro *et al.*, 1974). Strukturell lässt sich die Pilz-FAS-I in einen zentralen/äquatorialen $\alpha_6$-Radbereich und in zwei zu beiden Seiten angesetzten $\beta_3$-Reaktionskammer unterteilen (Jenni *et al.*, 2007; Leibundgut *et al.*, 2007; Lomakin *et al.*, 2007;

Johansson *et al.*, 2008). Im äquatorialen oder *α*-Rad der Pilz-FAS-I kommt es durch die D3-Symmetrie zur Bildung von homodimeren Interaktionen zwischen den Domänen (Jenni *et al.*, 2007); speziell der *α*-*α*-Kontakt von KS-KS und KR-KR über Dimerisierungsdomänen (DM) im zentralen Rad unterstützt dies (Wakil *et al.*, 1983). Jede der beiden Reaktionskammern stellt drei komplette Sätze an katalytischen Zentren. Öffnungen im *α*- und *β*-Bereich erleichtern die Diffusion zum Ein- oder Ausschleusen von Substraten oder Produkten (Jenni *et al.*, 2007).
Die *α*-helikale Trimerisierungsdomänen (TM) am N-Terminus der *β*-Kette bilden die Kappen der Reaktionskammern und stabilisieren so die Struktur. Pilz-FAS-I trägt viele strukturelle Insertionen zur Stabilisierung der Struktur. Eine der wichtigsten Erkenntnisse bei der Strukturlösung der Pilz-FAS-I war die Aufteilung der MPT-Domäne auf beide Ketten. Der entsprechende Strangbruch erfolgt dabei innerhalb des globulären MPT-Folds in einer Loop-Region (Jenni *et al.*, 2007).

Bakterielle FAS-I

Die FS-Synthese, die in Organismen der CMN-Gruppe durch ein FAS-I-System ausgeführt wird, ist für Prokaryoten recht ungewöhnlich, da Prokaryoten ihren FS-Bedarf normalerweise durch ein FAS-II-System decken (Stackebrandt *et al.*, 1997; Gago *et al.*, 2011; Grininger, 2014).
Der homohexamere Multienzymkomplex der bakteriellen FAS-I, mit einem Molekulargewicht von 1,9 MDa, liegt ebenfalls als fassartige Struktur vor. Die katalytischen Domänen AT, ER, DH, MPT, ACP, KR und KS (N- nach C-Terminus) sind auf einer 320 kDa großen Polypeptidkette vereint (siehe Abbildung 1.4) (Meurer *et al.,* 1992). AcpS, die bakterielle Phosphopantetheintransferase, sitzt im bakteriellen Genom *downstream* der FAS-I und ist somit nicht Teil der Polypeptidkette (Stuible *et al.,* 1997-B).
Das Enzym der Pilz-FAS-I ist in Struktur und Sequenz homolog zur bakteriellen-FAS-I, was auf eine evolutionäre Verwandtschaft hindeutet (Grininger, 2014) (siehe auch Alignement Pilz- und bakterielle FAS-I im Anhang unter 5.1). Dies belegten auch *negative-stain*-EM Aufnahmen aus den frühen achtziger Jahren (siehe Abbildung 1.3) (Morishima *et al.*, 1982). Bereits bevor weitere strukturelle Charakterisierungen vorgenommen wurden, konnte durch diese *negative-stain*-EM Aufnahmen die Struktur der bakteriellen FAS-I als ebenfalls

fassartiger Komplex mit dreizähliger Symmetrie und die Homologie zur Pilz-FAS-I abgeschätzt werden.

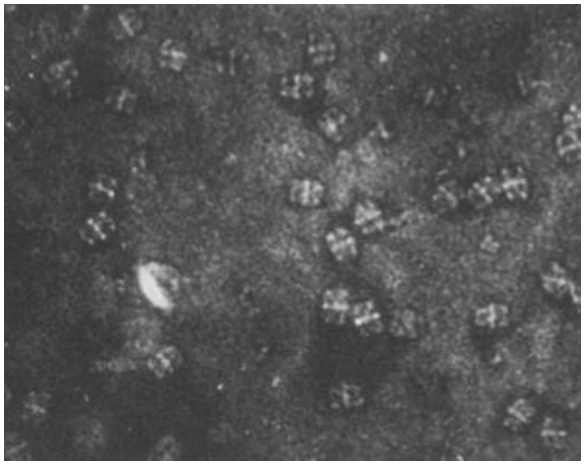


**Abbildung 1.3: *Negative-stain*-EM Aufnahmen der bakteriellen FAS-I aus *Brevibakterium ammoniagenes*.**
Frühe *negative-stain*-EM Aufnahmen belegen durch den fassartigen Charakter des Enzyms die homohexamere Struktur der bakteriellen FAS-I aus *B. ammoniagenes,* heute annotiert als *Corynebakterium ammoniagenes.* Aufnahme aus (Morishima *et al.*, 1982).

Ebenso ließ sich erahnen, dass durch die Lücken in der Sequenz größere Öffnungen in der Reaktionskammer als auch in den Kappen vorliegen würden, was bei den Kappen auf die fehlende TM zurückzuführen ist (Jenni *et al.,* 2007).
Im Vergleich zur Pilz-FAS-I stellt die bakterielle FAS-I eine Minimalversion dieser dar, die in strukturellen Bereichen stark verkürzt ist. Sie kann neben der Säuger- und Pilz-FAS-I als dritte Variante von FAS-I Multienzymkomplexes betrachtet werden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden wichtige Beiträge zur Strukturlösung der bakteriellen FAS-I geleistet.

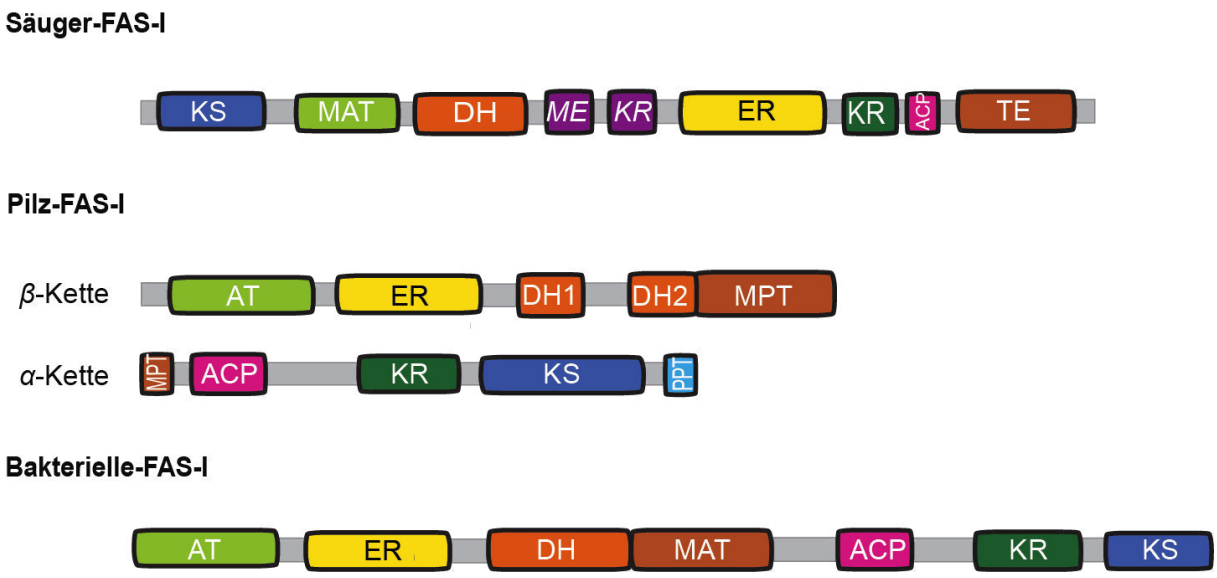



**Abbildung 1.4: Domänenstrukturen der drei FAS-I-Systeme.**
Die Pilz- und bakterielle FAS-I weisen eine ähnliche Abfolge der Domänen auf, welche eine analoge Ausbildung quartärer Komplexe bedingt. In der Säuger-FAS-I, die als homodimerer Komplex vorliegt, sind die Domänen in einer anderen Reihenfolge organisiert. Die Pseudo-Domänen der Säuger-FAS-I sind violett dargestellt und kursiv beschriftet.

### 1.3.2 Ausbildung von Reaktionskammern bei FAS-I-Systemen

Die Pilz- und die bakterielle FAS-I zählen zu den komplexesten biosynthetischen Maschinen (Grininger, 2014). FAS-I Komplexe erlauben die Steigerung der Effizienz der FS-Biosynthese gegenüber FAS-II-Systemen, indem die Zufuhr von Substraten in einer Art Kanalisierung zwischen den verschiedenen aktiven Zentren organisiert ist und damit eine hohe Konzentration an Reaktionsedukten vorliegt (Lynen, 1980; Schweizer & Hofmann, 2004; Smith & Sherman, 2008; Maier *et al.*, 2010). Durch den strukturellen Aufbau und den Reaktionsablauf in FAS-I-Systemen können unspezifische Interaktionen verringert werden (Leibundgut *et al.,* 2008).

Entscheidend für die Funktion von ACP ist eine hohe Konzentration von Substraten und Intermediaten an den katalytischen Domänen, welche durch kovalente Bindung realisiert wird. Durch Verknüpfung über zwei Linker wird die Beweglichkeit dieser Domäne in Pilz- und bakterieller FAS-I stark eingeschränkt (Lynen, 1980; Leibundgut *et al.*, 2007; Gipson *et al.*, 2010), und es kommt zu einer weiteren drastischen lokalen Erhöhung der ACP-Konzentration (Lynen, 1980; Jenni *et al.*, 2007).

Die Funktion des ACPs kann bei FAS-I Systemen mit einem Roboterarm verglichen werden, jedoch mit dem weitreichenden Unterschied, dass ACP keine spezifisch programmierten Wege und Abläufe verfolgt, sondern sich in stochastischer Weise bewegt (Leibundgut *et al.*, 2007; Anselmi *et al.*, 2010; Gipson *et al.*, 2010). Bei dem Pilz- oder bakteriellen FAS-I-System ist ACP Teil der Polypeptidkette (siehe Abbildung 1.1) und N-terminal über einen Linker an die Wand der Reaktionskammer (siehe Abbildung 1.2) verankert sowie C-terminal über einen Linker an das zentrale Rad. Durch diese Doppelverankerung ist die Bewegungsfreiheit von ACP gewährleistet und alle katalytischen Zentren, können während des Zykluses erreicht werden. Durch die beschriebene Bewegung liegt es nahe, dass in der Pilz-FAS-I der Abstand KS-MPT kürzer ist als der Abstand KS-AT (Maier *et al.*, 2010), bedingt durch die höhere Frequentierung der MPT im gesamten Reaktionszyklus. Die zentrale Bedeutung von KS während des Zykluses, spiegelt sich auch in der Krsitallstruktur der ScFAS durch die Bindung von ACP an KS wieder (Leibundgut *et al.*, 2007; Lomakin *et al.*, 2007).

Es kommt bei der Pilz-FAS-I auch zu drei Interaktionen pro *α*-*β*-Untereinheit; den C1-C3 Interfaces. Diese erhöhen die Stabilität der Reaktionskammer zusätzlich. In den Reaktionskammern selbst interagieren die strukturgebenden Domänen eher

durch *β*-*β*-Kontakt. Zur Stabilität der DH tragen insgesamt drei Hot-Dog-Domänen (HDD1-3) bei, die auch den Übergang zwischen DH und ER bilden und stabilisieren. Durch den strukturell sehr starren Rahmen, in welchen die zwei Reaktionskammern der Pilz-FAS-I eingebettet sind, ist die Pilz-FAS-I im direkten Vergleich zur Säuger- und bakteriellen FAS-I konformationell sehr eingeschränkt. Mehr noch, die Pilz-FAS-I bildet durch ihre fassartige Struktur einen in sich abgetrennten Reaktionsbereich im Cytoplasma.

Neben dem fassartigen Aufbau der Pilz- und bakteriellen FAS-I finden wir noch die offene Reaktionskammer der Säuger-FAS-I. Hier ist die KR die zentrale Verknüpfungsstelle der modifizierenden Hälfte. Alle Domänen, katalytisch aktiv oder inaktiv, grenzen direkt an die KR. Auch die höchst flexible ACP-Domäne ist direkt an die KR gebunden, welche am C-Terminus über einen Linker mit der Thioesterase (TE) verknüpft ist. ACP ist somit auch in der Säuger-FAS-I doppelt kovalent gebunden; wenn auch der zweite Anknüpfungspunkt (am C-Terminus von ACP, die TE-Domäne) nicht Teil der katalytischen Kernstruktur, sondern ebenfalls konformationell variabel ist.

Beide FAS-I Reaktionskammern (offen und fassartig) weisen grundlegend verschiedene Bauprinzipien auf. Die konvergente Evolution der Fettsäuresynthese die in individuellen Organismen in unterschiedlichen komplexen FAS-I Gebilden ausgeführt wird, unterstreicht jeweils deren Wichtigkeit.

## 1.4 Strukturelle Untersuchung der FAS-I

In den letzten Jahren konnte die strukturelle Aufklärung maßgeblich zu unserem Verständnis der FAS-I Multienzymkomplexe aus Säugern und Pilzen beitragen. Dies erlaubte bereits vorhandene Strukturinformationen zu den individuellen Domänen in die übergeordnete Architektur einzubetten (Maier *et al.*, 2010; Grininger, 2014).

Erste Versuchsansätze zur Generierung hochaufgelöster Strukturen für die Pilz-FAS-I aus *S. cerevisiae* (ScFAS) reichen bis in die sechziger Jahre des letzten Jahrhunderts zurück (Oesterhelt *et al.*, 1969). Im Jahre 1981 wurde von ersten Kristallen der Säuger-FAS-I aus der Ratte berichtet (Linn, 1981). Diese beiden Arbeiten zeigten früh, dass prinzipiell die Möglichkeit einer

röntgenkristallographischen Strukturlösung der Säuger- und Pilz-FAS-I besteht. Jedoch war zu dieser Zeit die kristallographische Untersuchung solcher Komplexe aufgrund fehlender Röntgenstrahl-Quellen mit hoher Intensität, wie sie in Synchrotron-Einrichtungen erreicht wird und unzureichender Rechnerleistung limitiert. Die Strukturlösung von großen molekularen Assemblierungen galt nicht zuletzt dadurch in der makromolekularen Röntgenkristallographie lange Zeit als letzte große Herausforderung (Harrison, 2004). Durch die wachsende Verfügbarkeit von energiereichen Elektronensynchrotronen der dritten Generation wurde die Umsetzung solcher wissenschaftlichen Vorhaben stark beschleunigt (Mueller *et al.,* 2007). So waren nun auch durch die Verbesserung der Rechenleistung sowie der Anwendungsprogramme (Brunger *et al.*, 2009) Mitte der letzten Dekade dann tatsächlich die Grundlagen gelegt, strukturelle Untersuchungen an großen, hochkomplexen Multienzymkomplexe, wie der FAS-I, vorzunehmen. Die ersten beiden hochaufgelösten röntgenkristallographischen Strukturlösungen der FAS-I waren im Jahr 2006 die eukaryotischen-FAS-I aus dem Pilz *Thermomyces lanuginosus* (TlFAS) (Jenni *et al.*, 2006) sowie aus dem Schwein (Maier *et al.*, 2006). Durch die Platzierung verschiedener strukturhomologer Einzeldomänen in die Elektronendichte der beiden FAS-I Komplexe, konnten die Domänen zugeordnet werden (Jenni *et al.*, 2006; Maier *et al.*, 2006). Im darauffolgenden Jahr konnte die Struktur der ScFAS gelöst werden (Leibundgut *et al.*, 2007; Lomakin *et al.*, 2007), sowie eine höher aufgelöste Struktur der TlFAS (Jenni *et al.*, 2007). Wiederum ein Jahr später wurden strukturelle Daten zur ScFAS mit kovalent gebundenem Inhibitor Cerulenin an der KS-Domäne veröffentlicht (Johansson *et al.*, 2008). Ebenfalls 2008 konnte eine noch höher aufgelöste Struktur der Säuger-FAS-I gezeigt werden (Maier *et al.*, 2008).

Auch gelang es durch Cryo-EM-Daten der Pilz-FAS-I (Gipson *et al.*, 2010) und Säuger-FAS-I (Brignole *et al.*, 2009), strukturelle Modelle zu generieren, welche zum Verständnis der Arbeitsweise dieser Multienzymkomplexe beigetragen haben (Maier *et al.*, 2010; Grininger, 2014).

Von der bakteriellen FAS-I, der dritten Klasse aus der Gruppe der FAS-I-Enzyme, war bis zum Jahre 2013 lediglich bekannt, dass sie als homohexamer Komplex vorliegt; gezeigt in *negative-stain*-EM-Aufnahmen (siehe Abbildung 1.3) der CaFAS (Morishima *et al.*, 1982).

## 1.5 Relevanz der FAS-I in Prokaryoten

Die einzigen Prokaryonten, die ein der Pilz-FAS-I ähnliches System zur Biosynthese von FS nutzen, sind die Mykolsäuren produzierenden Organismen der CMN-Gruppe (Bloch & Vance, 1977; Gago *et al.*, 2011). Die Organismen sind zusätzlich durch ihren speziellen Zellwandaufbau gekennzeichnet (Brennan, 2003; Gago *et al.*, 2011). Zur CMN-Gruppe gehören die hochpathogenen Organismen *Mycobakterium tuberculosis*; *Mycobakterium leprae* und *Corynebakterium diphtheriae.* In dieser Gruppe findet man zudem die Organismen *Corynebakterium glutamicum* und *C. efficiens,* die zur biotechnologischen Produktion von L-Aminosäuren und anderen Metaboliten eingesetzt werden (Eggeling & Sahm, 1999; Fudou *et al.*, 2002; Kalinowski *et al.*, 2003).

Mykolsäuren verleihen diesen Organismen eine hohe Resistenz gegen äußere Einflüsse wie Hitze, Austrocknung und gegen die Behandlung mit Chemikalien wie z. B. Säuren und Lösungsmittel (Daffé & Draper, 1998; Gago *et al.*, 2011; Marrakchi *et al.*, 2014).

Die Zellwand von Corynebakterien und Mycobakterien besteht aus Peptidoglycan, das direkt die Cytoplasmamembran umgibt. Die nächste Schicht der Zellwand ist Arabinogalacton, gefolgt von Mykolsäuren an der äußeren Membran, die an den Enden noch mit Lipiden versehen sind (siehe Abbildung 1.5) (Bhatt *et al.*, 2007; Hoffmann *et al.*, 2008; Gago *et al.*, 2011). Die corynebakteriellen Mykolsäuren bestehen aus gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit einer Kettenlänge von $C_{22\text{-}36}$. Die mycobakteriellen Mykolsäuren hingegen weisen eine Kettenlänge von bis zu $C_{60\text{-}90}$ auf.

*C. ammoniagenes* und *C. efficiens* besitzen zwei verschiedene FAS-I Systeme: FAS-I-A für die Synthese von ungesättigten FS-CoA und FAS-I-B (CaFas; CeFAS) für die Synthese von gesättigten FS-CoA (Meurer *et al.*, 1992; Stuible *et al.*, 1997-A; Radmacher *et al.*, 2005). In ihrem Genom kann kein Gen für die Expression von bakterientypischen FAS-II Enzymen gefunden werden (Gago *et al.*, 2011).

In *M. tuberculosis* anderseits existieren FAS-I und FAS-II parallel in der Zelle, die mit der PKS-13 für die finalen Schritte der Synthese von langen Mykolsäuren verantwortlich sind (Gavalda *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2013). Für die MtFAS konnte gezeigt werden, dass diese trotz zusätzlich existierendem FAS-II-System essentiell für den Fortbestand des Organismus ist (Sassetti *et al.*, 2003;

Lamichhane *et al.*, 2003). Als Ausgangsprodukt der Mykolsäuren dient die bimodale Produktverteilung der MtFAS von $C_{16}$ und $C_{26}$-FS-CoA (Kikuchi *et al.*, 1992). Ein separates ACP-II transportiert die fertigen FS-CoA Ketten der MtFAS zu den katalytischen Zentren der FAS-II Module. Hier werden $C_{16}$-FS-CoA durch die Synthese mit Ma-CoA zu $C_{56}$-Meromykolsäuren verlängert und anschließend durch PKS-13 mit $C_{26}$-FS-CoA zu teils modifizierten $C_{60}$- bis zu $C_{90}$-Mykolsäuren fusioniert. Die Komplexität der Mykolsäuren ist auf ein Zusammenspiel von FAS-I/-II und der modularen PKS-I zurückzuführen (Gokhale *et al.*, 2007).

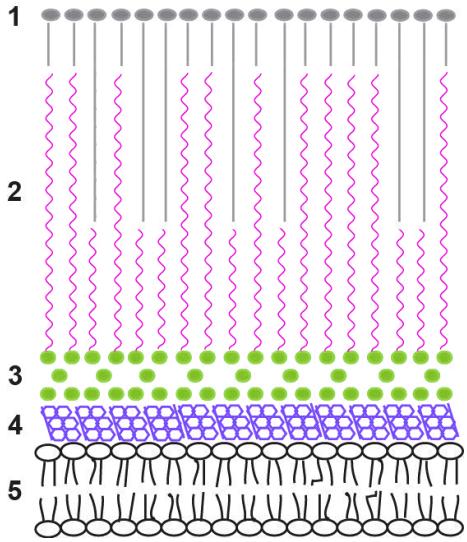



**Abbildung 1.5: Aufbau der Zellwand von *M. tuberculosis* Bakterien.**
Bestandteile der Zellwand bei *M. tuberculosis* Bakterien (1) Äußere Lipide, (2) Mykolsäuren, (3) Arabinogalacton, (4) Peptidoglycan, (5) Zellmembran. Die langen Mykolsäure-Reste schaffen eine Permeabilitätsbarriere und sind so verantwortlich für die Antibiotikaresistenz und die Pathogenität von *M. tuberculosis*.

## 1.6 Die Krankheit Tuberkulose, ausgelöst durch *M. tuberculosis*

Tuberkulose (TB), oft ausgelöst von *M. tuberculosis*, ist eine Krankheit mit potentiell tödlichem Verlauf. Am häufigsten manifestiert sich TB in der Lunge (bis zu 80% aller Fälle), was als pulmonale Form klassifiziert wird (Sharma & Mohan, 2004). Bei anderen, von der Infektion betroffenen Körperorganen spricht man von einer extrapulmonalen Form. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO, 2014) gab es 2014 über 2 Milliarden TB-infizierte Personen, 8,6 Millionen aktive Erkrankungsfälle und bei 1,3 Millionen Menschen verlief die Krankheit letal (WHO, 2014). Von den 1,3 Millionen Todesfällen waren 0,3 Millionen Menschen mit dem Humanen-Immundefizienz-Virus (HIV) infiziert (WHO, 2014). TB wird durch Tröpfchen- und Schmierinfektion übertragen. Nach einer Infektion mit *M. tuberculosis,* werden diese zwar von Makrophagen phagozytiert, können aber anschließend nicht abgetötet werden. Infolgedessen persistieren *M. tuberculosis* oft

jahrelang im primär infizierten Organ. Eine sekundäre Streuung in den gesamten Organismus findet meist erst Jahre später statt, oft bei einer Abschwächung des Immunsystems. Die Eigenschaften, die für das Überleben und die Pathogenität von *M. tuberculosis* verantwortlich sind, begründen sich in der Architektur der Zellwand (Daffe & Draper, 1998; Harrison, 2013). Dieses besondere Merkmal des Zellwandaufbaus zeigte sich schon bei der Entdeckung von *M. tuberculosis*, dem Erreger der TB, im Jahre 1882 durch Robert Koch. Es gestaltete sich dessen Nachweis als nicht trivial, da sich die stäbchenförmigen Erreger bei infizierten Meerschweinchen aufgrund des Zellwandaufbaus nicht anfärben ließen. Der Stellenwert dieser Zellwand zeigt sich auch bei den Therapieansätzen, was deren gesamten Synteseapparat zu einem therapeutischen Ziel macht (WHO, 2014). Aktuell wird betroffenen TB-Patienten in einer Standard-Behandlung eine Kombination von Rifampicin, Isoniazid, Ethambutol und Pyrazinamid für zwei Monate verabreicht. Im Anschluss wird die Therapie auf die Inhibitoren Isoniazid und Rifampicin reduziert, welche über einen Zeitraum von vier Monaten eingenommen werden (Cox *et al.*, 2006). Falls sich Resistenzen gegen einen oder mehrere Wirkstoffe ausbilden wird die Behandlung adaptiert und verlängert (Campbell & Bah-Sow, 2006). Mit Pyrazinamid, Isoniazid, Ethionamid und Triclosan greifen vier Inhibitoren direkt in die Mykolsäurebiosynthese ein. Triclosan wird allerdings nicht therapeutisch in der TB-Behandlung eingesetzt.

Pyrazinamid, ein Analogon von Nicotinamid, soll das Enzym MtFAS, dass als essentiell für *M. tuberculosis* gilt, inhibieren. Dies konnte bereits durch *in-vitro* Studien von Pyrazinamid sowie seinen Derivaten an gereinigter MtFAS gezeigt werden (Zimhony *et al.*, 2000, Sayahi *et al.*, 2011).

Neben den in der Standardtherapie eingesetzten Mitteln gibt es eine Reihe weiterer FS-Synthese-Imhibitoren Isoxyl, Isoniazid und Ethionamid. Isoxyl greift in die Mykolsäurebiosynthese bei HadABC ein. Ethionamid wird nicht primär eingesetzt, sondern findet Verwendung bei der Behandlung von resistenden Stämmen (Wang *et al.*, 2007). Ethionamid ist strukturell ein Analaog von Isoniazid, beide Wirkstoffe zielen auf die Inhibierung von InhA ab (siehe Abbildung 1.6). TB ist zu einem globalen Gesundheitsproblem geworden. Es befinden sich aktuell zwei Impfstoffe gegen die TB in klinischen Phase-I-und-II-Studien (Andersen & Kaufmann, 2014).

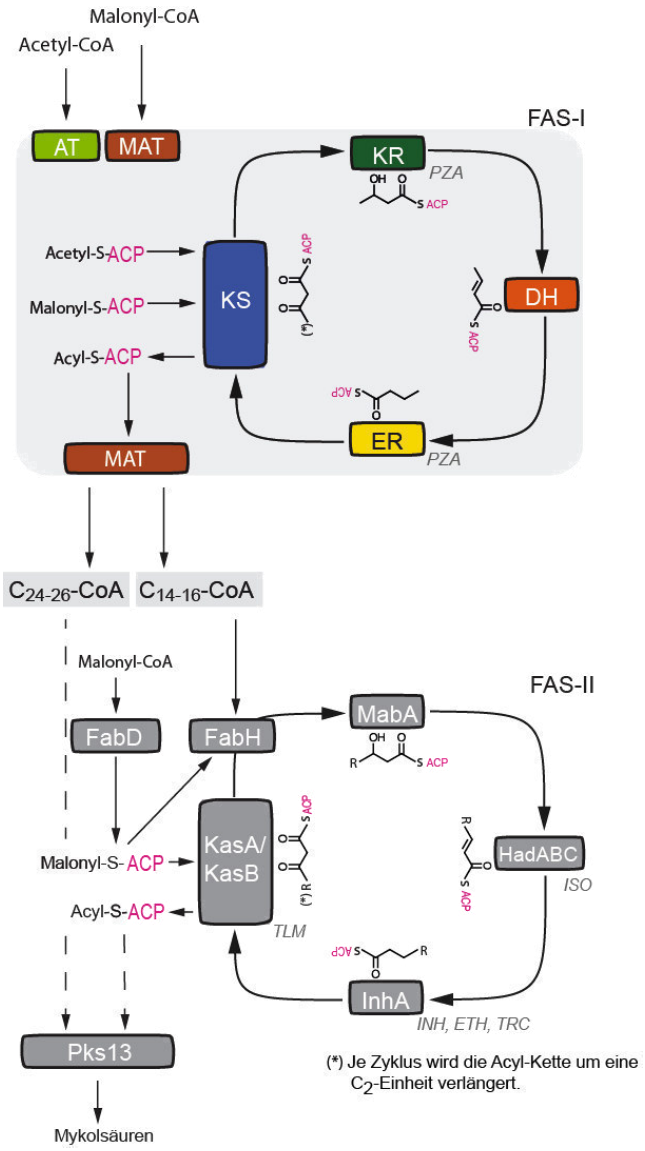



**Abbildung 1.6: Mykolsäurebiosynthese und ihre Inhibierung in *M. tuberculosis***

Gezeigt ist der schematische Ablauf der FS-Produktion in fungalen und bakteriellen FAS-I Systemen im grauhinterlegten Abschnitt. Die Schlüsselrolle nimmt die Ketoacyl-Synthase (KS) ein, die durch Kondensation Ac(et)yl und Malonyl zu β-Ketoacyl vereint. Dieses wird durch die Ketoacyl-Reduktase (KR) zu β-Hydroxyacyl reduziert, durch die Dehydratase (DH) zu Enoyl dehydratisiert und durch die Enoyl-Reduktase (ER) zu Acyl reduziert. Die Substrate Acetyl-CoA und Malonyl-CoA werden durch die Transferasen Acetyl-Transferase (AT) und Malonyl-Acyl-Transferase (MAT) auf ACP (Acyl-Carrier-Protein (in magenta)) übertragen. ACP transferiert die Zwischenprodukte zwischen einzelnen katalytischen Zentren und ist kovalent an den Komplex gebunden. Die Thiol-Gruppe von ACP bindet die Substrate und Zwischenprodukte während des gesamten Prozesses als Ester. MAT ist bei der bakteriellen FAS-I für das Laden und Entladen von ACP zuständig. In Pilz-FAS-I ist MAT als Malonyl-Palmityl-Transferase (MPT) annotiert.

Das divergierende Produktspektrum konnte für CeFAS in dieser Arbeit sowie in Enderle *et al.*, 2014; für CaFAS (Stuible *et al.*, 1997); MsFAS und MtFAS (Kikuchi *et al.*, 1992, Zimhony *et al.*, 2004, Peterson *et al.*, 1997) und für ScFAS (Sumper *et al.*, 1969) gezeigt werden.

In *M. tuberculosis*, verlängert das FAS-II System das FAS-I Endprodukt $C_{14-16}$-CoA welches dann als langkettiges Acyl-Molekül an PKS-13 weitergegeben wird. Pharmakologisch relevante Inhibitoren für die Behandlung von *M. tuberculosis* sind in das Schema eingebettet; Pyrazinamid (PZA) (Zimhony *et al.*, 2000, Sayahi *et al.*, 2011); Isoxyl (ISO) (Gannoun-Zaki *et al.*, 2013); Thiolactomycin (TLM) (Kremer *et al.*, 2000); Isoniazid (INH); Ethionamid (ETH) und Triclosan (TRC) (Sullivan *et al.*, 2006, Benerjee *et al.*, 1994).

## 1.7 Proteinkristallisation und Kristallographie

Die Kristallographie ist eine Methode der Strukturbiologie mit vielen Einsatzmöglichkeiten. Sie wird für die Strukturaufklärung in der Grundlagenforschung bis hin zum *Inhibitor-screening* in der Wirkstoffentwicklung genutzt (Garman, 2014).

Proteinkristallisation

Der dabei erste und limitierende Schritt in der röntgenkristallographischen Untersuchung von Proteinen oder Proteinkomplexen ist das Erzeugen von 3D-Kristallen (50-500 µm Länge) des entsprechenden Zielproteins. Durch die periodische Anordnung im Kristall wird über alle Moleküle das Signal amplifiziert und somit messbar. Kristalle aus Makromolekülen sowie aus Felsgestein z. B. Quarz teilen sich diese Eigenschaft einer regelmäßigen sich wiederholenden Anordnung der Atome. Den kleinsten, sich periodisch wiederholenden Einzelbaustein eines Kristalls nennt man Einheitszelle, die sich durch drei Achsen a, b, c und der drei Winkeln $\alpha$, $\beta$, $\gamma$ beschreiben lässt. Kristalle werden anhand der Raumgruppe klassifiziert. Durch das mathematische Konzept der Einheitszelle wird die Anzahl der nötigen Parameter in der Strukturbestimmung reduziert. Aus strukturbiologischer Sicht unterscheiden sich die Einheitszellen aufgrund der Molekülgröße: Kleine Moleküle nehmen dementsprechend kleinere Einheitszellen ein, und dadurch erhöht sich auch die Anzahl an Einheitszellen, die einen Kristall aufbauen.

Bei der Kristallisation von Biomolekülen wächst durch die Größe der Moleküle nicht nur die Größe der Einheitszelle, auch das Verhältins von Inter- zu Intramolekularen Wechselwirkungen nimmt ab. Somit kommt es durch die Molekülgröße zu einem Wasseranteil von über 50%, verbunden mit Instabilität und Empfindlichkeit.

Für die Kristallisation werden hochkonzentrierte und ultrareine Proteinlösungen mit Lösungen gemischt, wodurch es zu einer Verringerung der Löslichkeit des Proteins kommt. Durch den kontinuierlichen Entzug von Lösungsmittel (Wasser) kommt es bei der Dampfdiffusionstechnik zur Erhöhung der Protein-Protein Kontakte in der metastabilen Phase. In der metabolischen Phase kann es spontan (homogen) oder induziert (heterogen) zu einer Kristallkeimbildung kommen. Erreicht dieser Keim eine kritische Größe, führt dies zur Stabilisierung und bewirkt Kristallwachstum (siehe Abbildung 1.7).

Bei der Kristallisation können einige Probleme auftreten, die die Strukturaufklärung erschweren, bzw. die Auflösung erniedrigen. Durch einen Einbau von

Verunreinigungen kann es zu einem Kristallwachstum vereinzelter Bereiche kommen, welches dann als mosaisches Wachstum bezeichnet wird.
Ein weiteres Problem im Kristallwachstum ist *Twinning, wobei zwei Arten unterschieden werden*. Verwachsungen können zu *makroskopischem Twinning* der Kristalle führen. Dies ist unter dem Mikroskop ersichtlich, erkennbar durch zwei zusammengewachsene Einzelkristalle (siehe Abbildung 3.20.B). Durch Brechen der Verwachsungen können die entstandenen Einzelkristalle manchmal separat vermessen werden.
Beim *merohedralen Twinning,* kommt die Tücke zum Tragen, dass der Fehlbau des Kristalls erst beim Auswerten der kristallographischen Daten bemerkt wird. Hier unterscheidet sich die Anordnung von Proteinen in ihrer Orientierung zu einer kristallographischen Achse. Dieser Fehler im Kristallaufbau führt zu Problemen in der Strukturlösung, oft jedoch können diese Daten gar nicht verwendet werden. Bei der Kristallisation von makromolekularen Komplexen kann es zudem aufgrund der Größe und Aufbaus des Proteins, zu Fehlbau im Kristall kommen (Mueller *et al.,* 2007). Das aktuelle Wissen über die Bildung eines Kristallisationskeimes von Makromolekülen ist sehr gering, unter anderem dem Fakt geschuldet, dass es bis zum heutigen Zeitpunkt nicht möglich war, die Keimbildung von Makromolekülkristallen zu verfolgen.
Durch den Einsatz verschiedener Methoden wie Elektronenmikroskopie (Sharma, 2005; Stevenson *et al.*, 2014) und der Kraftfeld-Mikroskopie (McPherson *et al.*, 2000) konnten lediglich sehr gering aufgelöste Daten zum Wachstum von Proteinkristallen gewonnen werden. Die bakterielle FAS-I bietet mit einer Masse von 1,9 MDa und einer einzigartigen und gut erkennbaren Symmetrie eine ideale Voraussetzung für eine Visualisierung des Keimbildungsprozesses mittels Cryo-EM. Neben der Veranschaulichung der Kristallkeimbildung liefert ein solcher Versuchsansatz viel Information über die zu untersuchenden Mikrokristalle für die sich neu etablierende Methode *X-ray-free-electron-laser* (XFEL) (Stevenson *et al.,* 2014). Bei strukturellen Untersuchungen mit XFEL wird Synchrotronstrahlung mit sehr hoher Brillanz Intensität bei ultrakurzer Pulsdauer eingesetzt, um Nanokristalle (0,2 – 2 µm Länge) zu bestrahlen (Schlichting & Miao, 2012). Die Etablierung von XFEL als Methode zum Lösen von 3D-Strukturen hat den Hintergrund, erstens die Limitierung des Kristallisationsverhalten einzelner Proteine (Redecke *et al.,* 2013) und zweitens die

Problematik durch das Auftreten von Strahlenschaden des Proteinkristalles bei der Datensammlung zu umgehen (Garman, 2010).

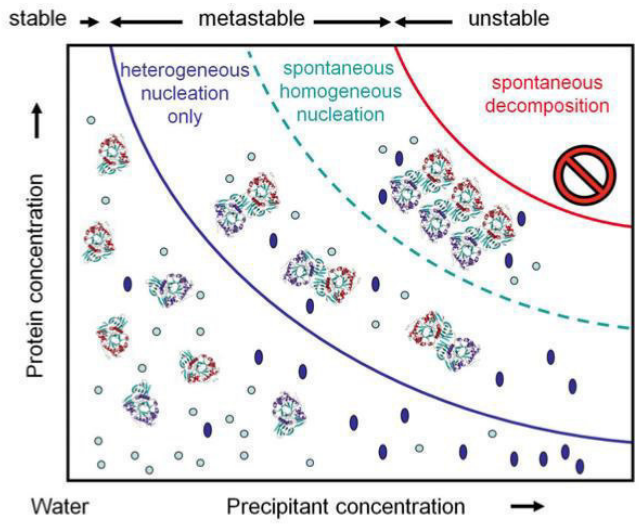



**Abbildung 1.7: Nukleationszonen dargestellt in einem Kristallisationsgramm.**
Das Kristallwachstum lässt sich in Nukleationszonen unterteilen. Es wird angenommen, dass bei geringer Übersättigung eine spontane Nukleation unwahrscheinlich ist. Bei steigender Übersättigung kann es zu einer heterogenen oder homogen Nukleation kommen. Der rote Bereich steht für den Bereich der Instabilität, in dem es zur „Entmischung" kommt. (Rupp, 2009 © Garland Science 2010)

Kristallographie

Die Methode der Kristallographie ist in dieser Arbeit die zentrale Methode und wird hier in Kürze beschrieben, mit einem Verweis auf die inhaltliche Anlehnung des Lehrbuch *Biomolecular Crystallography* von B. Rupp (2009).

Kristallographie beruht auf dem Prinzip der Diffraktion von elektromagnetischer Strahlung an der Elektronenhülle eines Moleküls im Kristall. Durch die symmetrische Anordnung der Moleküle (Kristall) ergibt sich ein entsprechendes Diffraktionsmuster, das durch Detektoren ausgelesen werden kann. Konstruktive Interferenz der Röntgenstrahlung ergibt sich durch die Diffraktion an Gitter- und Netzebenen. Dies wird durch das Braggsche Gesetz ausgedrückt.

$$n\lambda = 2d \sin \Theta_B \qquad \text{(Funktion 1)}$$

Bei dreidimensionalen Gittern eines Kristalles erfolgt die konstruktive Interferenz bei ganzzahligen Vielfachen von einfallendem und ausfallendem Strahl. Die parallelen Ebenen eines Kristalles werden durch eine Netzebenenschar veranschaulicht. Durch Ewald-Konstruktion kann die Richtung der konstruktiven Interferenz im reziproken Raum beschrieben werden. Dadurch können Punkte einer Gitterebene, ausgedrückt durch die *Millerschen Indizes* (hkl) im reziproken Raum, zugehörigen Punkten im Kristallgitter zugeordnet werden.

Bei einer Messungen eines Kristalls entspricht jeder angezeigte Spot einer Diffraktion einer Netzebenenschar. Die entsprechende Lage der Spots bei der Messung hängt von dem Aufbau des Kristallgitters ab, sowie der Auflösung. Bei hoher Auflösung kommt es zu einer Vergrößerung des Streuwinkels, die Spots mit hoher Auflösung verlieren in der Regel an Intensität. Der Betrag der Intensität $I_{hkl}$ mit dem die Spots abgebildet werden, entspricht dem Wert des Quadrats der Strukturfaktoramplitude.

$$|\mathrm{F_{hkl}}|^2 = \mathrm{K\ I/(L\ P)} \qquad \text{(Funktion 2)}$$

Neben der Intensität fließen in die Strukturfaktoramplitude der Skalierungsfaktor K, der Lorentzfaktor L und der Polarisationsfaktor P ein. Da in der Strukturfaktoramplitude die Information über den gebeugten Röntgenstrahl und die zu messende Dichte steckt, lässt sich aus dem Betrag über Fourier-Transformation die Elektronendichte berechnen. Die Elektronendichte wird mit der Wellenfunktion, die im Exponentialterm steckt, beschrieben.

$$P_{\mathrm{xyz}} = \frac{1}{V} \sum h \sum k \sum l \ \ |\mathrm{F_{hkl}}|\ e^{-2\pi i\ (hx+hy+lz)} \quad \text{(Funktion 3)}$$

Allerdings geht bei der Messung Information zur Wellenfunktion verloren. Dies wird in der Kristallographie als Phasenproblem bezeichnet. Bei den verschiedenen Ansätzen das Phasenproblem zu lösen bildet die Patterson-Funktion die Grundlage.

$$P_{\mathrm{xyz}} = \frac{1}{V} \sum h \sum k \sum l \ \ |\mathrm{F_{hkl}}|^2\ e^{-2\pi i\ (hu+hv+lw)} \text{(Funktion 4)}$$

Das Maxima der Patterson-Funktion gibt den relativen Abstand zweier Atome an. Durch die Proportionalität zwischen Maxima der Patterson-Funktion und Ordnungszahl des verwendeten Atoms, macht man sich die Eigenschaft von schweren Atomen (Derivatisierung) zu nutze und bestimmt zuerst deren Position.
Es bestehen mehrere Möglichkeiten das Phasenproblem zu lösen. Die Methode des singulären oder isomorphen Ersatzes (SIR, MIR), der *mulltiwavelength anomalous dispersion* (MAD) und die Methode des *molecular replacement* (MR). Die Methode MR wurde in dieser Arbeit verwendet um das Phasenproblem zu lösen. Man nutzt

Struktur- und Phaseninformationen bereits bekannter homologer Proteine eines sogenannten Suchmodells aus.

Im Anschluss an das Lösen des Phasenproblems folgt die Erstellung der Elektronendichtekarte und die Verfeinerung (*refinement*) des Strukturmodells. Mit dem R-Faktor lässt sich eine Aussage über die Güte des Strukturmodells treffen.

$$R_{meas} = \frac{\sum hkl \sqrt{\frac{N}{N-1}} \sum i \; I_i(hkl) - (I(hkl))}{\sum hkl \sum i \; I_i\,(hkl)} \qquad \text{(Funktion 5)}$$

$$R_{p.i.m.} = \frac{\sum hkl \sqrt{\frac{N}{N-1}} \sum i |I_i(hkl) - (I(hkl))|}{\sum hkl \sum i \; I_i\,(hkl)} \qquad \text{(Funktion 6)}$$

## 1.8 Aufgabenstellung

Der Multienzymkomplex der bakteriellen FAS-I war zu Beginn des Projektes strukturell nur durch *negative-stain*-EM Aufnahmen (Morishima *et al.*, 1982) aus dem Jahre 1982 charakterisiert. Der Hintergrund der Arbeit zur Strukturlösung der bakteriellen FAS-I lag in der Bedeutung dieses Proteins im Organismus *M. tuberculosis*. *M. tuberculosis* ist der Erreger der Infektionskrankheit Tuberkulose (TB). TB hat als Sekundärinfektion bei immunsuppressiven Erkrankungen wie z. B. HIV und durch das vermehrte Auftreten von multiresistenten Stämmen an Gefährlichkeit gewonnen. Sie ist längst kein auf Entwicklungsländer beschränktes Problem mehr, sondern hat durch die Globalisierung auch wieder nach Europa und die USA gefunden. Durch den Kampf gegen die Infektionskrankheit TB ist die MtFAS zu einem interessanten Angriffspunkt für gezielte Therapien geworden. Dies begründet sich durch die zentrale Rolle der MtFAS in der Synthese von Ausgangsprodukten für die Herstellung der Mykolsäuren. Die MtFAS ist bereits jetzt Teil der antibiotischen Strategie, doch wäre eine stärker zielgerichtete Behandlung mit selektiveren Inhibitoren, basierend auf strukturellen Informationen, effizienter und mit weniger Nebenwirkungen verbunden.

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war die Kristallisation und die Strukturlösung der bakteriellen FAS-I aus *C. efficiens* mittels Röntgenkristallographie und aus *M. tuberculosis* mittels Cryo-EM. Zunächst sollte mithilfe von Proteindesign (Klonierung des N-Terminus der Pilz-FAS-I) und der Optimierung der Proteinpräparation die strukturelle Bearbeitung der verschiedenen Proteine verbessert werden. Hier wurden die Pufferbedingungen für die Größenausschlusschromatographie optimiert und die gesamte Kristallisation etabliert.
Eine biophysikalische und biochemische Charakterisierung der Proteine, wie die Untersuchung der Aktivität, der Oligomerisierungseigenschaften des Komplexes mit analytischer Ultrazentrifugation und Größenausschlusschromatographie, Schmelzeigenschaften und die Etablierung von Thermofluor-Untersuchung der bakteriellen FAS-I war ebenso vorgesehen.

# 2. Material und Methoden

## 2.1 Material

### 2.1.1 Geräte

Zentrifugen und Rotoren

| | |
|---|---|
| Avanti J25 und JLA-25.500 | Beckman Coulter, USA |
| Avanti J20-XP und JLA-8.100 | Beckman Coulter, USA |
| Optima™ XL-Analytical Ultracentrifuge und An60Ti | Beckman Coulter, USA |
| | |
| 5810R und A-4-62 | Eppendorf, D |
| 5417R und FA45-30-11 | Eppendorf, D |

FPLC-System und Säulen

| | | |
|---|---|---|
| ÄKTA® Basic | | GE, USA |
| Säulen: | Superose 6 XK 16/70 | GE, USA |
| | Superose 6 10/300 | GE, USA |
| Strep-Tactin Sepharose Säule (10 ml) | | IBA, D |
| RP-18 Säule | | Waters, USA |

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)-Massenspektrometer

HPLC

| | |
|---|---|
| Ulimate 3000 RSLC | Dionex, USA |

MS/MS

| | |
|---|---|
| micrOTOF-Q II mit ESI-Ionenquelle | Bruker, USA |

| Absorptionsspektrometer mit Küvette | |
|---|---|
| Lambda 25, UV-Vis Spektrometer | Perkin Elmer, USA |
| Ultraspec 10 | GE, USA |
| Nanodrop 2000c | Thermo, USA |

| Küvetten | |
|---|---|
| 10 mm Quarzglasküvette | Hellma, D |
| 1 mm Quarzglasküvette | Hellma, D |

| Circulardichroismus-Spektrometer | |
|---|---|
| J-715 Spektropolarimeter | Jasco, J |

| Thermocycler | |
|---|---|
| PCR-Maschine Gene AMP 9700 | Applied Biosystems, USA |
| LightCycler® 480 Instrument II | Roche, CH |
| DNA Thermo Cycler | Eppendorf, D |

| Laborgeräte | Hersteller |
|---|---|
| Agarose Gelelektrophoresesystem | MPIB, D |
| *E. coli* – Schüttler 37°C, 200 rpm (35 ml) | GFL, D |
| *E. coli* – Schüttler 37°C, 180 rpm (2 l) | Infors, CH |
| French Pressure Cell Press | Aminco SLM Instruments, USA |
| Platteninkubator 37°C | Thermo, USA |
| SDS Gelelektrophoresesystem | Life Technologies, USA |
| Stromversorgung für Elektrophorese, EPS 200 | Pharmacia Biotech, S |
| Varioklav | H + P Labortechnik, USA |
| Wasserbad | Julabo, D |

### 2.1.2 Chemikalien

Chemikalien wurden im Reinheitsgrad „*p. a.*" von Sigma-Aldrich (USA) und Merck (D) bezogen. Chemikalien für die Kulturmedien wurden von BD (USA) verwendet. Weitere verwendete Chemikalien sind untenstehend aufgelistet.

| Chemikalien | Hersteller |
|---|---|
| 3-8% NuPAGE Tris-Acetat Gele | Life Technologies, USA |
| Acetoacetyl-CoA Tri-Na-Salz | Sigma-Aldrich, USA |
| Acetyl-CoA Na-Salz | Sigma-Aldrich, USA |
| Agarose | Biomol, D |
| Ammoniumacetat | Sigma-Aldrich, USA |
| B-NADPH Tetra-Na-Salz | Sigma-Aldrich, USA |
| BSA | Sigma-Aldrich, USA |
| DNaseI | AppliChem, D |
| DNA Präparations Kit | Promega, USA |
| DNA-Standard 1 kb | Thermo, USA |
| Ethylenglykol | Fluka, CH |
| HMW-Standard | Life Technologies, USA |
| In-Fusion™ HD Cloning-Kit | Clontech, J |
| IPTG (Isopropyl-*β*-D-thiogalactopyranosid) | Gerbu, D |
| Molekulargewichts-Standard | General Electric, USA |
| PAGE-Blue | Life Technologies, USA |
| PCR Master Mix 2-fach, Phusion | New England Biolabs, USA |
| PEG div. Kettenlänge | Sigma-Aldrich, USA |
| Proteaseinhibitortabletten | Roche, CH |
| ROTI-Safe | Carl Roth, D |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Carl Roth, D |
| SYBR-Orange | Life Technologies, USA |
| Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System-Kit | Promega, USA |

### 2.1.3 Kulturmedien, Pufferlösungen, Stammlösungen

Alle Medien wurden vor der Benutzung für 20 min bei 121°C, 2 bar autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Alle Angaben zu Medien/Agarplatten beziehen sich auf 1 l.

Kulturmedien

LB-Medium (Luria-Bertani Medium)

1,0% (w/v) Trypton

0,5% (w/v) Hefeextrakt

0,5% (w/v) Natriumchlorid

pH 7,0; mit NaOH eingestellt.

Für LB-Agarplatten wurden 1,2% Agar BD (USA) zugesetzt. Es wurde die entsprechende Menge einer 1000-fach Antibiotika-Stammlösung zugegeben.

TB (Terrific broth)-Medium

1,2% (w/v) Trypton

2,4% (w/v) Hefeextrakt

0,4% (w/v) Glycerin 100%

pH 7,5; eingestellt mit 100 mM sterilem $KH_2PO_4/K_2HPO_4$-Puffer

SOC (*Super Optimal broth with Catabolite repression*)-Medium wurde von Agilent (USA) bezogen.

Pufferlösungen

Tris-Borsäure-EDTA (TBE)-Puffer für Agarose Gele

1 M TRIS

0,83 M Borsäure

0,01 M EDTA

Phosphatpuffer für das TB-Medium

0,2 M $KH_2PO_4$

0,8 M $K_2HPO_4$*3 $H_2O$

**Tabelle 2.1: Puffer für die Strep-Tactin-Sepharose-Säule.**

| *Puffer* | TRIS-HCl pH 8,0 (mM) | $NaP_i$* pH 7,2 (mM) | NaCl (mM) | EDTA (mM) | Desthiobiotin (mM) | HABA# (mM) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Puffer W* | | 100 | 150 | 1 | | |
| *Puffer E* | | 100 | 150 | 1 | 2,5 | |
| *Puffer R* | 100 | | 150 | 1 | | 1 |

* $Na_2HPO_4/NaH_2PO_4$ # Hydroxy-azophenylbenzoyl Säure

**Tabelle 2.2: Puffer für die Gelfiltration.**

| *Puffer* | $NaP_i$ pH 6,5 (mM) | $NaP_i$ pH 6,8 (mM) | $NaP_i$ pH 7,2 (mM) | BTP* pH 7,2 (mM) | HEPES # pH 7,2 (mM) | NaCl (mM) | Na-Malonat (mM) | $K_iPO_4$ 7,3 pH (mM) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Puffer AB* | | | | | | | | 400 |
| *Puffer B* | | | | 100 | | 200 | | |
| *Puffer C* | 100 | | | | | 100 | 5 | |
| *Puffer D* | | | 100 | | | 100 | 5 | |
| *Puffer F* | | | | | 100 | 100 | 5 | |
| *Puffer S* | | 200 | | | | | | |

* Bis-TRIS-Propan

# 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

Zu Puffer B wurde zusätzlich noch 10% Glycerol zugegeben.

**Tabelle 2.3: Thermofluor-Pufferscreen.**

| *Nr.* | *Puffersubstanz* | *pH-Wert* |
|---|---|---|
| 1. | Na-Acetat | 4,5 |
| 2. | Na-Citrat | 4,7 |
| 3. | Na-Acetat | 5,0 |
| 4. | K-Phosphat | 5,0 |
| 5. | Na-Phosphat | 5,5 |
| 6. | Na-Citrat | 5,5 |
| 7. | MES | 5,8 |
| 8. | K-Phosphat | 6,0 |
| 9. | Mes | 6,2 |
| 10. | Na-Phosphat | 6,5 |
| 11. | Na-Cacodylat | 6,5 |
| 12. | MES | 6,5 |
| 13. | K-Phosphat | 7,0 |
| 14. | HEPES | 7,0 |
| 15. | AmmoniumAcetat | 7,3 |
| 16. | Na-Phosphat | 7,5 |
| 17. | TRIS | 7,5 |
| 18. | Imidazol | 8,0 |
| 19. | HEPES | 8,0 |
| 20. | TRIS | 8,0 |
| 21. | TRICIN | 8,0 |
| 22. | TRIS | 8,5 |
| 23. | CAPSO | 9,0 |

Es wurden stets 1 M Lösungen verwendet.

Stammlösungen

Ampicillin (1000-fach)

100 g/l Ampicillin; steril filtriert

Chloramphenicol (1000-fach)

50 g/l Chloramphenicol; steril filtriert

IPTG (1000-fach)

238 g/l IPTG; steril filtriert

6-fach DNA-Probenpuffer

| | | | |
|---|---|---|---|
| 47% (v/v) | Glycerin 87% | | 5,4 ml |
| 10 mM | TRIS-HCl pH 7,0 | 1 M | 0,1 ml |
| 50 mM | EDTA | 0,25 M | 2,0 ml |
| 0,025% (w/v) | Bromphenolblau 2% (in 20% Ethanol) | | 0,125 ml |
| 0,025% (w/v) | Xylencyanol FF 2% (in 20% Ethanol) | | 0,125 ml |
| | $H_2O$ | | ad 10 ml |

5-fach Protein-Probenpuffer

| | | |
|---|---|---|
| 25% (v/v) | Glycerin 87% | 2,85 ml |
| 12,5% (v/v) | 2-Mercaptoethanol | 1,25 ml |
| 75 mg/ml | SDS | 750 ml |
| 0,25 M | Tris-HCl pH 8,0 | 2,5 ml |
| 0,25 mg/ml | Bromphenolblau | 2,5 mg |
| | $H_2O$ | ad 10 ml |

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

*NuPAGE* Tris-Acetat Mini Gele und der entsprechende *Novex* Tris-Acetat Laufpuffer (20-fach) von Life Technologies (USA) wurden verwendet.

### 2.1.4 Genomische DNA, *E. coli*-Stämme, Vektoren, Plasmide, Oligonukleotide

Genomische DNA

Zur Klonierung der CeFAS wurde die DNA des Stammes *C. efficiens* (DSM 44549) (Fudou *et al.*, 2002) von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSZM) Braunschweig bezogen. Die genomische DNA wurde bei -20°C gelagert.

Zur Klonierung der MtFAS wurde ein pYUB956-Plasmid (Expressionsplasmid für *M. smegmatis*) das die kodierenden Sequenz der FAS-I aus *M. tuberculosis* trägt verwendet. Das Plasmid wurde uns freundlicherweise von Prof. W. R. Jacobs Jr. vom Howard Hughes Medical Institute (USA) zur Verfügung gestellt.

Die Klonierung der CaFAS wurde bereits in (Enderle, 2010) beschrieben.

Alle Sequenzen der FAS-I und AcpS befinden sich im Anhang unter 5.4.

*E. coli*-Stämme

**Tabelle 2.4: *E. coli*-Stämme.**

| Stamm | Genotyp | Hersteller |
|---|---|---|
| *BL21-Gold (DE3)* | *E. coli* B $F^-$ *ompT hsd*S($r_B^-$ $m_B^-$) *dcm*$^+$ Tet´ *gal* λ(DE3) endA Hte | Agilent, USA |
| *Stellar* | *E.coli F-, endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, Φ80d lacZΔ M15, Δ (lacZYA-argF) U169, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), ΔmcrA, λ-* | Clontech, J |
| *DH5α* | *E. coli* $F^-$ Φ 80 *lac* Z Δ M15 Δ (*lac*ZYA-*arg*F) U169 *rec*A1 *end* A1 *hsd* R17($r_K^-$, $m_K^+$) *pho*A *sup* E 44 *thi*-1 *gyr* A 96 *rel*A1 $\lambda^-$ | Life Technologies, USA |

Vektoren

| | |
|---|---|
| *pET*22b(+)strepI | Novagen, UK |
| *pME*StrepII-164-I(+)strepII | Novagen, UK |
| Ein *pET*22b Derivat mit zusätzlichem Strep-II-Bindemotiv. | |
| *pET*coco-I | Novagen, UK |
| *pET*Duet | Novagen, UK |

Für die rekombinante Expression des Zielproteins in *E. coli* wird ein *pET*22b(+)-Derivat (*pME*strepII-164-I(+)) mit zusätzlichem N-terminalen Strep-II-Bindemotiv zur Klonierung verwendet. Das AcpS für die posttranslationale Modifikation der FAS-I ist in einem *pET*coco-I-Vektor kloniert. Als Selektionsmarker dient Ampicillin für die *pET*22b(+)-Plasmide und Chloramphenicol für die *pETcoco*-I-Plasmide. Es wurde auch die MtFAS in einen *pET*Duet-Vektor kloniert. Die Vektorkarten der Ausgangsvektoren und Expressionsplasmide befindet sich mit hervorgehobenem Klonierungsabschnitt der Ausgangsvektoren im Anhang unter 5.5. Die Expression des Zielproteins wird durch das *lac*-Operon kontrolliert und mit IPTG induziert.

CaFAS-Plasmide

*pME100Strep-I-CaFAS*

*pME101Strep-II-CaFAS*

CaFAS-Plasmide mit N-terminaler Pilz-Trimerisierungsdomäne

*pAR1StrepII-TriS-CaFAS*

*pAR2StrepII-TriT-CaFAS*

CaAcpS-Plasmide

*pME150CaAcpS-short*

*pME151CaAcpS-long*

MtFAS-Plasmide

*pME200StrepII-MtFAS*

*pME201StrepI-MtFAS*

MtFAS-AcpS-Plasmid

*pME210StrepII-MtFAS-AcpS*

*M. tuberculosis*-AcpS-Plasmid

*pME250MtAcpS*

CeFAS-Plasmide

*pME300Strep-II-CeFAS*

*pME301Strep-II-CeFAS-S1778A-S1779A*

CeAcpS-Plasmid

*pME350CeAcpS*

Oligonukleotide

Die unten aufgeführten Oligonukleotide (Primer) für die Klonierung und Sequenzierung der Ziel-DNA wurden von Metabion (D) und Sigma-Aldrich (USA) im Reinheitsgrad „desalted“ bezogen.

Die Schmelztemperatur wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$T_M = 3\ \Sigma(C_i + G_i) + 2\ \Sigma(A_i + T_i)$$

Die Primer wurden in einer Endkonzentration von 0,2 µmol/l verwendet.

Verwendete Klonierungsprimer

pME101 Klonierungsprimer CaFAS
L1 for primer:
AAA AGG CGC CGG ATC CAC TAT TGG CAT CTC TAA CCA CCG CCT GG

L2 rev primer:
GGT GAT GAT GCT CGA GCT GGT GGC TTG CCG TAG ATC GCT TGC

pME150 Klonierungsprimer CaAcpS-short
L3 for primer:
CCT CTA GAA ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAA GCA TGA CCG TGG GTG TGG ACT TGG TC

L4 rev primer:
GGT GCT CGA GTG CGG CCT AGG TTA CCG CTG GTA CCG

pME151 Klonierungsprimer CaAcpS-long
L5 for primer:
CCT CTA GAA ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAA GCA TGC TCG ACA ACC GTG AAG CGA TGA C

L6 rev primer:
GGT GCT CGA GTG CGG CCT AGG TTA CCG CTG GTA CCG

pME200 Klonierungsprimer MtFAS
L7 for primer:
ACG ATC CAC GAG CAC GAC CGG GTG

L8 rev primer:
GCC GAT ATA CGC CTC GCC GTC ACC

pME210 Klonierungsprimer MtFAS AcpS
L9 for primer FAS-I:
AGG AGA TAT ACC ATG ATG TCA GCG TGG AGC CAC CC

L10 rev primer FAS-I:
ATG CGG CCG CAA GCT TCA GCC GAT ATA CGC CTC GCC

L11 for primer AcpS:
AAG GAG ATA TAC ATA ATG GGC ATC GTC GGT GTG

L12 rev primer AcpS:
CTT TAC CAG ACT CGA TCA CGG GGC CTC CAG GA

pME250 Klonierungsprimer MtAcpS
L13 for primer:
CCT CTA GAA ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAA GCA TGG GCA TCG TCG GTG TGG GG

L14 rev primer:
GGT GCT CGA GTG CGG CCT AGG TCA CGG GGC CTC

pME300 Klonierungsprimer CeFAS
L15 for primer:
CGA AAA AGG CGT CGA CGT GAC CGA ACC AGG CAG CAA CTT CGG G

L16 rev primer:
GGT GGT GGT GCT CGA GTT AGC CTT CGT AAC CGG TCG GCT TGA GG

pME301 Modifizierungsprimer CeFAS S1778A S1779A
L17 for primer:
GCG GCG CGC CGC AAC CAG CTG C

L18 rev primer:
GGT TGC GGC GCG CCG CGA CAC CCT CCA CGA GTG TC

pME350 Klonierungsprimer CeAcpS

L19 for primer:

AGA AGG AGA TAT AAG CAT GAT CTC GAT TGG AAC CGA TC

L20 rev primer:

TCG AGT GCG GCC TAG GCT ACC TGT TCT CGG TGG CCA C

Verwendete Sequenzierungsprimer

Für die Sequenzierung wurden Primer mit einer Schmelztemperatur ($T_M$) im Bereich 58-62°C verwendet.

Restriktionsenzyme

| | |
|---|---|
| *BamHI* | New England Biolabs, USA |
| *XhoI* | New England Biolabs, USA |
| *DpnI* | New England Biolabs, USA |
| Puffer 3 (10-fach) | New England Biolabs, USA |

### 2.1.6 Kristallographie

Sparse-Matrix-Screens

Zu Beginn der Kristallisationsexperimente wurden verschiedenste Bedingungen (pH-Werte, Konzentrationen, verschiedene Salze, Puffersysteme sowie Fällungsmittel) mit Sparse-Matrix-Screens getestet.

| Screen | Vertreiber |
|---|---|
| Crystal Screen | Hampton Research, USA |
| Index | Hampton Research, USA |
| PEG $R_x$ | Hampton Research, USA |
| Salt $R_x$ | Hampton Research, USA |
| Ammoniumsulfat | Qiagen, USA |
| Cations | Qiagen, USA |

| | |
|---|---|
| JCSG | Qiagen, USA |
| MPD | Qiagen, USA |
| PACT | Qiagen, USA |
| PEG | Qiagen, USA |
| Morpheus | Molecular Dimension, UK |
| PGA | Molecular Dimension, UK |
| Complex Screen | MPIB, D |
| Complex Screen II | MPIB, D |
| CP – PEGS – Salt Screen | MPIB, D |
| Crystal platform Magic I | MPIB, D |
| Crystal platform Magic II | MPIB, D |

Kristallisationsplatten und Deckgläschen

Die Lindro Kristallisationsplatten mit Silikonrand für die hängende Tropfen Dampfdiffusionstechnik und die silikonisierten Deckgläschen wurden von Jena Bioscience (D) bezogen.

Kristallisationszubehör

| | |
|---|---|
| EMBL/ESRF Sample changer Kit | Molecular Dimension, UK |
| Cryo-loops, Cryo-caps, Cryo-vial | Hampton Research, USA |
| Dry-Shipper | Taylor Wharton, USA |
| Binokularmikroskop für Kristallbilder | Olympus SZX12, J |
| | Canon Kamera, J |
| Binokularmikroskop zum Einfrieren der Kristalle | Wild M3Z, CH |

### 2.1.7 Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopie (EM) *negative-stain*-EM und 2D-Kristallkeimbildung

| | |
|---|---|
| Elektronenmikroskop CM200 FEG | FEI, Niederlande |

Betrieben bei 160 kV in einem „low-dose bright-field“ Modus.

| | |
|---|---|
| Ladungskopplungskamera (CCD) | TVIPS, D |

*Negative-stain*-EM- und 2D-Kristallkeimbildungszubehör

*EM-negative stain*

Grid

| | |
|---|---|
| Copper Grid 400*100 Mesh | AGAR Scientific, UK |

Färbemittel

| | |
|---|---|
| Uranylacetat | Sigma-Aldrich, USA |

2D-Kristallwachstum

Grid siehe CET.

EM und Arbeitsmodus für CET

| | |
|---|---|
| Elektronenmikroskop TITAN Krios: | FEI, Niederlande |
| Gekoppelt mit einer direkte Detektorkamera: K2 | Gatan, J |

CET-Zubehör

Grid

| | |
|---|---|
| Carbon Grid | Quantifoil, D |

Schwermetall

| | |
|---|---|
| Goldpartikel | Abt. Baumeister (MPIB), D |

### 2.1.8 Software und Datenbanken

| | |
|---|---|
| Aimless | Bruker MS-Software Paket |
| CCP4i-Arbeitspaket | Chimera |
| ChemDraw | CLC-Workbench |
| EDNA | Eman2 |
| ePDB | Expasy |
| iMOSFLM | Jalview |
| PDBsum | Phenix-Abreitspaket. |
| Pymol | Sedfit |
| TOM-Softwarepaket | Uniprot |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische Methoden

Lagerung

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach einer Transformation (BL21-Gold, Stellar und DH5*α*) mehrere Tage auf LB-Agar Platten im Dunkeln bei 4°C gelagert. Zellen aus Expressionskulturen wurden vor der Lagerung bei - 80°C in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Kultivierung

Die Kultivierung von *E. coli*-Kulturen auf LB-Agar Platten wie auch in Flüssigkulturen wurde unter sterilen Bedingungen und unter Berücksichtigung des Gentechniksicherheitsgesetzes durchgeführt.

Für die Isolierung von amplifizierter Vektor-DNA wurden *E. coli*-Zellen in 35 ml LB-Medium bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Für die Expression in *E. coli* wurden 2 l TB-Medium mit einer 35 ml *E. coli*-Übernachtkultur (LB-Medium) angeimpft und bei 37°C und 180 rpm kultiviert.

### 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation des FAS-I-Gens wurde der Phusion Flash Master Mix 2-fach von New England Biolabs (USA) verwendet. Der zu amplifizierende Abschnitt wurde durch die Primer (2.1.4) eingegrenzt. Eine Standardzusammensetzung sah wie folgt aus.

PCR-Ansatz mit Phusion Flash Master Mix

| | |
|---|---|
| Phusion Flash Master Mix 2-fach | 25 µl |
| Primer For | 2,5 µl |
| Primer Rev | 2,5 µl |
| Template DNA (~ 100 ng) | 0,5 µl |
| Bidest. $H_2O$ | 19,5 µl |

PCR-Programm für PCR mit Phusion Flash Master Mix

| | | |
|---|---|---|
| Initiale Denaturierung | 98°C, 1 min | |
| Denaturierung | 98°C, 10 sec | 30 Zyklen |
| Annealing | 58°C, 20 sec | 30 Zyklen |
| Elongation | 72°C, (30 sec / 1 kb) | 30 Zyklen |
| Finale Elongation | 72°C, 5 min | |

Für die PCR von AcpS wurde der Phusion Flash Master Mix 2-fach von New England Biolabs (USA) verwendet. Der zu amplifizierende Abschnitt wurde durch die Primer unter 2.1.4 eingegrenzt. Ein Standardprotokoll sah wie folgt aus.

PCR-Ansatz für Megaprimer Methode

| | |
|---|---|
| Phusion Flash Master Mix 2-fach | 25 µl |
| Primer for | 1 µl |
| Primer rev | 1 µl |
| Template DNA ~ 100 ng | 1 µl |
| Bidest. $H_2O$ | 22 µl |

PCR-Programm für Megaprimer Methode

| | | |
|---|---|---|
| Initiale Denaturierung | 98°C, 10 sec | |
| Denaturierung | 98°C, 1 sec | 30 Zyklen |
| Annealing | 60°C, 5 sec | 30 Zyklen |
| Elongation | 72°C, 3 min 10 sec | 30 Zyklen |
| Finale Elongation | 72°C, 1 min | |

Die *Annealing*-Temperaturen der Primer beziehen sich auf die in 2.1.4 aufgeführten Primer.

DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Zum Trennen der PCR-Produkte wurde die DNA-Agarose-Gelelektrophorese angewendet. Üblicherweise wurde ein 1% Gel mit TBE-Puffer als Laufpuffer verwendet. Für die Visualisierung der DNA-Fragmente wurde die entsprechende Menge Roti-SAFE von Carl Roth (D) verwendet. Zum Größenvergleich wurde 5 µl 1 kb DNA-Standards von Thermo (USA) mit auf das Gel aufgetragen.

Extraktion von DNA aus Gel

Die PCR-Produkte wurden aus den Agarose-Gelen mittels des Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Systems nach den Herstellerangaben von Promega (USA) aufgereinigt.

Konzentrationsbestimmung von DNA- und Proteinlösungen mittels Nanodrop Spektrometer

Die Konzentration von DNA- und Proteinlösungen wurde mit einem Nanodrop 2000c Spektrometer der Firma Thermo (USA) bestimmt. Das Volumen von 2 µl der jeweiligen Probe wurde gegen Puffer vermessen.

Doppelrestriktionsverdau des Vektors pET22b(+)strepII

Eine Linearisierung des Vektors für die Vorbereitung zur In-Fusion Klonierung wurde im Doppelverdau durchgeführt. Der Verdau wurde unter einem Überschuss an Restriktionsenzymen durchgeführt.

Restriktionsverdauansatz

| | |
|---|---|
| Plasmid (c~170 ng/µl) | 55 µl |
| *BamHI* | 6 µl |
| *XhoI* | 6 µl |
| BSA | 0,8 µl |
| Puffer 3 (10-fach) | 8 µl |

Der Verdau erfolgte innerhalb von 3 h bei 37°C und 200 rpm. Die im Restriktionsansatz linearisierten Vektoren wurden in einem Agarose-Gel aufgetrennt, ausgeschnitten und wie in 2.2.3 beschrieben gereinigt.

In-Fusion-Klonierung

Die Durchführung der ligationsfreien Klonierung des linearisierten Vektors (pET22b(+)strepII) und des Inserts FAS-I erfolgt mit dem In-Fusion HD Cloning-Kit nach Herstellerangaben von Clontech (J). Das Ligationsprodukt wurde im Anschluss ebenfalls nach Herstellerangaben von Clontech (J) mit *E. coli* Stellar Zellen transformiert.

Transformation

DH5*α*- und BL21-Gold kompetente Zellen wurden zur Plasmid-Amplifikation oder Proteinexpression verwendet. Für die Klonierung wurden ausschließlich kompetente Stellar Zellen von Clontech (J) verwendet.

Die Transformation in kompetente Zellen wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen auf entsprechende Selektionsantibiotika-Platten ausgestrichen. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie mit einer Impföse gepickt und mit 35 ml LB-Medium angeimpft. Das Medium wurde ebenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt.

Präparation der Plasmid-DNA

Für die Präparation der Plasmid-DNA aus Zellen wurde das Pure Yield Plasmid Miniprep System von Promega (USA) nach Herstellerangaben verwendet.

DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der durch Klonierung generierten Plasmide erfolgt durch die Sequenzierungsmethode nach Sanger. Die Sequenzierung führt die Firma GATC (D) durch. Die Proben wurden entsprechend der Firmenangaben für die Sequenzierung vorbereitet.

### 2.2.3 Proteinchemische Methoden

Epression und Zellaufschluss

Eine 2 l TB-Medium-Kultur wurde mit 35 ml LB-Medium einer *E. coli* BL21 Übernachtkultur angeimpft. Die Zellen wurden bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Bei einer $OD_{600}$ von ca. 0,8-1,0 wurde die Kultur rasch im Eisbad auf 20°C abgekühlt. Nach Erreichen der Zieltemperatur wurde die Kultur für weitere 10 min bei 20°C und

180 rpm geschüttelt bis die Proteinexpression durch Zugabe einer finalen Konzentration von 0,5 mM IPTG induziert wurde.
Nach Inkubation bei 20°C und 180 rpm über Nacht wurden die *E. coli* Zellen durch Zentrifugation bei 6000 g für 12 min und 4°C in zwei 1 l Gefäßen der Firma Beckman Coulter (USA) geerntet. Die Zellpellets wurden in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und entsprechend des Zellnassgewichtes in Puffer W resuspendiert oder zur späteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert (siehe 2.2.1.1).
Für die Präparation des Zielproteins wurden die Zellen mit DNase-I von Applichem (D) und Proteaseinhibitor-Tabletten von Roche (CH) versetzt und mittels French Press bei 950 PSI lysiert. Die Suspension wurde in Zentrifugenröhrchen von Beckman Coulter (USA) überführt und bei 45000 g für 1 h pellitiert. Der Lysatüberstand wurde abgenommen und zur Proteinreinigung verwendet. Die Reinigungsschritte des Zielproteins fanden die gesamte Zeit bei 4°C bzw. auf Eis gelagert statt.

Reinigung des Proteins mittels Strep-Tactin Affinitätschromatographie

Die 10 ml-Strep-Tactin-Säule wurde entsprechend der Herstellerangaben von IBA (D) mit Puffer W äquilibriert. Das Cytosol wurde in Puffer W auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumen des Puffer W gespült. Das an die Säule gebundene Protein wurde im Anschluss mit 6 halben Säulenvolumen des Puffer E eluiert und die entsprechenden Fraktionen wurden einzeln gesammelt.

Konzentrieren des Proteins

Zum Erreichen der gewünschten Zielkonzentration des Proteins für die Gelfiltration oder weiteren Experimenten wurden Amicon Ultra-Zentrifugationsfilter von MerckMillipore (D) mit einem Ausschlussvolumen von 100 kD bei 3800 g verwendet.

Größenausschlusschromatographie (*Size-Exclusion-Chromatography*, SEC)

Zum Austausch des Puffers und zur Überprüfung der Oligomerisierung des Proteins erfolgt die SEC als finaler Reinigungsschritt. Die Auswahl der Säule hing von der Menge des Zielproteins ab. Die Flussrate wurde entsprechend der Herstellerangaben von GE (USA) gewählt. Es erfolgte eine Detektion bei 280 nm. Die Fraktionen in denen sich das Protein befindet, wurden vereint und wie unter 2.2.3.4 konzentriert. Für die SEC wurden die Puffer B, C, D, F und S eingesetzt.

SDS-Gelelektrophorese

Die analytische Gel-Elektrophorese wurde unter der denaturierenden Einwirkung von SDS durchgeführt. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit Protein-Auftragspuffer bei 95°C für 5 min denaturiert (Lämmli *et al.,* 1970). Es wurden Tris-Acetat-Mini-Gele von Life Technologies (USA) mit dem entsprechenden Novex SDS-Laufpuffer verwendet. Proteine wurden in einem elektrischen Feld von 120 V für 1 h entsprechend ihrer Größe getrennt. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde das Gel mit PAGE-Blue von Life Technologies (USA) gefärbt.

Proteindenaturierung

*Schmelzkurve*

Für die Circulardichroismus (CD) -Spektroskopie wurden 300 µl Proteinlösung mit einer Konzentration von 0,2 mg/ml in Puffer S eingesetzt. Die Detektion erfolgte bei 222 nm mit einer Heizrate von 1°C / pro Minute.

*Thermofluor-Methode*

Für die Überprüfung der Proteinstabilität unter diversen Pufferbedingungen sowie in verschiedenen pH-Bereichen wurden in Anlehnung an (Ericsson *et al.*, 2006) fluoreszenzbasierte thermische Stabilitäts-Assays verwendet. Für die finale Konzentration des Puffers wurde je 100 mM gewählt. Die Sypro-Orange Stammlösung von Life Technologies (USA) wurde mit einer finalen 3,3-fachen Konzentration eingesetzt. In jeden Standard-Assay wurde 100 mM Pufferlösung und 1 mg/ml der Proteinlösung zugegeben.

UV/Vis-Spektrum

Für UV/Vis-Spektren wurde 500 µl Proteinlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml in Puffer B, C, D eingesetzt. Die Detektion erfolgte in einem Wellenlängenbereich von 280 - 340 nm.

## 2.3 Biochemische Methoden

### 2.3.1 Aktivitäts- und Produktassay der bakteriellen FAS-I

Aktivitäsassay

Zur weiteren Überprüfung der Proteinqualität und der Oligomerisierung dient nach SEC und SDS-PAGE auch die Durchführung eines Aktivitätsassay der FAS-I.

Die Enzymaktivität wurde in 120 µl-Ansätzen bestimmt. Hierfür wurde der Verbrauch von NADPH bei einer Wellenlänge von 334 nm detektiert. Die Messung wurde in einer Quarzglasküvette mit 1 cm Schichtdicke durchgeführt und an einem UV/Vis Spektrometer von Perkin-Elmer (USA) aufgenommen. Eine zweite Küvette mit Puffer AB diente als Referenz. Für einen Ansatz wurden 25 µg FAS-I, 50 nmol Acetyl-CoA, 30 nmol NADPH in 60 µl Puffer AB gemischt und mit bidest. $H_2O$ auf 120 µl aufgefüllt und 10 min bei RT inkubiert. Nach einer Minute Messung wurden 60 nmol Malonyl-CoA zugeben und dann für weitere 10 min gemessen (Lynen, 1969).

Produktassay

Zu dem oben beschrieben Assay wurde $C_{17}$-CoA von Sigma-Aldrich (USA) als interner Standard hinzugefügt und die Reaktion erfolgte für 16 h bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von vorgekühltem Aceton (-20°C) terminiert. Die Lösung wurde im Anschluss für 20 s geschüttelt und für 60 s gefroren (-20°C). Die entstandene Suspension wurde 5 min bei 20000 g zentrifugiert und anschließend ¾ des Überstandes abgenommen zum Evaporieren des Lösungsmittels in der SpeedVac von Savant (USA) bei 4°C. Die CoA-Ester wurden in 60 µl bidest. $H_2O$ gelöst und konnten so mittels LC-MS gemessen oder bei 20°C gelagert werden.

## 2.4 Kristallographie

### 2.4.1 Kristallisation der bakteriellen FAS-I

Die Proteinkristalle wurden mit der Dampfdiffusionstechnik im hängenden Tropfenverfahren in Lindro Platten angesetzt und bei 4°C gelagert. Die Reinheit des Zielproteins wurde nach der SEC mit SDS-PAGE überprüft (siehe Abbildung 3.1). Das Protein wurde mit einer Konzentration von 5 mg/ml-7,5 mg/ml in Puffer B (CeFAS); Puffer C (CaFAS) und Puffer D (MtFAS) kristallisiert. Vor jedem Kristallisationsansatz wurde das Zielprotein mit einem Filter der Porengröße 0,22 µm MerckMillipore (D) filtriert. Pro Kristallisationsreservoir wurde 600 µl Kristallisationslösung mit Fällungsmittel in die Lindro-Platte vorgelegt. Anschließend wurden 1-2 µl Kristallisationslösung auf das Deckgläschen pipettiert und mit 1-2 µl Proteinlösung überschichtet. Das Deckgläschen mit dem Kristallisationstropfen wurde umgedreht und mit dem Silikonrand der Lindro-Platte luftdicht verschlossen. Das Kristallwachstum konnte nach einer Woche mit einem Binokularmikroskop überprüft werden.

Zu Beginn der verschiedenen Kristallisationsprojekte der CaFAS, CeFAS und MtFAS wurden mögliche Kristallisationsbedingungen mit kommerziell erhältlichen, mehrdimensionalen *sparse-matrix-screens* (2.1.6.1) ausgetestet. Bei den *sparse matrix*-Screens handelt es sich um 48-96 unterschiedliche Kristallisationsbedingungen, die in der Zusammensetzung des Fällungsmittels, des Puffers und des Salzes variieren. Hier können sich neben der Variation der Komponenten auch die Konzentration oder der pH-Wert unterscheiden. Die Zusammensetzung ist entweder systematischen Ursprungs oder beruht auf empirischen Erfahrungen von bereits bekannten Kristallisationsbedingungen.

### 2.4.2 Dehydratisierung der CaFAS und CeFAS

In (Heras & Martin, 2005) sind verschiedene Methoden von *post-crystallization-treatments,* unter anderem die Dehydration, beschrieben. Bei dem hier gewählten Ansatz wurden die Kristalle zuerst mit einer Nylonschlaufe von Hampton Research (USA) geerntet und in eine Stabilisierungslösung umgesetzt (+ 5% des entsprechenden PEG (Polyethylenglykol)-Fällungsreagenz). In weiteren Schritten nach jeweils 24 h wurden die Kristalle, wie oben beschrieben geerntet und

in einem neuen Tropfen, mit einer 5% höheren Konzentration des entsprechenden PEG-Fällungsreagenz, verstörungsfrei platziert. Diese wurde beliebig oft bis zum Erreichen von 35% des entsprechenden PEG-Fällungsreagenz erhöht (siehe Abbildung 2.1).

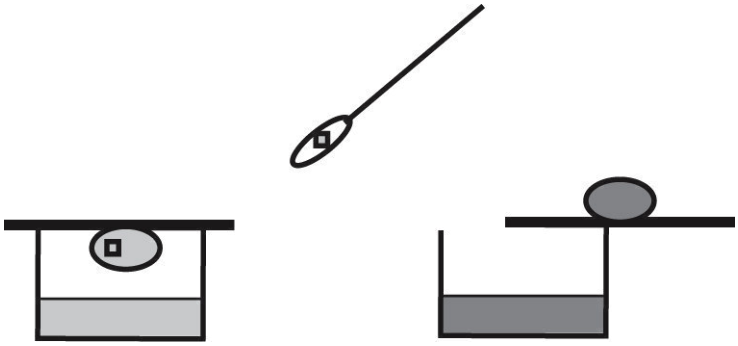


**Abbildung 2.1: Dehydration von Proteinkristallen.**
Darstellung des ersten Schrittes, eines Erntevorgang von Proteinkristallen mit einer n% Konzentration des entsprechenden PEG-Fällungsreagenz und der Transfer zu der Bedingung mit n + 5% des entsprechenden PEG-Fällungsreagenz.

### 2.4.3 Kristallographische Datensammlung der bakteriellen FAS-I

Daten wurden an den *beamlines* ID14-1 (CaFAS); ID14-4 (CeFAS $A_1$ und $A_2$); ID 23-1 (CaFAS) und ID 29-1 (MtFAS) an der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Frankreich) gesammelt. Vor der Tieftemperatur-Messung der Proteinkristalle wurde das Deckgläschen geöffnet und die 3D-Kristalle konnten mit Hilfe einer Nylonschlaufe von Hampton Research (USA) geerntet werden. Vor dem Frieren in flüssigem Stickstoff wurden die Proteinkristalle in Tieftemperatur-Puffer, der 20% Ethylenglykol enthielt, eingetaucht und nach ca. 20 s direkt in das Kältemedium gegeben. Die Kristalle wurden anschließend in einem Dry-Shipper von Taylor-Wharton (USA) gelagert.

Die Proteinkristalle der bakteriellen FAS-I wurden mit der Tieftemperatur-Methode bei 100 K in einer Nylonschlaufe mit einem rotierenden Goniometer nach der Oszillationsmethode gemessen. Hier steht der zu messende Proteinkristall senkrecht zum einfallenden Röntgenstrahl. Bei der Datensammlung wurden die Kristalle pro Oszillationsaufnahme entsprechend so gedreht, dass es zu keiner Überlappung der Reflexe kam. Entsprechend der Raumgruppe des Proteinkristalls wurden genügend Aufnahmen der Reflexdaten für einen vollständigen Datensatz gesammelt. Je nach Intensität der *beamline* und der Qualität des Kristalles wurde mit unterschiedlicher Transmission und Zeit bestrahlt. Die Qualität des Proteinkristalls wurde vorab mit vier Aufnahmen überprüft und diese mit dem Programm EDNA (Incardona, *et.* al 2009) ausgewertet und eine Messstrategie berechnet. Die Messstrategie beinhaltete die

einzelnen Drehwinkel je Messung und den Abstand zum Detektor (Dauter, 1999; Dauter, 2010).

### 2.4.4 Datenprozessierung

Die Diffraktionsbilder wurden mit dem Programm iMosflm (Battye *et al.*, 2011) integriert und so Zellparameter, wie Zellkonstanten und die Mosaizität bestimmt. Skaliert wurden die erhaltenen Daten mit dem Programm Aimless (Blessing *et al.*, 1995) aus dem CCP4i-Paket.

### 2.4.5 Strukturlösung der CeFAS mittels Molekularem Ersatz und anschließende Strukturverfeinerung

Das Phasenproblem wurde durch *molecular replacement* (MR) mit dem angepassten PDB-Modell der MsFAS (pdb: 3zen) (Boehringer *et al.*, 2013) und dem Programm Molrep (Vagin & Teplyakov, 1997) gelöst. Hierzu mussten die Seitenketten der Aminosäurereste gekappt werden. Die Strukturlösung durch molekularen Ersatz wurde mit dem Programm Phaser (McCoy *et al.*, 2007) überprüft. Die Sequenzen des Suchmodells der MsFAS und die Zielsequenz der CeFAS wurde mit dem Programm Clustal Omega (Sievers & Higgins, 2014) angeglichen und mit dem Programm Sculptor (Bunkóczi & Read, 2011) schrittweise mutiert. Das Modell mit den initialen Strukturkoordinaten wurde für weitere Verfeinerungen mit Refmac5 (Murshudov *et al.*, 2011) verwendet. Nach 20 Zyklen der *rigid-body*-Verfeinerung mit Refmac5 wurde das Modell schrittweise, durch das Entfernen von Aminosäureresten, in 50 weiteren Zyklen mit Refmac5 und TLS optimiert. Das Modell wurde manuell in Coot (Emsley & Cowtan, 2004) ausgewertet und umgebaut.

## 2.5 Elektronenmikroskopie

### 2.5.1 *Negative-stain* Elektronenmikroskopie

Für die *negative-stain*-EM Aufnahmen wurden 4 µl einer 1 µM CaFAS sowie der TriS-CaFAS Lösung auf ein Kupfer-Grid AGAR (UK), welches zuvor 1 min ausgeglüht wurde, pipettiert.

Das Grid wurde im Anschluss einmal mit Puffer C und zweimal mit Wasser gewaschen, bevor es dreimal mit je 4 µl einer 2% Uranylacetatlösung gefärbt wurde. Überschüssige Färbelösung wurde in Zellstoff aufgenommen und das Grid getrocknet. Das EM-Grid mit der Proteinprobe war nun bereit für die Lagerung oder die Bestückung des Elektronenmikroskops.

### 2.5.2 Elektronmikroskopische Visualisierung des Kristallkeimbildung und Cryo-EM Tomographie

Die CaFAS wurde mit einer Konzentration von 5 mg/ml bei 4°C mit der Dampfdiffusionstechnik mit hängendem Tropfen kristallisiert (2.4.1). Die Kristallisationsbedingungen der CaFAS waren Bedingung 1 (0,1 M MIB-Puffer (pH 7,0); 25% PEG 1500 (PACT, Qiagen (D))) und für die Cryo-EM Tomographie (CET) Bedingung 2 (0,2 M NaMalonat; 0,1 M Bis-Tris-Propan (pH 7,2); 20% PEG 6000; 3% PGA-LM (Molecular Dimersion (UK))).

Für die Überprüfung der Kristallisation wurden das Kristallisationsreservoir nach zwei Tagen geöffnet (siehe Abbildung 2.2) und die Kristallisationstropfen auf ein vorbereitetes EM-Grid pipettiert. Das Carbon Grid, Quantifoile (UK) wurde mit der glow-discharge Methode vorbereitet und 3 µl des Kristallisationstropfens auf den Grid pipettiert. Die überschüssige Flüssigkeit wurde mit Zellstoff aufgenommen und anschließend wurde das Grid für ca. 3-5 s in flüssigem Ethan bei 77 K gefroren. Das Grid war nun bereit für die Lagerung in flüssigem Ethan oder zum Einbringen in das Elektronenmikroskop.

Aufgenommen wurden 2D-Aufnahmen mit einer 4096 x 4096 slow-scan CCD-Kamera mit *underfocus* $\Delta z = 3$ µm, einer Vergrößerung von 38 k (Pixelgröße 2.78 A/p) und einer Elektronendosis von 20 e-/ $Å^2$ aufgenommen.

Die Achse bei der Cryo-EM Tomographie (CET) für die 3D-Rekonstruktion des FAS-Partikel wurde mit *single-axis-tilt*-Serien aufgenommen. Das EM war bei den Aufnahmen zwischen - 60° und + 60° mit einzelnen Inkrementen von 2° direkt mit der Detektorkamera verbunden und eine Dosis von 50 $e^-/Å^2$ wurde während der gesamten Zeit nicht überschritten. Die Pixelgröße betrug bei den 2D-Messungen für die 3D-Rekonstruktion betrug 0,342 nm. Die Pixelgröße wurde bei der Rekonstruktion 8-fach verringert auf 2,73 nm/p. Jedes Tomogramm wurde aus 61 Aufnahmen eines Sichtfeldes zusammengesetz. Die Rekonstruktion erfolgte unter Verwendung des TOM-Software-Paktes (Nickell *et al.*, 2005).

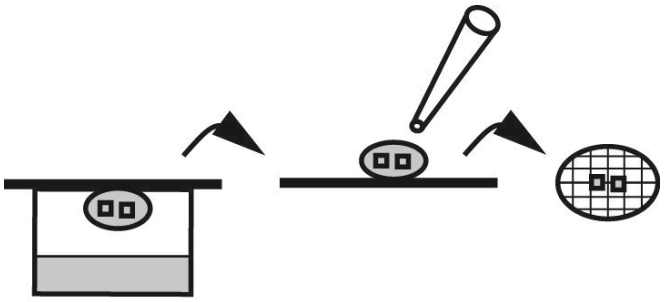


**Abbildung 2.2: Arbeitsfluss der Gridpräparation für die Kristall-EM.** Darstellung des Arbeitsflusses zur Visualisierung des Mikrokristallwachstums. Das Deckgläschen mit dem Kristallisationstropfen wurde geöffnet und die Mikrokristalle wurden auf ein vorbereitetes Grid pipettiert. Der Vorgang des Ansetzens von Proteinkristallen wird hier nicht gezeigt, dieser ist unter 2.4.1 beschrieben.

# 3. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war primär die strukturelle Untersuchung der bakteriellen FAS - I. Dieses Ziel wurde mit *negative-stain*-EM, Cryo-EM, Cryo-EM Tomographie und Röntgenkristallographie verfolgt. Untersucht wurden die Wildtyp-Proteine CaFAS, CeFAS und MtFAS, sowie die beiden Fusionkonstrukte der CaFAS mit N-terminalen Trimerisierungsdomänen aus *S. cerevisiae* und *T. lanuginosis* (TriS-CaFAS und TriT-CaFAS).

## 3.1 Proteinherstellung und Charakterisierung

### 3.1.1 Proteinherstellung und Präparation

Es wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass eine rekombinante Herstellung und posttranslationale Modifizierung der CaFAS in *E. coli* möglich ist (Stuible *et al.*, 1997-A, Stuible *et al.*, 1997-B). In Anlehnung daran wurden in dieser Arbeit verschiedene bakterielle FAS-I über rekombinante Verfahren zugänglich gemacht. Im Allgemeinen wurde zur Reinigung der bakteriellen FAS-I folgendermaßen vorgegangen: Die bakterielle FAS-I wurde auf einen pET22b-Vektor kloniert. Zur posttranslationalen Modifikation der ACP-Domäne wurde die bakterielle FAS-I mit entsprechendem AcpS, kloniert in einen pET-coco-I-Vektor, in *E. coli* BL21-Zellen co-exprimiert. Das jeweilige Zielprotein wird in einem Zwei-Schritt Verfahren über Affinitätschromatographie (Strep-Tactin-Säule) (Schmidt & Skerra, 2007) und Größenaussschlusschromatographie (*Size-Exclusion-Chromatography;* SEC) gereinigt (siehe Abbildung 3.1.A und 3.1.D). In diesem Reinigungsprotokoll dient die abschließende SEC einem Pufferwechsel und der Separation von unterschiedlich oligomerisierten Zuständen (siehe Abbildung 3.1.A und 3.1.D); z. B. wurden bei MtFAS Dimer- und Hexamer-Fraktionen, von aggregiertem Protein getrennt. Die Pufferbedingungen der CaFAS (Puffer C) und CeFAS (Puffer B) konnten in dieser Arbeit soweit optimiert werden, dass diese Proteine frei von Aggregaten waren. Für MtFAS konnte diese Qualität der Präparation nicht erreicht werden. Das Chromatogramm der MtFAS zeigte trotz

Optimierung weiterhin Aggregate sowie Dimer- und Hexamer-Konformationen des Proteins (siehe Abbildung 3.1.D).

Nach der SEC wurden die vereinten hexameren Fraktionen auf die gewünschte Konzentration eingestellt (siehe Abbildung 3.1.C). Die Absorptionsspektren der Wildtyp FAS-I Systeme zeigen jeweils die Bindung von FMN an ER (siehe Abbildung 3.1.B).

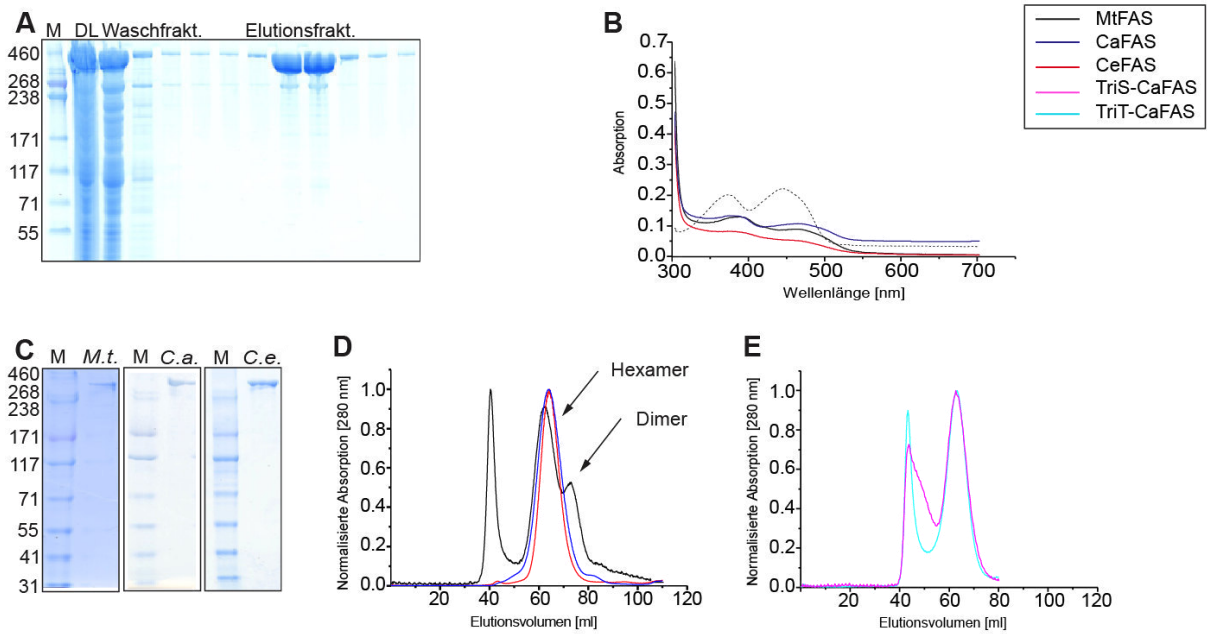



**Abbildung 3.1: Präparation der bakteriellen FAS-I.**
(A) SDS-PAGE der CeFAS Affinitätschromatographie; M HiMark™ Proteinmarker (Life Technologies), DL (Durchlauffraktion), fünf Waschfraktionen und sechs Elutionsfraktionen. (B) Absorptionsspektren der bakteriellen FAS-I im Bereich 300 – 700 nm. Gezeigt sind CaFAS (blau), CeFAS (rot) und MtFAS. Die gepunktete Linie zeigt die FMN-Referenz. (C) SDS-PAGE der drei Wildtyp-FAS-I-Systeme nach der SEC MtFAS (*M.t.*), CaFAS (*C.a.*), CeFAS (*C.e.*) als Proteinmarker dient HiMark™ (Life Technologies). (D) SEC der bakteriellen FAS-I. Überlagerung aller drei Wildtyp-FAS-I-Systeme CaFAS (blau), CeFAS (rot) und MtFAS (schwarz) zeigen kleinere Verschiebungen in den Elutionsprofilen der einzelnen Proteine, die sich durch die Verwendung unterschiedlicher Puffer erklären lassen. MtFAS zeigt einen Hexamer und Dimer Peak. (E) SEC der zwei Fusionskonstrukte TriS-CaFAS (magenta) und TriT-CaFAS (türkis).

### 3.1.2 Instabilität der MtFAS Oligomere

Die beiden oligomeren Zustände der MtFAS, das Dimer und Hexamer, sind bereits in der Literatur bekannt (Kikuchi *et al.*, 1992; Ciccarelli *et al.*, 2013; Enderle *et al.*, 2015). Zur Überprüfung der Stabilität beider Zustände (Dimer und Hexamer), wurde eine präparative SEC (Superose 6, XK 16/70; GE (USA)) (siehe Abbildung 3.1.D schwarz) fraktioniert um beide Zustände separat untersuchen zu können. Fraktionen des Dimer und Hexamer Peaks aus der präparativen SEC wurden jeweils vereint und auf eine Konzentration von 5 mg/ml eingestellt. SEC zur

Überprüfung der Stabilität erfolgte im analytischen Maßstab (Superose 6, 10/300; GE (USA)). Nach einer Stunde wurden 500 µl des Dimer-Peaks auf die Säule aufgetragen und chromatographisch aufgetrennt. Im Anschluss an diesen Lauf wurde die gleiche Menge des Hexamers auf die Säule aufgetragen und ein weiterer Lauf gestartet. Zwei weitere Proben des Dimers Hexamers mit jeweils gleicher Konzentration sowie Volumina wurden über Nacht bei 4°C im Dunkeln gelagert. Entsprechend des Zustandes (Dimer oder Hexamer) erfolgte 24 h später die Wiederholung der SEC-Läufe bei gleichen Bedingungen. Zu erkennen ist, dass die beiden Zustände nicht exakt aufgetrennt vorliegen, sondern das eine Dynamik herrscht zwischen Dimer und Hexamer. Allerdings ist beim Betrachten des jeweils zweiten Chromatogrammes zu erkennen, dass es zu einer Dissassemblierung des höher oligomerisierten Zustandes kommt (siehe Abbildung 3.2). Bei beiden Läufen vergrößert sich die Fläche des Peaks im Dimer-Zustandes innerhalb von 24 h.

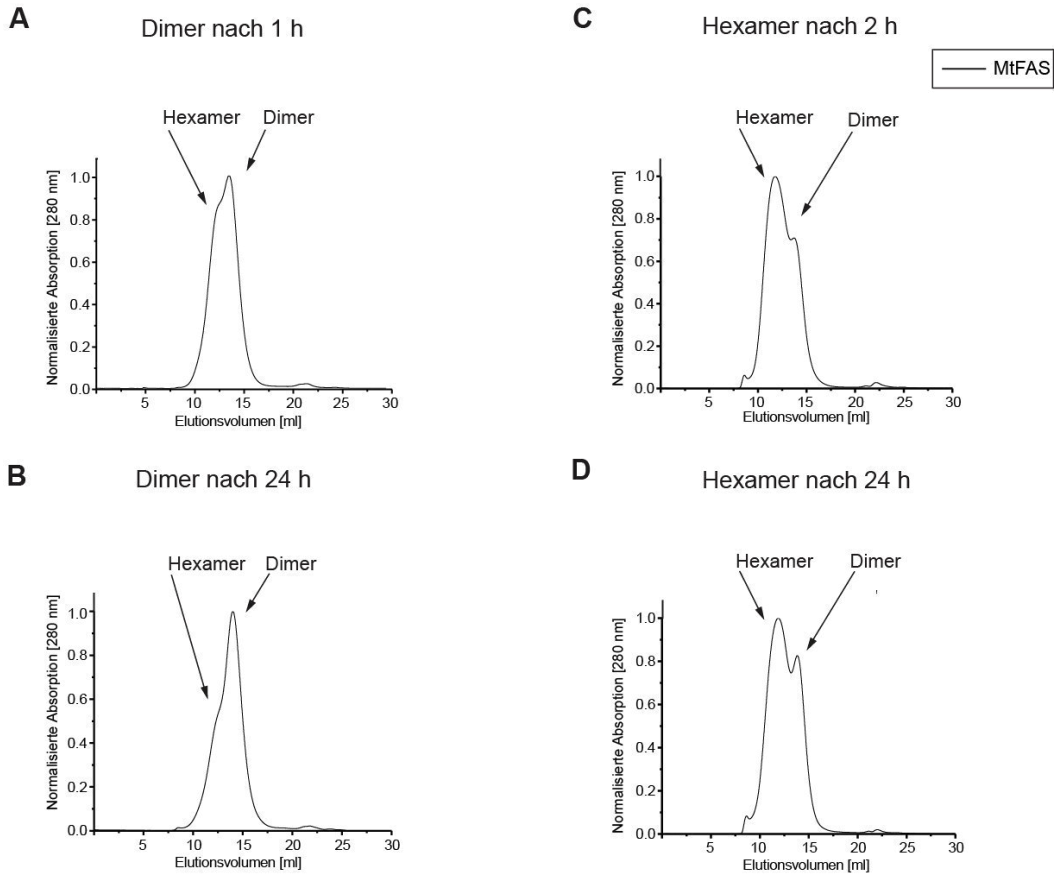



**Abbildung 3.2: Instabilität der MtFAS.**

Gezeigt sind analytische SEC-Läufe von Dimer und Hexamer Fraktionen der MtFAS. (A) Chromatogramm einer Dimer-Fraktion, 1 h nach der präparativen SEC. (B) Chromatogramm einer weiteren Dimer-Fraktion nach 24 h. (C) Chromatogramm einer Hexamer-Fraktion, 2 h nach der präparativen SEC. (D) Chromatogramm einer weiteren Hexamer-Fraktion nach 24 h. Deutlich zu erkennen ist, dass die einzelnen Fraktionen, nach der präparativen SEC, nicht klar zu trennen sind. Bei den Chromatogrammen nach 24 h ist zu erkennen, dass durch die Standzeit des Proteins bei 4°C, eine Verschiebung in Richtung Dimer stattgefunden hat. Alle Chromatogramme wurden jeweils auf den höchsten Peak normiert.

### 3.1.3 Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)

Eine AUZ wurde durchgeführt um die Molekulargewichte der oligomeren Spezies aus den SEC-Läufen zu identifizieren. Dieser Schritt war notwendig, da die Molekulargewichte der bakteriellen FAS-I Komplexe größer sind als die *High-Molcular-Weight*-(HMW)-Kalibrierproteine (GE, USA) und die verfügbaren Gelfiltrationssäulen für die Proteinchromatographie (Superose 6 GE, USA) bei den erwarteten hohen Molekulargewichten eine schlechte Trenneffizienz aufweisen. Die durch AUZ gewonnene Information über die jeweiligen Oligomerisierungs-Spezies sollen den Fraktionen der SEC zugeordnet werden. Als Referenz wurde zusätzlich ScFAS verwendet (siehe Abbildung 3.3, grün), da dieses Protein zuvor bereits in unserem Labor charakterisiert wurde (Johansson *et al.*, 2008). Spezielles Augenmerk galt hierbei der Identifikation der hexameren Zustände der bakteriellen FAS-I. Wie die AUZ-Daten zeigen, gibt es sowohl bei der CaFAS (blau) als auch bei der MtFAS (schwarz) zwei mögliche Zustände (siehe Abbildung 3.3). Die CaFAS liegt als Monomer und Hexamer, die MtFAS als Monomer und Dimer vor.

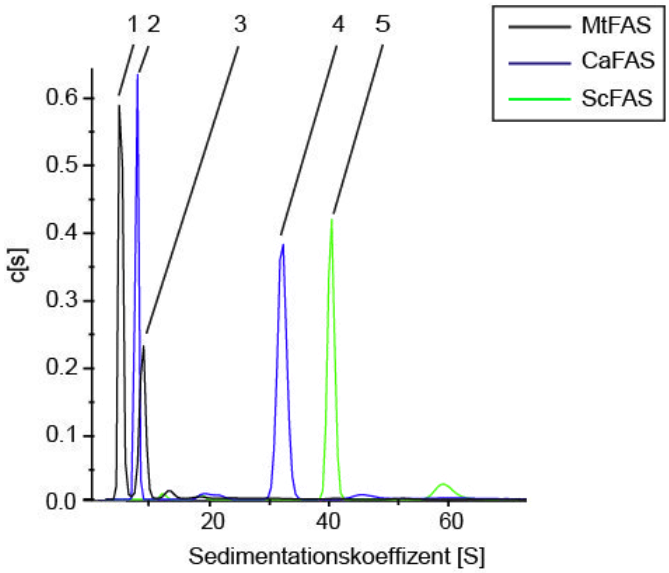



**Abbildung 3.3: AUZ von ScFAS, CaFAS und MtFAS.**
Das Protein wurde bei 12000 rpm zentrifugiert und die Absorption des Proteins bei 280 nm gemessen.
Peak 1: (MtFAS, ermittelte Masse 353 kDa, berechnete Masse aus Aminosäure Sequenz 320 kDa (Monomer)), Peak 2: (CaFAS, 278 kDa, 320 kDa (Monomer)), Peak 3: (MtFAS, 770 kDa, 640 kDa (Dimer)) Peak 4: (CaFAS, 2200 kDa, 1900 kDa (Hexamer)), Peak 5: (ScFAS 2040 kDa, 2600 kDa (Heterododekamer). Daten der AUZ wurden aufgenommen mit Dr. Stefan Uebel in der Core Facility des MPI für Biochemie.

### 3.1.4 Circulardichroismus-Spektroskopie und Thermofluor

Circulardichroismus-Schmelzkurven

Durch AUZ konnte der hexamere Zustand der CaFAS bestätigt werden. Optimierte Pufferbedingungen zeigten sowohl für CaFAS, als auch für MtFAS und CeFAS hexamere Assemblierungen. Die Circulardichroismus (CD) -Spektroskopie wurde zur Untersuchung der Proteinstabilität für selektierte Pufferbedingungen durchgeführt. Des Weiteren diente die CD-Spektroskopie als Referenzmethode zur Messung von thermischen Schmelzkurven nach der „Thermofluor"-Methode.

In der CD-Spektroskopie wird bei einer spezifischen Wellenlänge die Denaturierung bzw. die Entfaltung der Polypeptidkette (Verlust der Sekundärstrukturelemente) im Verlauf eines Temperaturgradienten aufgenommen. Der Wendepunkt des sigmoidalen Kurvenverlaufs gilt als Schmelzpunkt des Proteins. Die Proteine CaFAS, CeFAS, MtFAS (siehe Abbildung 3.4.A) und die Fusionskonstrukte TriS-CaFAS und TriT-CaFAS (siehe Abbildung 3.4.B) wurden unter gleichen Bedingungen vermessen. Für den Kurvenverlauf der Wildtyp Proteine wurde ein nahezu identischer Verlauf der Entfaltungskurven beobachtet, wobei die CeFAS die höchste (47,3°C) und die CaFAS (44,6°C) die niedrigste Schmelztemperatur aufweist. Mit einem Schmelzpunkt von (45,4°C) weicht die MtFAS in ihrem Verlauf von der CaFAS und CeFAS leicht ab. Dieser Abweichung kann keine Proteineigenschaft zugewiesen werden. Die Fusionskonstrukte TriT-CaFAS (38,6°C) und TriS-CaFAS (38,7°C) schmelzen deutlich früher. In ihren Denaturierungseigenschaften weisen sie eine geringere Kooperativität, ähnlich der MtFAS, auf (siehe Abbildung 3.4.B).

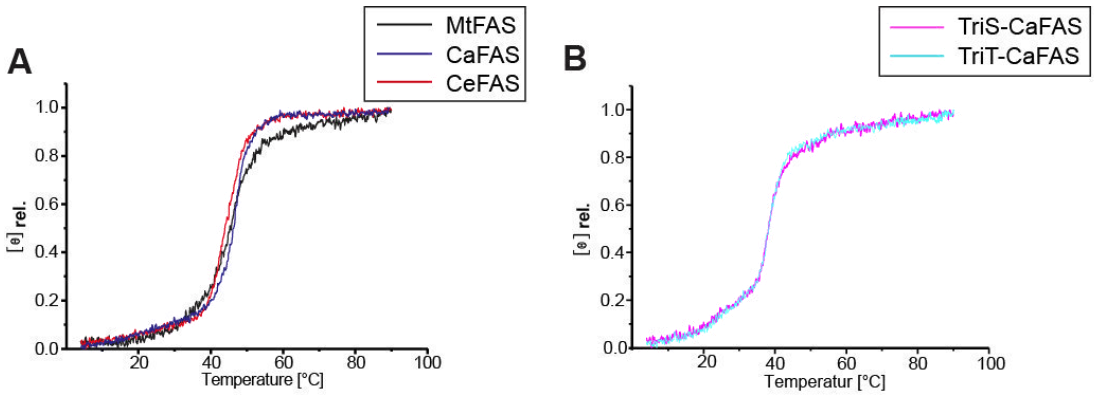



**Abbildung 3.4: Schmelzkurven der Wildtyp-FAS-I und der Fusionskonstrukte.**
(A) Gezeigt sind Schmelzkurven der bakteriellen FAS-I aus CaFAS, CeFAS und MtFAS, sowie (B) der Fusionskonstrukte TriS-CaFAS und TriT-CaFAS aufgenommen durch CD-Spektroskopie. Die Schmelzkurven wurden bei einer Wellenlänge von 222 nm (J-715, Jasco, J) verfolgt. Alle Proteine wurden in Puffer S mit 0,2 mg/ml gelöst und in einem Temperaturbereich von 4°C bis 90°C mit einer Temperaturgradienten von 1°C/min gemessen.

Thermofluor-Methode

Die „Thermofluor“-Methode eignet sich zum schnellen Screening thermischer Stabilitäten von Proteinen und wird zur Optimierung von Proteinreinigungsprotokollen und Kristallisationen eingesetzt (Ericsson *et al.*, 2006; Reinhard *et al.*, 2013). Die verschiedenen bakteriellen FAS-I-Systeme wurden mit einem Mehrbereichspufferscreen über einen Bereich von pH 4,5-9,0 in organischen und anorganischen Puffersystemen getestet (siehe Tabelle 2.3). Die Fusionskonstrukte wurden aufgrund der niedrigen Schmelzpunkte nicht getestet. Bei den untersuchten drei Wildtyp-FAS-I Komplexen liegt das pH-Optimum im physiologischen Bereich (siehe Abbildung 3.5). Interessanterweise erreichten alle drei Proteine die höchste Schmelztemperatur bei Pufferbedingung 13 ($K_i$-Phosphat, pH 7,0).

Zudem zeigen CeFAS und MtFAS eine sehr stabile und homogene Verteilung der Schmelztemperaturen über den gesamten pH-Bereich. Die CaFAS scheint bei sauren Bedingungen thermisch besonders instabil zu sein, jedoch weist sie bei höheren pH-Werten sogar höhere Schmelztemperaturen als CeFAS auf. Der Vergleich mit der CD-Spektroskopie zeigt, dass die Schmelzpunkte der beiden Methoden ähnlich sind (vgl. Abbildung 3.4.A). Die Pufferbedingung 16 der Thermofluor-Methode ist sehr ähnlich zur Puffer S Bedingung der Schmelzkurven und zeigen so einen ΔT für die Konstrukte von (MtFAS ΔT= 2,1°C; CaFAS ΔT= 1,6°C; CeFAS ΔT= 4,3°C). Dies zeichnet die Thermofluor-Methode daher als aussagekräftige Methode zum Screening von bakteriellen FAS-I Konstrukten und Pufferbedingungen aus.

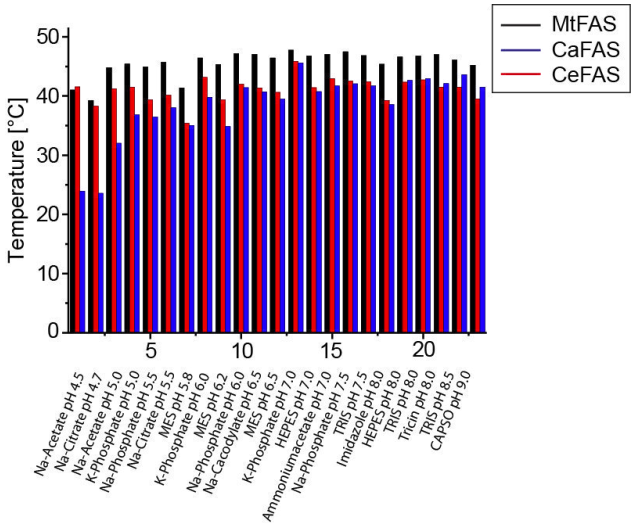



**Abbildung 3.5: Thermische Stabilitäten der Proteine CaFAS, CeFAS und MtFAS nach der Thermofluor-Methode.**
Gezeigt wird die Proteindenaturierung über einen breiten pH-Bereich unter der Verwendung verschiedener organischer und anorganischer Puffersysteme.

### 3.1.5 Aktivitätsassay und Produktspektrumsanalyse der CaFAS und CeFAS

Aktivitätsassay

Der Assay der enzymatischen Aktivität diente der Qualitätskontrolle der Proteinpräparationen. Die bakterielle FAS-I ist nur dann aktiv, wenn das Protein in korrekter Faltung, assembliert zum hexameren Zustand und posttranslational modifiziert vorliegt. Um die posttranslationale Modifizierung der FAS-I zu gewährleisten, wurde diese mit dem korrespondierenden AcpS co-exprimiert. Während enzymatische Aktivitäten für CaFAS und CeFAS (siehe Abbildung 3.6) nachgewiesen wurde, konnte MtFAS nicht in aktiver Form hergestellt werden. Neben des Einsatzes von *M. tuberculosis* AcpS, brachten auch Co-Expressionen mit *C. ammoniagenes* AcpS und *C. efficiens* AcpS sowie die Herstellung von MtFAS und *M. tuberculosis* AcpS zusammen auf einen Vektor (pETduet-I) keinen Erfolg. Die Berechnung der spezifischen Aktivität für die Biosynthese der FS ist bezogen auf den Einbau von 1 µMol MaCoA pro Minute. Für die bakterielle FAS-I sind folgende Aktivitäten in der Literatur bekannt: CaFAS aus nativer Präparation (FAS-I) mit spezifischer Aktivität von 310 mU/mg (bezogen auf die Umsetzung von MaCoA) und CaFAS aus rekombinater Expression (*E. coli*) mit spezifischer Aktivität von 370 mU/mg (Stuible *et al.*, 1997-A).

Aktivitätsassay der CeFAS (siehe Abbildung 3.6) zeigten deutlich das Vorliegen von aktivem Enzym (CaFAS wird nicht gezeigt). Die gemessenen spezifischen Aktivitäten der CaFAS mit einem Mittelwert (MW) von 261,6 mU/mg und einer Standardabweichung (SD) ± 37,5 (CaFAS (mU/mg): 211,6; 247,0; 314,4; 273,4)) und der CeFAS mit einem MW von 270,1 mU/mg und einer SD von ± 55,5 (CeFAS mU/mg: 349,9; 266,0; 232,3; 232,2) lagen im Bereich der literaturbekannten Werte.

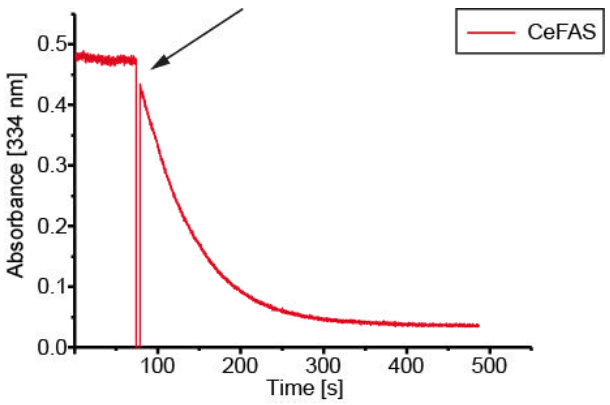



**Abbildung 3.6: Aktivitätsassay der CeFAS.** Die Aktivität der CeFAS wird bei einer Wellenlänge von 334 nm, dem langwelligen Absorptionsmaximum des Co-Enzyms NADPH, gemessen. Die Probenlösung besteht aus der bakteriellen FAS-I, AcCoA, NADPH. Nach dem Start der Messung erfolgt nach einer Minute die Zugabe des Elongationssubstrats MaCoA (Öffnen der Küvettenmesszelle des Spektrometers führt zu starkem Abfall der Absorption, siehe Pfeil). Mit der Zugabe von MaCoA beginnt die Biosynthese der Fettsäuren und es kommt zu einem Abfallen der Absorption durch den Verbrauch des Co-Enzyms NADPH (Lynen, 1969).

Produktspektrumanalyse

Produktspektren der bakteriellen FAS-I wurden aufgenommen, um in einem weiteren Aspekt die Qualität der rekombinant hergestellten Proteine zu beurteilen. Für CaFAS und MtFAS sind Daten zu den Fettsäuren, produziert von Proteinen aus nativen Präparationen, veröffentlicht. Für CaFAS wurde ein Gemisch aus $C_{16}$- und $C_{18}$-FS-CoA-Ester als Produkte gezeigt (Stuible *et al.*, 1997-A). Hingegen wurde für MtFAS ein duales Produktspektrum aus $C_{16}$- und $C_{26}$-FS-CoA-Ester nachgewiesen (Kikuchi *et al.*, 1992). Für CeFAS liegen keine Daten vor. Für einen Ansatz wurden FAS-I, Ac-CoA, Ma-CoA, NADPH in Puffer AB bei RT für 16 h inkubiert. Als interner Standard wurde $C_{17}$-CoA unmittelbar vor der Aufarbeitung zugefügt. Als Produkte der rekombinant hergestellten CaFAS wurden 17,4 µM ± 0,5 µM $C_{16}$-FS-CoA und 40,2 µM ± 1,0 $C_{18}$-FS-CoA bestimmt (siehe Abbildung 3.7). Dies entspricht einer Verteilung von 30,0% ± 0,8% $C_{16}$-FS-CoA und 69,2% ± 1,7% $C_{18}$-FS-CoA. In den Messungen mit rekombinanter CeFAS wurden 30,2 µM ± 4,4 µM $C_{16}$-FS-CoA und 4,8 µM ± 1,3 µM $C_{18}$-FS-CoA bestimmt. Diese Werte entsprechen einer Verteilung von 86,4% ±12,5% $C_{16}$-FS-CoA und 13,6% ± 3,8% $C_{18}$-FS-CoA. Für MtFAS konnte aufgrund der fehlenden Aktivität kein Produktspektrum bestimmt werden.

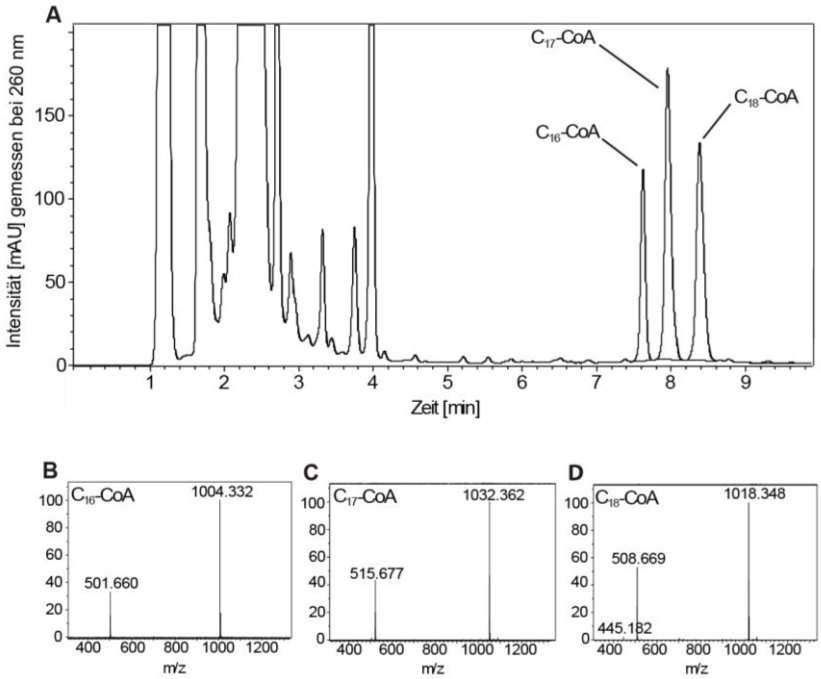



**Abbildung 3.7: Produktspektrum der CaFAS.**
Natürliche FS-Kettenlängenverteilung der bakteriellen FAS-I am Beispiel der CaFAS. (A) Der HPLC-Lauf der FS-CoA-Ester (Absorption bei 260 nm) zeigt die gemessenen Produkte der CaFAS mit den entsprechenden (B-D) MS-Spektren, die zur eindeutigen Identifikation der CoA-Derivate verwendet wurden. $C_{17}$-CoA dient als interner Standard. Die CaFAS Produkte $C_{16}$-CoA und $C_{18}$-CoA werden in nahezu identischen Mengen produziert. Messung und Auswertung der Daten wurden mit Jan Gajewski (AG Grininger) am BMLS der Universität Frankfurt durchgeführt.

### 3.1.6 *Negative-stain* EM der CaFAS, TriS-CaFAS und MtFAS

Die *negative-stain*-EM diente ebenfalls zur Qualitätsüberprüfung der Proteine. Der Vorteil der *negative-stain*-EM ist die Darstellung von Einzelmolekülen, wodurch die Verteilung von Struktureigenschaften, wie Faltung, Assemblierung und Aggregation, dargestellt werden kann. Aufgrund der Größe und der klar erkennbaren Symmetrie eignet sich die bakterielle FAS-I besonders gut für diese Methode. Es wurden drei Proteine im *negative-stain*-EM betrachtet. Es wurde mit Uranylacetat gefärbt. Die Arbeiten an der MtFAS wurden in Zusammenarbeit mit der Abteilung Strukturbiologie (MPI für Biophysik, Prof. Kühlbrandt) durchgeführt. CaFAS und das Fusionskonstrukt TriS-CaFAS wurden mit Unterstützung von Dr. Christian Benda von der Abteilung zelluläre Strukturbiologie (MPI für Biochemie, Prof. Conti) durchgeführt. Von der CeFAS und dem Fusionkonstrukt TriTl-CaFAS wurden keine Aufnahmen angefertigt.

Negative-stain-EM der CaFAS

In Untersuchungen der CaFAS lässt sich die charakteristische Architektur der FAS gut erkennen (siehe Abbildung 3.8.A). Die dargestellten Partikel liegen überwiegend in zwei unterschiedlichen Orientierungen vor (Exemplarisch dargestellt ist eine Ansicht von oben (Draufsicht Perspektive, siehe Abbildung 3.8.B1) und eine Ansicht von der Seite (Seitenansicht Perspektive, siehe Abbildung 3.8.B2). In letzterem Bild ist das zentrale-Rad, das die beiden Reaktionskammern trennt, gut zu erkennen. Die homogene Größenverteilung auf dem EM-Grid deutet auf eine hohe Proteinqualität hin.

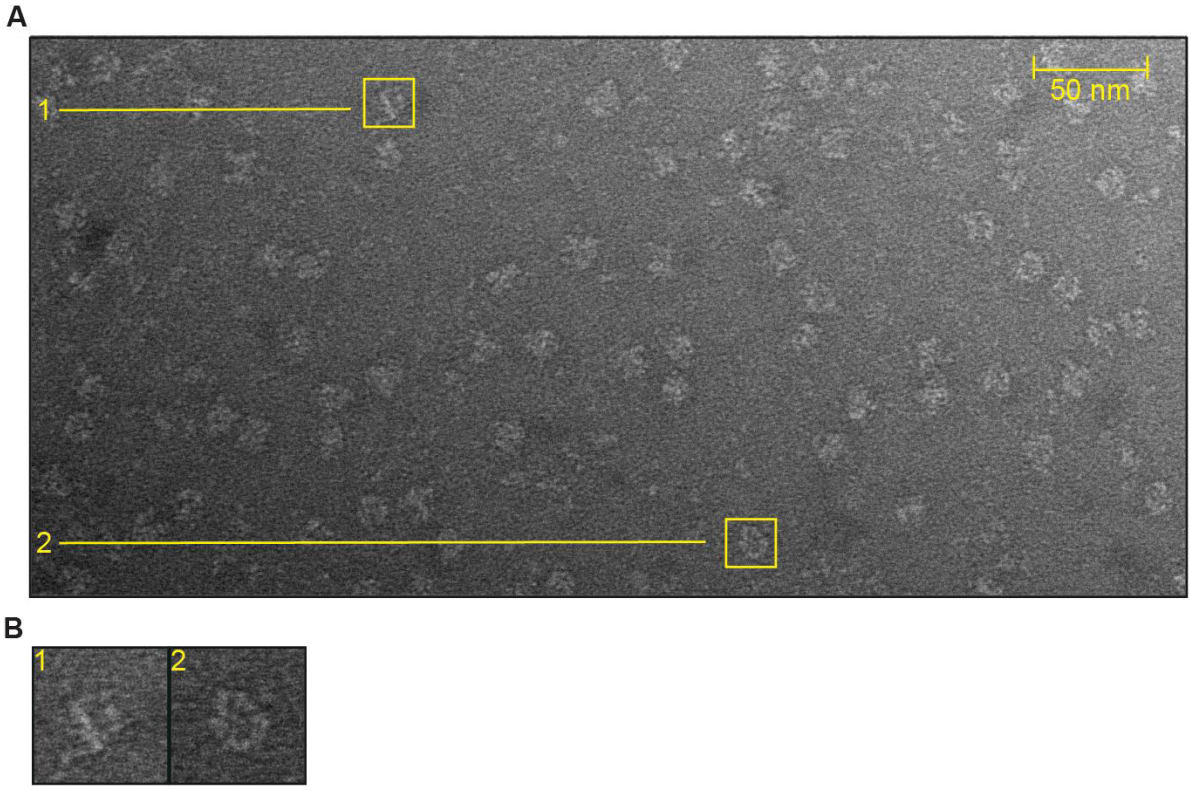



**Abbildung 3.8.: *Negative-stain*-EM Aufnahme der CaFAS**.
(A) *Negative-stain*-EM Aufnahme der CaFAS mit zwei hervorgehobenen Partikeln (1 und 2). (B) Bei einer Vergrößerung ist das Partikel in B1 in der Seitenansicht und B2 in Draufsicht zu erkennen. Als Färbereagenz diente Uranylacetat. Die *negative-stain*-EM Aufnahmen der CaFAS und der TriS-CaFAS wurden zusammen mit Dr. Christian Benda am MPI für Biochemie angefertigt.

N*egative-stain*-EM Aufnahmen von Partikeln vergleichbarer Orientierung (siehe Abbildung 3.8.A) wurden mit dem Programm EMAN2 analysiert. In Abbildung 3.9.A und 3.9.C sieht man CaFAS in Seitenansichten mit stark hervorgehobenem zentralen-Rad der CaFAS. Die Abbildung 3.8.B zeigt die FAS in Draufsicht. Deutlich erkennbar sind drei Bereiche mit stärkerem Kontrast zur Umgebung und zur Reaktionskammer. Dies deutet die dreizählige Symmetrie der bakteriellen FAS-I an.

Durch das Fehlen der TM und die damit verbundenen offenen Kappen der Reaktionskammern ist auch das zentrale-Rad des Komplexes in der Aufsicht zu erkennen. Durch die unterschiedlichen Orientierungen der Partikel auf dem EM-Grid ergeben sich durch die Überlagerung unterschiedliche Anlignments des Enzyms. Die Anzahl der verwendeten Partikel pro Bild sind der Bildunterschrift der Abbildung 3.9 zu entnehmen.

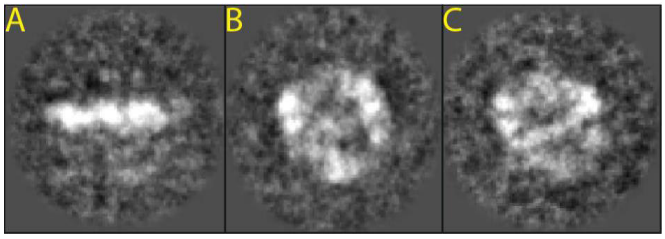



**Abbildung 3.9: Rekonstruktion der CaFAS.**
Überlagerung von Bildern des Enzyms in verschiedenen Orientierungen. CaFAS ist zu erkennen in (A) Seitenansicht, (B) Draufsicht, (C) Seitenansicht. Für die Rekonstruktion wurden für A (26 Partikel), B (38) und C (47) vom Programm ausgewählt.

Negative-stain-EM der TriS-CaFAS

Die TriS-CaFAS wurde insbesondere zur Untersuchung der eingefügten TM mittels *negative-stain*-EM vermessen. TM wurden in CaFAS eingebaut, um dadurch das Protein möglicherweise über die Ausbildung von Interaktionen an der dreizähligen Achse zu stabilisieren. Ziel war es zur Stabilisierung eine Kappe zum „Verschluss“ der Reaktionskammern einzufügen und damit an dieser Stelle die Pilz-FAS-I nachzubauen. Dieser Eingriff sollte die Kristallisierbarkeit der CaFAS durch erhöhte Rigidität verbessern, eine Strategie, welche basierend auf - EM Daten an CaFAS (siehe Abbildung 3.8) und Überlegungen aufgrund der Homologie zu Pilz-FAS-I entwickelt wurde. Die fusionierten Domänen sollten bei Trimerisierung (Ausbildung der Kappe) in *negative-stain*-EM erkennbar sein. Bei der *negative-stain*-EM Aufnahme der TriS-CaFAS in Abbildung 3.10 sieht man eine inhomogene Verteilung des Proteins auf dem EM-Grid, mit einer deutlichen Neigung zur Aggregation (siehe Abbildung 3.10.1). Es sind keine definierten Strukturen einzelner Partikel zu erkennen und dementsprechend muss davon ausgegangen werden, dass kein Stabilisierungseffekt auftritt. Die inhomogene Verteilung lässt im Gegenteil darauf schließen, dass es zu einer Destabilisierung des Komplexes kommt. Die inhomogene Verteilung der Partikel ließ außerdem keine Auswahl von Partikel zu deren Überlagerung durch das Programm EMAN2 zu.

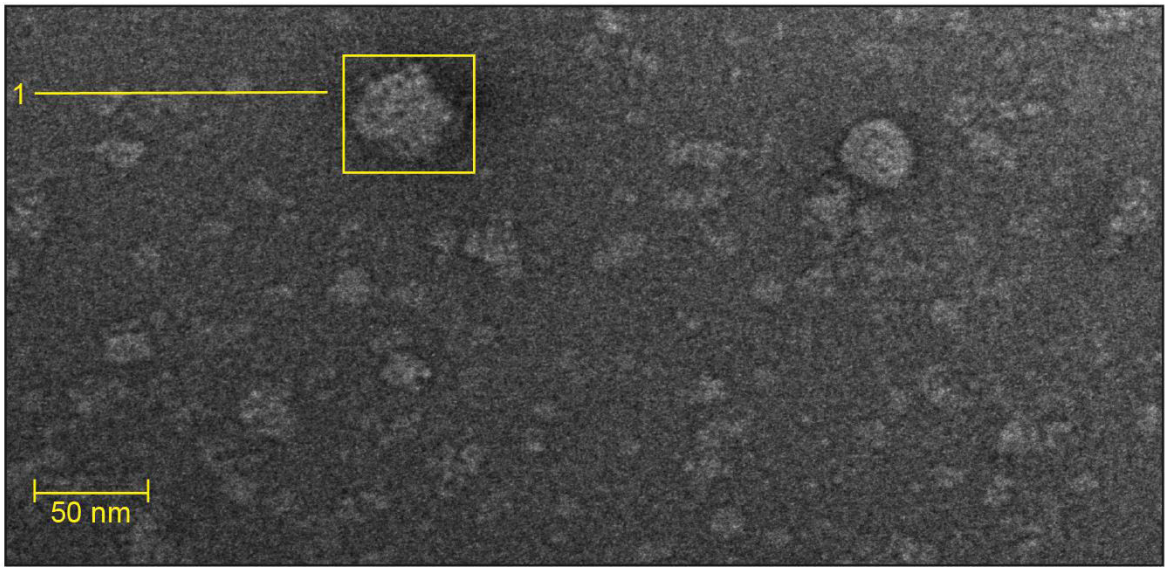



**Abbildung 3.10: *Negative-stain*-EM Aufnahme der TriS-CaFAS.**
Bei der *negative-stain*-EM Aufnahme der TriS-CaFAS ist keine homogene Verteilung, sondern eine Aggregation des Proteins zu erkennnen.

Negative-stain-EM der MtFAS

Die *negative-stain*-EM Aufnahmen der MtFAS (siehe Abbildung 3.11) erfolgt als Qualitätsüberprüfung jedes Proteinbatches vor jeder Cryo-EM Analyse der MtFAS (siehe Kapitel 3.3). Zu erkennen sind Partikel in Seitenansicht, ein Partikel ist hervorgehoben. Weiter sieht man eine homogene Verteilung von Partikeln auf dem EM-Grid.

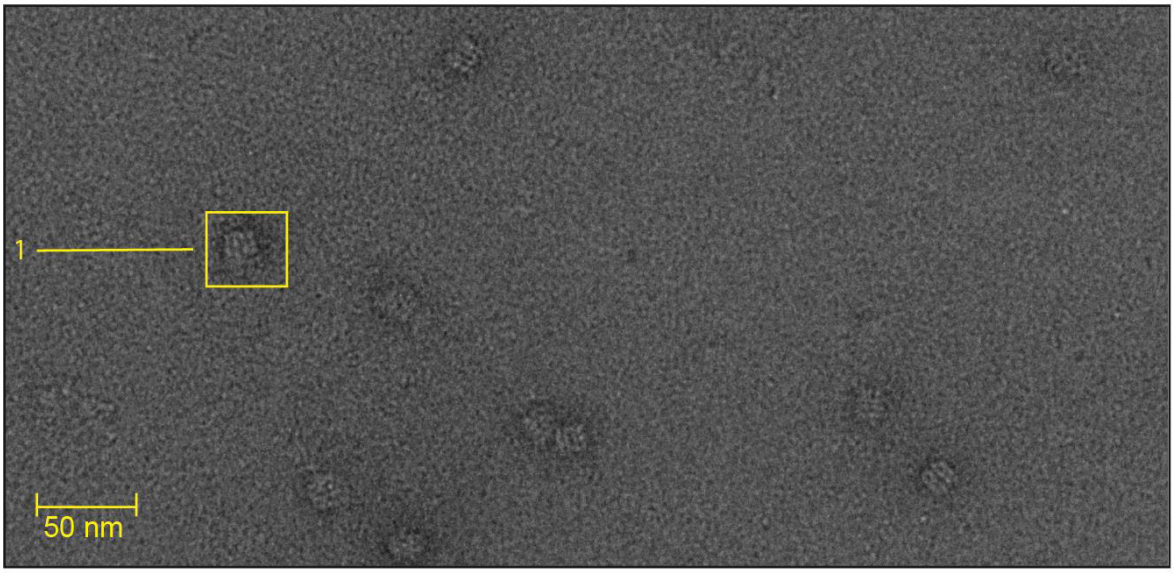



**Abbildung 3.11: *Negative-stain*-EM Aufnahme der MtFAS.**
*Negative-stain*-EM Aufnahme der MtFAS mit einem hervorgehobenen Partikel (1). Zu erkennen ist die MtFAS in Seitenansicht. Zu erkennen ist zudem eine homogene Verteilung der Partikel. Die *negative-stain*-EM Aufnahmen der MtFAS wurden zusammen mit Dr. Luciano Ciccarelli am MPI für Biophysik angefertigt.

## 3.2 Strukturlösung einzelner CaFAS Moleküle durch Cryo-EM Tomographie

Die Bestimmung der Raumgruppe der bakteriellen FAS-I Kristalle war zu Beginn schwierig. Um Einblick in die Orientierung der FAS-I Komplexe im Kristall zu erhalten, wurden kleine Kristalle der CaFAS mit Cryo-EM untersucht. Dieser unkonventionelle Ansatz begründet sich dadurch, dass sich die bakterielle FAS-I aufgrund ihrer Größe und ihrer gut erkennbaren Symmetrie für die EM ausgezeichnet eignet. Eine D3 Symmetrie ist aufgrund der hohen Homologie zur Pilz-FAS-I zu erwarten und die dreizählige Achse sollte in *negative-stain*-EM gut erkennbar sein. Zusätzlich war angedacht, über CET eine Strukturlösung bei niedriger Auflösung zu erzielen.

Es wurde die CaFAS bei folgenden Kristallisationsbedingungen verwendet: Bedingung 1 (0,1 M MIB-Puffer pH 7,0 und 25% PEG 1500) und Bedingung 2 (0,2 M NaMalonat; 0,1 M Bis-Tris-Propan pH 7,2; 20% PEG 6000 und 3% PGA-LM). Die Ergebnisse zur Cryo-EM Aufnahmen der CaFAS in Bedingung 1 befinden sich in Kapitel 3.5. Für CET wurden nur die CaFAS in Bedingung 2 benutzt. Die Kristallisationsansätze wurden nach zwei Tagen geöffnet und geringe Volumina (3 µl) der Kristallisationslösung auf die EM-Grids für CET übertragen. Im gezeigten Ausschnitt (siehe Abbildung 3.12) des EM-Grids der Bedingung 2 sind FAS-I Partikel und durch den hohen Kontrast in schwarz dargestellte Goldpartikel zu erkennen. Die FAS-I-Partikel sieht man, wie bei *negative-stain*-EM (siehe Abbildung 3.8) in Draufsicht-Orientierung, über dem gesamten EM-Grid verteilt. Zu erkennen ist in der Vergrößerung sogar eine hexagonale Anordnung von Partikeln. Die zugegebenen Goldpartikel wurden zum Alignement der Tiltserie bei der CET verwendet.

Die Tomographie erfordert das Arbeiten bei geringer Elektronendosis von unter 50 $e^-/Å^2$. Es wurde eine Kippserie von 61 Bilder gemacht von +60° bis -60° mit Inkrementen von 2°. Dadurch ist die Auflösung generell schwächer (Pixelgröße 0,342 nm), als z. B. bei Cryo-EM, in der nur ein Bild pro Molekül aufgenommen wird. Modelle von zwei CaFAS-Partikeln konnten letztlich bei einer Auflösung von 30 Å erhalten werden. Bei der Rekonstruktion der Modelle wurde die Pixelgröße achtfach auf 2,73 nm pro Pixel verringert und zeigten sich unterschiedliche Qualitäten in der Elektronendichte. So ist die äquatorielle Ebene und eine Reaktionskammer meist gut durch die Elektronendichte definiert (siehe Abbildung 3.13), während die andere Reaktionskammer unklare Konturen

zeigt (siehe Abbildung 3.14). Dies begründet sich darin, dass die Partikel auf dem EM-Grid sehr dicht gepackt sind (siehe Abbildung 3.12).

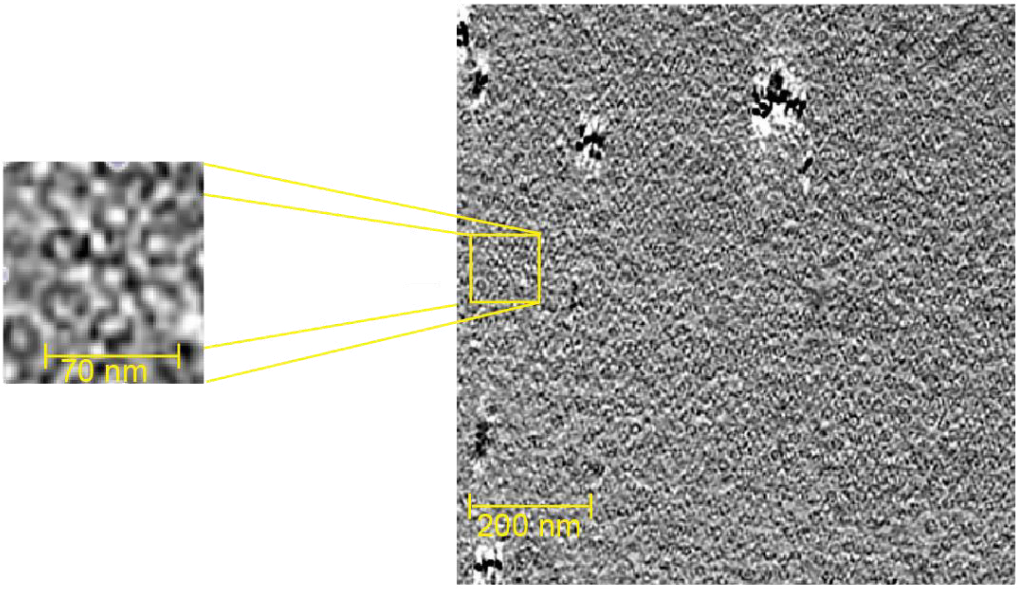



**Abbildung 3.12: Cryo-EM Aufnahmen (Bed. 2).**
Cryo-EM Grid ist mit Goldpartikel und CaFAS belegt. Die Goldpartikel sind durch den hohen Kontrast in schwarz zu sehen. Goldpartikel werden bei der CET zur Alignierung der Tiltserie verwendet. FAS-I ist durchgehend in Draufsicht zu erkennen. In der Vergrößerung ist eine hexagonale Anordnung von Partikeln hervor gehoben.

Durch diese Packung ist die auf dem EM-Grid liegende Reaktionskammer von den anderen Proteinen abgeschirmt, was zu einer schlechten Datenqualität im Bereich nahe des EM-Grids führt. Vor allem die Qualität des Tomogramms 2 zeigt diese Problematik in der starken Verjüngung und der diffusen Dichte in der EM-Grid-nahen Reaktionskammer (siehe Abbildung 3.14). Tomogramm 1 zeigt eine deutlich bessere Qualität mit gut erkennbarer Symmetrie der CaFAS (siehe Abbildung 3.13).

Die Tomogramme lieferten einen Einblick in die Struktur der CaFAS. In der Grid-fernen Reaktionskammer, die mit guter Qualität abgebildet werden konnte, ist ein Bruch der dreizähligen Symmetrie bei Tomogramm 2 erkennbar. Diese strukturelle Charakteristik liegt vor allem in der Eigenschaft der MAT-Domäne begründet. Die MAT-Domäne ist in den drei Protomeren der Reaktionskammer in verschiedener Positionierung zu erkennen, was auf eine hohe konformationelle Dynamik des Proteins hinweist. Dieses Ergebnis stimmt mit den Daten überein, die über Einzelpartikel Cryo-EM erhalten wurden (Ciccarelli *et al.,* 2013). Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.5 geschildert.

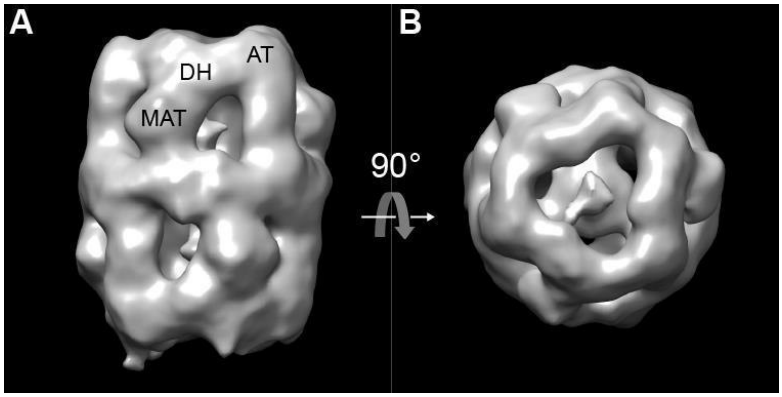



**Abbildung 3.13: Tomogramm 1 der CaFAS.**
Das Tomogramm zeigt die FAS-I mit einer Auflösung von etwa 30 Å. Die charakteristische Symmetrie des Enzyms, ähnlich der Symmetrie der Pilz-FAS-I, wird durch die Top-View Betrachtung deutlich. Gleichzeitig lässt sich der Bruch der Symmetrie durch die Dynamik in der Reaktionskammer erkennen.

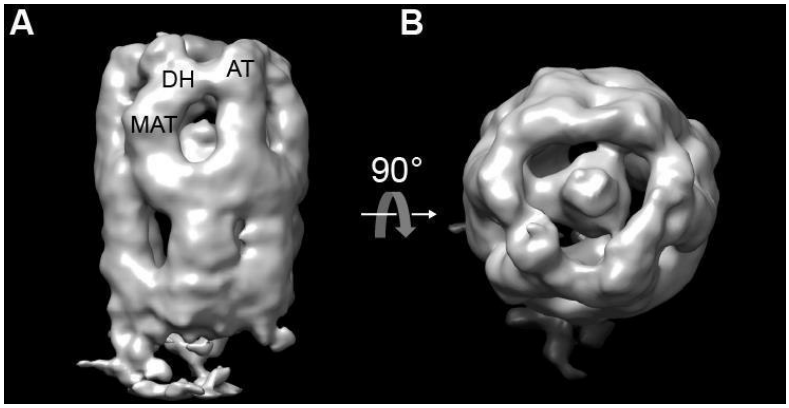



**Abbildung 3.14: Tomogramm 2 der CaFAS.**
Die Auflösung entspricht dem Tomogramm 1. Deutlicher als in Abbildung 3.13 ist die Öffnung des Enzyms durch eine Bewegung der MAT (siehe Top-View) erkennbar. Durch die Verschiebung kommt es zu einer Art Zug an der DH-Domäne verbunden mit einer Bewegung in Richtung zentrales Rad. Das Tomogramm zeigt einen sehr schlanken Aufbau der FAS-I, ein Artefakt.

## 3.3 Einzelpartikel Cryo-EM Struktur der MtFAS-I

Durch die hohe medizinische Relevanz in der Anti-TB-Behandlung ist die MtFAS ein interessantes Forschungsobjekt. 2013 kam es zur Veröffentlichung zweier Cryo-EM Strukturen der mycobakteriellen FAS-1; der rekombinant hergestellten MtFAS bei 17,5 Å (Ciccarelli *et al.*, 2013) und der MtFAS-homologen MsFAS bei 7,5 Å (Boehringer *et al.*, 2013).

Die Strukturlösung der MtFAS ist ein Teil dieser Arbeit und in Zusammenarbeit mit Dr. L. Ciccarelli, Dr. Sean R. Connell und Dr. Janet Vonck entstanden

(Ciccarelli *et al.*, 2013). Wie bereits gezeigt (siehe 3.1.D und 3.2), lag die MtFAS nach rekombinanter Expression in heterogener oligomerer Zusammensetzung vor. Die Selektion auf hexameres Protein erfolgte durch SEC. Über SEC wurden zusätzlich die Pufferbedingungen $NaP_i$-Puffer (Puffer D) und HEPES-Puffer (Puffer F) für die spätere strukturelle Untersuchung eingestellt. Es sei hier auch erwähnt, dass nicht-posttranslational modifiziertes Protein für die Analyse verwendet wurde. Dadurch sollte vermieden werden, dass durch nicht quantitative Phosphopantheinylierung bzw. der Modifizierung des Phosphopantetheins mit Fettsäuren und Fettsäurederivaten (Acylen) konformationell heterogene Proteinproben erhalten werden (Whicher *et al.*, 2014).

Da in früheren Cryo-EM Arbeiten für die Pilz- und bakterielle FAS-I eine D3-Symmetrie beschrieben wurde (Boehringer *et al.*, 2013; Gipson *et al.*, 2010), begann die Rekonstruktion der Elektronendichte unter dieser Annahme. Da jedoch keine stabilen Verfeinerungen erhalten werden konnten, wurde der „D3-Symmetriezwang“ aufgehoben. Entsprechende Verfeinerung in C1 erlaubte die Charakterisierung des Proteins in 3 Konformationen. Für die Strukturlösung wurde von Grid-1 der MtFAS in Puffer D 16700 Projektion ausgewählt und von Grid-2 der MtFAS in Puffer F nochmals 6030 Projektionen. Von den zu Beginn 22730 ausgewählten Projektionen erfolgte die Verfeinerung mit final 16830 Projektionen. Die Rekonstruktion erfolgten mit 9136 Partikeln für EM-Map-1, 4337 für EM-Map-2 und 3357 EM-Map-3, bei Auflösungen bei 17.5 Å (EM-Map-1), 20.2 Å (EM-Map-2) und 27.0 Å (EM-Map-3) (siehe Abbildung 3.15). Die drei Elektronendichten zeigen die bakterielle FAS-I in unterschiedlichen Konformationen und implizieren eine hohe strukturelle Dynamik des Proteins.

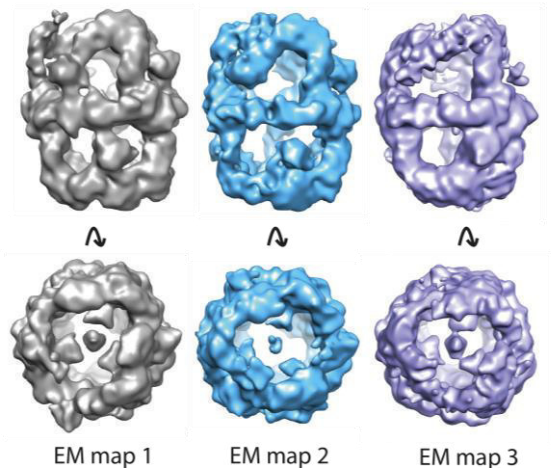



**Abbildung 3.15: Elektronendichten der drei Rekonstruktionen der MtFAS.**
Die drei rekonstruierten EM-Elektronendichten der MtFAS bei 17,5 Å für EM-Map-1, bei 20,2 Å EM-Map-2 und bei 27,0 Å für EM-Map-3. Zu sehen sind die Partikel in Seitenansicht (oben) und Draufsicht (unten). (Abbilung aus Ciccarelli *et al.*, 2013)

Vergleich der bakteriellen FAS-I mit der Pilz-FAS-I

Die Rekonstruktionen zeigen den fassartigen Aufbau der bakteriellen FAS-I ähnlich der Pilz-FAS-I. So wie in Pilz-FAS-I wird die Fassstruktur durch die zentrale äquatoriale Ebene des Enzyms mit an beiden Seiten angeschlossenen Reaktionskammern gebildet (Boehringer *et al.*, 2013; Ciccarelli *et al.*, 2013). Durch das Docken des atomaren Modells der ScFAS Röntgenstruktur (pdb: 2uv8) (Leibundgut *et al.*, 2008) in die EM-Dichtekarte der bakteriellen FAS-I wird die strukturelle Verwandtschaft von bakterieller und Pilz-FAS-I deutlich. Auch die minimalistische strukturelle Ausstattung des Enzyms der bakteriellen FAS-I wird durch diese Überlagerung deutlich. Die Trimerisierungsdomäne (TM), Hotdog-Dömane2 (HDD-2), Dimerisierungsdomänen (DM) DM-2 und DM-4, sowie die AcpS-Domäne für die posttranslationale Modifikation der ACP-Domäne sind im Vergleich zur Pilz-FAS in der bakteriellen FAS-I nicht vorhanden (siehe Abbildung 3.16).

Interaktionen zwischen zentralem-Rad und Dom sind ebenfalls reduziert. Von den in Pilz-FAS-I identifizierten Interaktionsflächen C1 (ER/KS), $C_2$ (DH (HDD2)/ KR) und $C_3$ (MPT/KS) ist C1 bei der MtFAS nicht vorhanden und $C_2$ und $C_3$ weniger stark ausgebildet (Jenni *et al.*, 2007; Boehringer *et al.*, 2013).

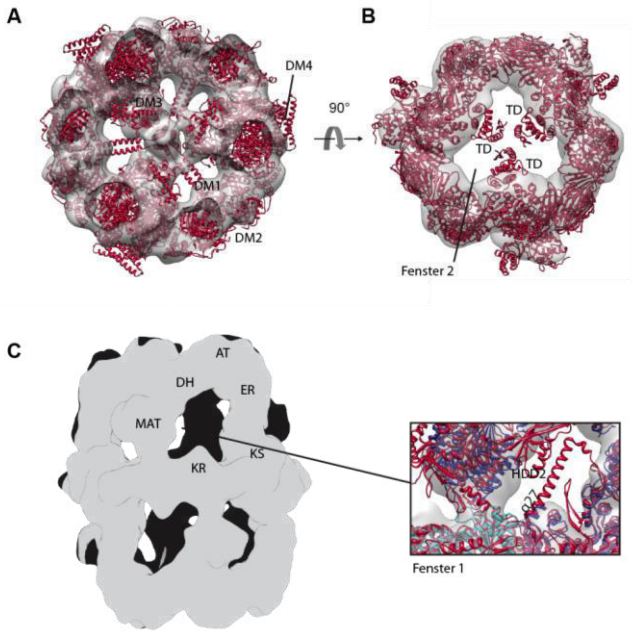



**Abbildung 3.16: MtFAS mit der gedockten röntgenkristallographischen Struktur der ScFAS.**
(A) MtFAS Elektronendichte der zentralen-Kette mit gedockter Struktur der ScFAS (pdb: 2uv8) (Leibundgut *et al.*, 2008). DM-2 und DM-4 fehlen in der bakteriellen MtFAS und sind in der Dichte nicht wiedergegeben. (B) Sicht auf die Reaktionskammer zeigt ebenso keine Dichte für die fehlende TM der Pilz-FAS-I. Durch das Fehlen der TM entsteht das Fenster 2. (C) In der Seitenansicht der bakteriellen FAS-I sieht man deutlich das Fenster 1, das durch das Fehlen der HDD-2 ausgebildet wird. (Abbilung aus Ciccarelli *et al.*, 2013)

Die drei Positionen der MAT-Domäne bei der MtFAS

Zur Interpretation der drei Elektronendichten wurde jeweils die Struktur der MsFAS (pdb: 3zen) (Boehringer *et al.*, 2013) in EM-Map-1 und Map-2 eingepasst. Das atomare Modell der MsFAS (pdb: 3zen) (Boehringer *et al.*, 2013) kann ohne größere Modifikationen in EM-Map-2 (vgl. Abbildung 3.17) gedockt werden. Zum Docken in EM-Map-1 wurden die Domänen MAT und DH in einem *rigid-body*- Verfeinerungsansatz eingepasst.

In EM-Map-1 und -2 lassen sich insgesamt 3 Konformationen der Reaktionskammern finden, die sich insbesondere in den Positionen der MAT unterscheiden. Die Positionen werden mit P1, P2, und P3 bezeichnet (Ciccarelli *et al.*, 2013) (siehe Abbildung 3.17). Am häufigsten findet sich die MAT-Domäne in Position P2. Hier kommt es zu einer Interaktion der MAT-Domäne in mit der KR-Domäne der Nachbarkette (KR´). Das daraus resultierende Modell hat eine große Ähnlichkeit mit der MsFAS (Boehringer *et al.*, 2013), sowie der Pilz-FAS-I Struktur (Jenni *et al.*, 2007; Leibundgut *et al.*, 2007; Lomakin *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2008). In Position P3 ist die MAT-Domäne um 20 Å verschoben und interagiert mit der KR-Domäne der eigenen Kette. Es kommt zu einer offenen Konformation. Hier sind die Domänen ER und DH in der Position verändert wodurch die Interaktion zur AT-Domäne der Nachbarkette (AT´´) verloren geht. Das Ergebnis der Öffnung des Komplexes ist eine erhöhte Zunahme der Flexibilität der AT´´-Domäne (siehe Abbildung 3.17).

Position P1 ist die dritte Positionierung der MAT-Domäne, die identifiziert werden konnte. Hier kommt es zu einer Verschiebung der ER-Domäne in eine innere Position. Dadurch rückt die MAT-Domäne näher zur KR- und KS-Domäne der Nachbarkette (KR´, KS´), sowie der ER- und KS-Domäne der anderen Nachbarkette des Doms (ER´´, KS´´). Durch die Abfolge der drei rekonstruierten Elektronendichten kann entsprechend der Reihenfolge eine Positionsänderung der MAT-Domäne in Uhrzeigerrichtung gezeigt werden (siehe Abbildung 3.17).

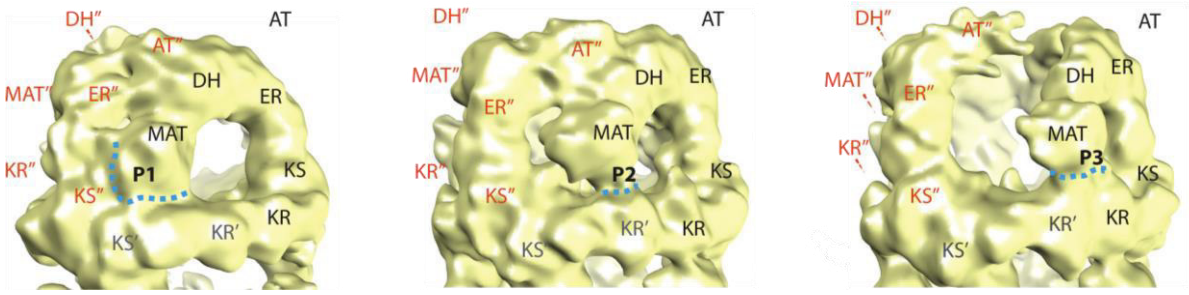



**Abbildung 3.17: Drei Positionen der MAT-Domäne.**
In den Konformationen der Reaktionskammern lassen sich drei Positionen der MAT-Domänen identifizieren. Sie werden mit P1, P2 und P3 bezeichnet. MAT zeigt die größte Positionsänderung jedoch sind auch andere Domänen mobil. (Abbilung aus Ciccarelli *et al.*, 2013)

## 3.4 Röntgenkristallographische Untersuchung der bakteriellen FAS-I

Das Ziel der Arbeit war es vor allem eine hochaufgelöste Röntgenkristallstruktur der bakteriellen FAS-I zu erhalten. Dieses Ziel wurde mit drei Proteinen verfolgt, MtFAS, CaFAS und CeFAS. Für alle drei bakteriellen FAS-I-Systeme war es möglich beugende Kristalle zu erzeugen.

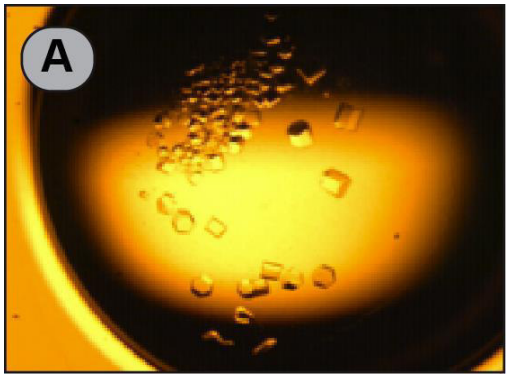
(I) Die Kristallisierbarkeit für die CaFAS konnte bereits gezeigt werden (Enderle, 2010). Die Kristallisationsbedingungen wurde systematische durch mehrdimensionale Stufen von sogenannten *sparse-matrix*-Kristallisationsscreens und anschließend durch das Ansetzen von Grid-screens optimiert. (II) Kristallisationsansätze mit MtFAS führten nur zu einem beugenden Kristall, der Daten bei niedriger Auflösung lieferte. (III) Die CeFAS wurde erst zu einem späteren Zeitpunkt in Kristallisationsansätzen getestet. CeFAS wurde gewählt, weil der Organismus *C. efficiens* thermotolerant ist (Fudou *et al.*, 2002; Nishio *et al.,* 2003). Proteine aus thermotoleranten oder thermophilen Organismen erhöhen die Chancen auf Erfolg bei der Strukturlösung (Szilágyi & Závodszky, 2000; Zhou, 2002; Jenni *et al.*, 2007).

Die Kristallisationslösung der CaFAS wurde optimiert und Bedingungen im Bereich 0,1-0,2 M Na-Malonat, 0,1 M Na-Cacodylat, (pH 6,5), 15-20% (w/v) PEG 8000 und 3% (w/v) PGA-LM erwiesen sich als am besten geeignet. MtFAS kristallisiert in 0,3 M Na-Malonat, 0,1 M Tris (pH 7,8) und 8% (w/v) PGA-LM. Für CeFAS erwiesen sich 0,1-0,2 M Na-Malonat; 0,1 M Bis-Tris-Propan (pH 7,2) und 15-25% (w/v) PEG 3350 als geeignet. Das Züchten der hexagonalen Kristalle dauerte 1-2 Wochen

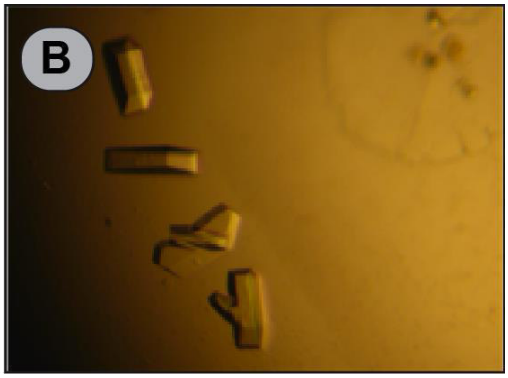
bei einer konstanten Temperatur von 4°C (siehe Abbildung 3.18 und 3.19). Die Messung der Proteinkristalle erfolgte ausschließlich an den Elektronen-Synchrotrons European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble (F) und Swiss Light Source (SLS), Villigen (CH), da bei der Größe des Proteins und der geringen Streukraft der Kristalle eine hohe Intensität des Röntgenstrahls gewährleistet sein musste. Insgesamt wurden von den drei bakteriellen FAS-I Systemen über 150 Datensätze gesammelt.

Folgende Datensätze wurden in der kristallographischen Auswertung verwendet (Tabelle 3.1): Für CaFAS wurden die Datensätze $B_1$ und $B_2$ der Raumgruppe $P2_1$ mit den Zellkonstanten *a*= 308,9 Å, *b*= 335,8 Å, *c*= 248,8 Å und Raumgruppe $P32_1$ mit den Zellkonstanten *a*= 342,7 Å, *b*= 342,7 Å, *c*= 247,7 Å aufgenommen. Für die CeFAS wurden für die Datensätze $A_1$ und $A_2$ die Raumgruppe $P32_1$ mit den Zellkonstanten *a*= 332,4 Å, *b*= 332,4 Å, *c*= 248,0 Å und die Raumgruppe H32 mit den Zellkonstanten *a*= 337,2 Å, *b*= 337,2 Å, *c*= 247,0 Å ermittelt. Der Datensatz $A_1$ konnte für die Strukturlösung bei niedriger Auflösung verwendet werden. Dies war der einzige Datensatz der keinen Fehlbau aufwies und gleichzeitig bis einer akzeptablen Auflösung streute. CeFAS kristallisierte in hexagonaler Raumgruppe; anders als Pilz-FAS-I Kristalle, die tetragonale Raumgruppen aufwiesen (Jenni *et al.*, 2007; Leibundgut *et al.*, 2007; Lomakin *et al.*, 2007; Johansson *et al.*, 2008).

Die niedrige Auflösung und der Einfluss durch Kristallfehlbau führte zu Ansätzen um die Auflösung der Kristalle durch Post-Kristallisations-Methoden, wie Dehydration zu verbessern (Jenni *et al.*, 2006; Jenni *et al.*, 2007; Leibundgut *et al.*, 2007). Dies blieb ohne Erfolg für CeFAS, jedoch zeigte ein CaFAS Kristall nach Dehydration eine Auflösung von 4,5 Å. Es konnte allerdings kein kompletter Datensatz gesammelt werden.

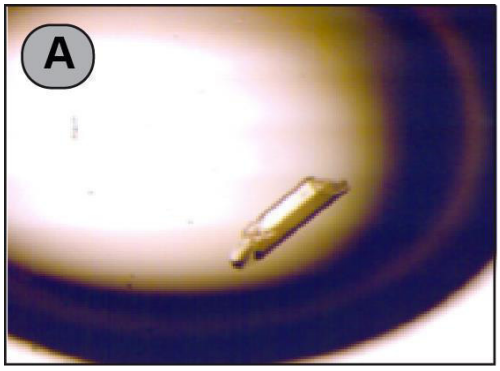



Bedingung:
0,1 NaMalonat, 20% PEG 8000,
0,1 NaCaccodylat pH 6,7



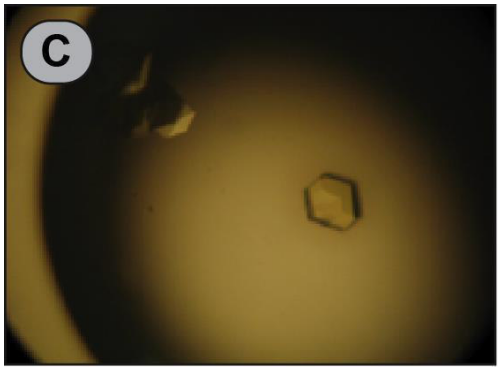

Bedingung:
0,1 M NaFormat, 22% PEG 6000,
0,1 NaCaccodylat pH 6,7

**Abbildung 3.18: Kristallbilder der CaFAS.**
Kristallisationsansätze ausgeführt in der hanging drop Methode. Die Bedingungen sind jeweils unter der Abbildung angegeben. Die Ansätze wurden bei 4°C inkubiert. Die Kristalle sind 50-100 µm groß.

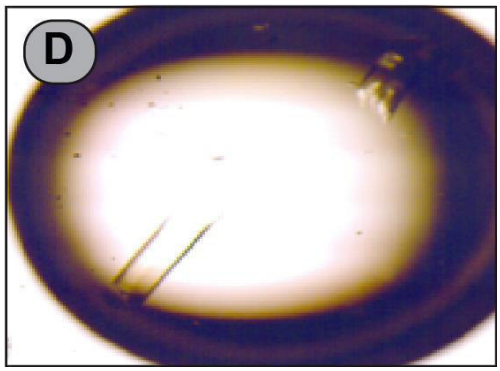



Bedingung:
0,1 M NaMalonat, 22% PEG 3350,
0,1 M BisTrisPropan pH 7,2

Bedingung:
0,1 M NaFormat, 20% PEG 3350
0,1 M BisTrisPropan pH 7,2




Bedingung:
0,1 M NaMalonat, 20% PEG 3350,
0,1 M BisTrisPropan pH 6,7



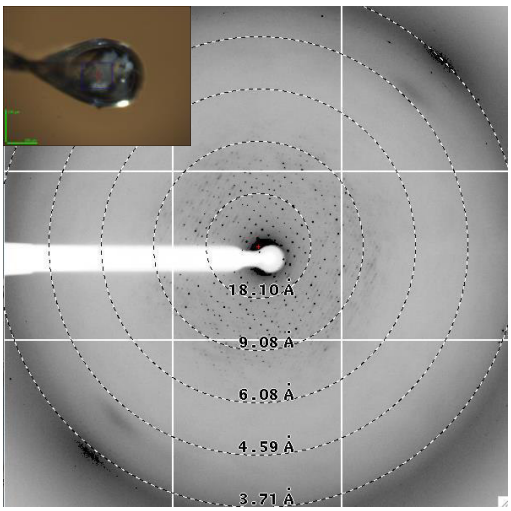

Bedingung:
0,1 NaMalonat, 21% PEG 3350,
0,1 BisTrisPropan pH 6,7

**Abbildung 3.19: Kristallbilder der CeFAS.**
Kristallisationsansätze ausgeführt in der hanging drop Methode. Die Bedingungen sind jeweils unter der Abbildung angegeben. Die Ansätze wurden bei 4°C inkubiert. Die Kristalle sind 50-100 µm groß.

**Tabelle 3.1: Statistik zur Datensammlung der bakteriellen FAS-I.**

| FAS-I | CeFAS | CeFAS | CaFAS | CaFAS | MtFAS |
|---|---|---|---|---|---|
| Datensatz | $A_1$ (*) | $A_2$ | $B_1$ | $B_2$ | $C_1$ |
| *Beamline* | ID14-4 | ID14-4 | ID14-1 | ID23-1 | ID29-1 |
| Detector | CCD (ADSC) | CCD (ADSC) | CCD (ADSC) | CCD (ADSC) | Pilatus (Dec.) |
| Wavelength (Å) | 0,9393 | 0,9792 | 0,9334 | 1,0332 | 0.9790 |
| Oscillation angle (°) | 1.00 | 0.50 | 0.25 | 0.25 | 0.1 |
| Exposure time (s) | 1.2 | 0.3 | 12.0 | 1.0 | 0.125 |
| Resolution range (Å) | 50-6.0 | 50-4.5 | 50-8.0 | 50-6.5 | 50-6.5 |
| Space group | H32 | $P32_1$ | $P2_1$ | $P32_1$ | $P2_1$ |
| Cell constants (Å) | a 337.2 | a 332.4 | a 208.9 | a 342.7 | a 249.4 |
| (Å) | b 337.2 | b 332.4 | b 335.8 | b 342.7 | b 343.1 |
| (Å) | c 247.0 | c 248.0 | c 248.8 | c 247.7 | c 387.6 |
| (°) | $\alpha$ 90.0 | $\alpha$ 90.0 | $\alpha$ 90.0 | $\alpha$ 90.0 | $\alpha$ 90.0 |
| (°) | $\beta$ 90.0 | $\beta$ 90.0 | $\beta$ 111.6 | $\beta$ 90.0 | $\beta$ 91.9 |
| (°) | $\gamma$ 120.0 | $\gamma$ 120.0 | $\gamma$ 90.0 | $\gamma$ 120.0 | $\gamma$ 90.0 |
| Reflections | | | | | |
| Total | 327733 | 550938 | 126514 | 399078 | 425549 |
| Unique | 21205 | 63504 | 33762 | 32826 | 127011 |
| R merge | 0.186 | 0.171 | 0.104 | 0.195 | 0.17 (0.7) |
| I/σ(I) | 11.5 | 6.0 | 9.5 | 12.5 | 4.8 (1.4) |
| Completeness (%) | 99.9 | 98.4 | 99.9 | 99.2 | 98.7 (3.4) |

(*) Datensatz $A_1$ war nicht durch Fehlbau in der Qualität beeinträchtigt und konnte zur Strukturlösung verwendet werden



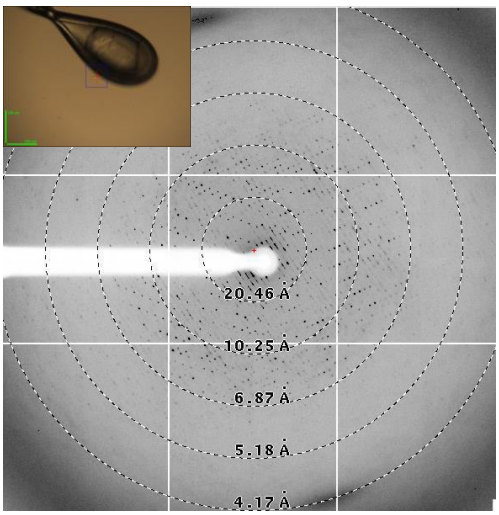




**Abbildung 3.20: Diffraktionsbilder zweier CeFAS Kristalle aufgenommen an der *beamline* ID14-4 (ESRF, Grenoble).**

Auf dem linken Diffraktionsbild sind Reflexe bis 6 Å (Datensatz $A_1$) und auf dem rechten Diffraktionsbild bis 4,5 Å (Datensatz $A_2$) zu erkennen.

### 3.4.1 Phasenbestimmung durch molekularen Ersatz (MR)

**Tabelle 3.2: Strukturklärung der CeFAS (*).**

| *Programmname* | *Verwendung* | *Verwendete Strukturen* |
|---|---|---|
| **Molrep** (Vagin & Teplyakov, 1997) | MR | Strukturlösung; mit MsFAS (pdb: 3zen) als Suchmodell |
| **Phaser** (McCoy *et al.,* 2007) | MR | Strukturlösung; mit MsFAS (pdb: 3zen) als Suchmodell |
| **Clustal Omega** (Sievers & Higgins, 2014) Und **Sculptor** (Bunkóczi & Read, 2011) | Alignement und Mutation des $C_\alpha$-Rückgrat | Umschreiben von MsFAS in CeFAS |
| **Refmac5** (Murshudov *et al.*, 2011) | Verfeinerungsprogramm | CeFAS |
| **Coot** (Emsley & Cowtan, 2004) | Modellbau, Strukturvisualisierung und Evaluation | CeFAS |

(*) Die Auswertung der Datensätze und die Lösung des Phasenproblems mit *molecular replacement* erfolgt in Zusammenarbeit mit Dr. Karthik Paithankar.

Zur Strukturlösung der CeFAS mit Datensatzes $A_1$ wurde die Cryo-EM Struktur der MsFAS-I (pdb: 3zen) (Boehringer *et al.*, 2013) als Suchmodell verwendet. Die Sequenzhomologie der Enzyme ist sehr hoch, dadurch konnte für den Datensatz $A_1$ das Phasenproblem mit MR gelöst werden. Es wurde das Programm *Molrep* (Vagin & Teplyakov, 1997) verwendet. In MR werden durch Anwendung der Patterson-Funktion die gemessenen Daten mit den durch MR berechneten Strukturfaktoramplituden korreliert. Nach erfolgreichem Abschluss der Rotationsfunktion kommt es zu einem Platzieren des Suchmodells in die Elektronendichtekarte. Die erhaltene Phaseninformation durch MR führte zu interpretierbaren Elektronendichtekarten. Die Lösung wurde mit dem Programm Phaser (McCoy *et al.,* 2007) bestätigt (siehe Tabelle 3.3). Dies ergab eine LLG-Wertung von 424 und TFZ Wertung von 592.

Zur Positionierung der Polypeptidkette wurden die Sequenzen von MsFAS und CeFAS durch das Programm Clustal Omega (Sievers & Higgins, 2014) aligniert und die Reste entsprechend mit Sculptor (Bunkóczi & Read, 2011) mutiert.
Dieses generierte vorläufige Modell wurde als Startmodell für eine weitere Verfeinerung verwendet. Das Modell wurde danach zuerst mit 20 Zyklen einer *rigid-body*-Verfeinerung und anschließend mit weiteren 50 Refmac5 (Murshudov *et al.*, 2011) Zyklen und 20 TLS Verfeinerungsschritten optimiert. In einem periodischen Ablauf von visueller Überprüfung und Modifikation der Struktur mit Coot (Emsley & Cowtan, 2004) erfolgte die weitere Verfeinerung der Strukturdaten mit Refmac5. Entsprechend konnten die R-Faktoren verbessert werden (siehe Tabelle 3.4 und 3.5).

In der H32 Raumgruppe liegt nur eine Polypeptidkette in der asymmetrischen Einheitszelle mit einem Lösungsmittelanteil von 69% pro Einheitszelle vor (Matthew, 1969).

**Tabelle 3.3: Die Lösung für MR des Datensatz $A_1$.**

| *Lösung* | *Θ* | *Φ* | *X* | *α* | *β* | *γ* | *Rf/σ* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 90 | -90 | 10 | 18.9 | 180 | 20 | 12.2 |
| 2 | 89.4 | 103.2 | 164.3 | 17.7 | 164.2 | 351.2 | 3.8 |

**Tabelle 3.4: R-Faktoren der MR-Lösung.**

| *R-Faktoren* | |
|---|---|
| R-Faktor | 0,32963 |
| $R_{free}$-Faktor | 0,40438 |

**Tabelle 3.5: R-Faktoren nach Strukturverfeinerung.**

| *R-Faktoren* | |
|---|---|
| R-Faktor | 0,26 |
| $R_{free}$-Faktor | 0,33 |

Die R-Faktoren sind ein Indikator für die Qualität des Modells. Ein perfekter Fit hat einen Wert von Null, normalerweise liegen die Werte bei 0,2. Deutlich sind auch die Verbesserung der R-Faktoren zu erkennen, die beim Modellverfeinerungsprozess zu verzeichnen sind (Kleywegt & Jones, 1997).

**Tabelle 3.6: Verfeinerungsstatistik des Datensatz $A_1$.**

| | CeFAS *Datensatz $A_1$* |
|---|---|
| Strahlungsquelle | ID 14-4 |
| Bilderbereich | 1-400 |
| Wellenlänge (Å) | 0,9393 |
| Zellkonstante (Å; °) | 337,9; 337,9; 246,9; 90,0; 90,0; 120,0 |
| Raumgruppe | H 32 |
| Oszill. Winkel (°) | 1 |
| Mosaizität (°) | 0,5 |
| Strahlungszeit (s) | 1,2 |
| Auflösungsbereich (Å) | 35-7,6 (7,7-7,6) |
| Wilson B-Faktor ($Å^2$) | 454 |
| Gemessene Reflexe | 166375 |
| Unabhg. Reflexe | 6954 |
| Vollständigkeit (%) | 100 |
| $I/\sigma (I)^2$ | 23 (6) |
| Multiplizität | 24 (6,3) |
| $R_{meas}$ | 0,11 (0,6) |
| $R_{PIM}$ | 0,03 (0,2) |
| $R/R_{frei}$ | 0,27/0,32 |
| Nummer von nicht Wasserstoffatomen | 9716 |
| Aminosäurereste | 2423 |
| RMS (Bindungen) | 0,003 |
| RMS (Winkel) | 0,001 |
| Ramachandran begünstigt (%) | 67,8 |
| Ramachandran erlaubt | 14,2 |
| Ausreiser | 18 |

### 3.4.2 Interpretation der Elektronendichte

Die erhaltene Elektronendichte der CeFAS bei moderater Auflösung zeigt, dass die strukturelle Information limitiert ist. Deutlich zu erkennen ist, dass die Elektronendichte nicht durchgängig ist und immer wieder in flexiblen Loop-Bereichen und Lösungsmittel exponierten Stellen abbricht. Sekundärstrukturelemente sind teilweise erkennbar (siehe Abbildung 3.21).

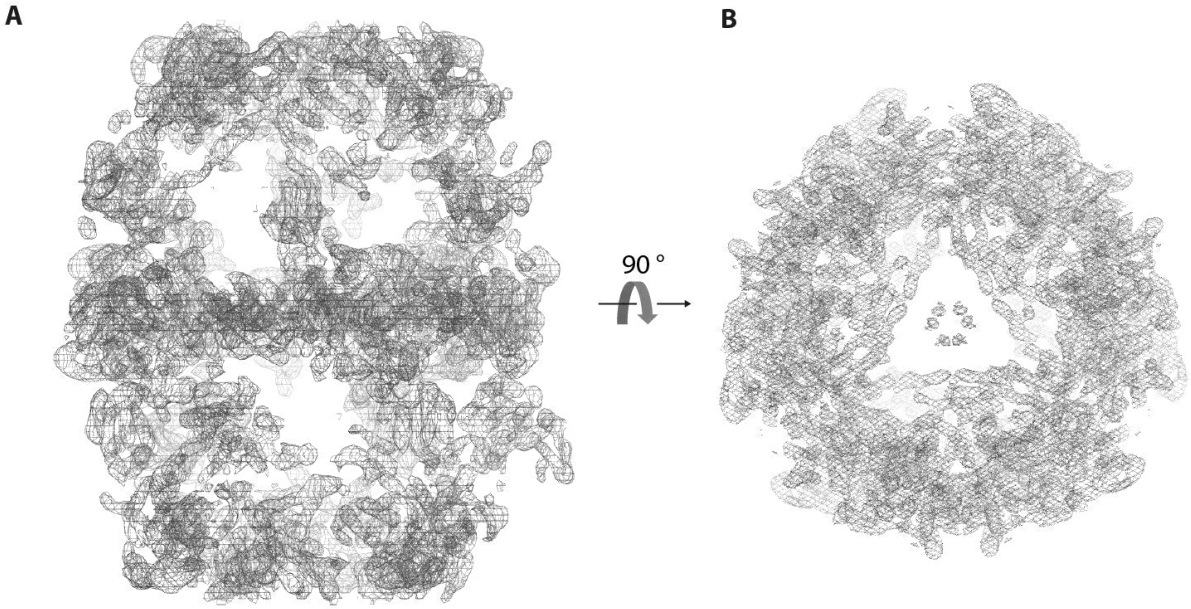



**Abbildung 3.21: Elektronendichte der CeFAS bei einer Auflösung von 7,5 Å.**
CeFAS in Seitenansicht (A) und in Top-View (B). Die Elektronendichte ist als Netz in grau bei einem σ von 1.5 dargestellt. Die D3-Symmetrie des Moleküls ist deutlich zu erkennen.

### 3.4.3 Röntgenkristallographische Struktur der CeFAS

Die röntgenkristallographische Struktur der CeFAS ist durch ein Molekül in der asymmetrischen Einheitszelle bestimmt und durch kristallographische Symmetrie zum homohexameren Molekül vervollständigt. Das so generierte finale Modell der CeFAS beinhaltet 2423 von 3022 Aminosäuren pro Polypeptidkette. Somit konnten 20% der Polypeptidkette nicht in der vorhandenen Elektronendichte platziert werden. Die Röntgenstruktur zeigt die Architektur und Anordnung der Domänen bakterieller FAS-I (siehe Abbildung 3.22). Am N-terminale Ende der Polypeptidkette befindet sich die AT-Domäne, diese bildet den oberen Rand des Fasses. Gefolgt durch die ER-Domäne die über einen Loop der aus acht Aminosäurereste besteht mit der AT verbunden ist. Durch sieben anti-parallel verlaufende β-Faltblätter ist die ER mit der DH-Domäne verbunden. Die MAT-Domäne ist direkt verbunden mit der DH-Domäne. Für die hoch bewegliche MAT-Domäne (Ciccarelli *et al.*, 2013) ist trotzdem nur die

Elektronendichte am C-Terminus schwach in unseren Daten. In der Primärstruktur der bakteriellen FAS-I folgt nun die ACP-Domäne, diese ist in unseren Daten nicht sichtbar. Im Bereich des zentralen Rades bildet die Dimerisierungsdomäne-1 (DM-1) den N-Terminus der KR-Domäne. Die KS-Domäne zeigt einen typischen Rossmann-*fold*, gefolgt von einem α/β-Thiolase-*fold*. Für die Co-Faktoren FMN und NADPH konnte keine Elektronendichte gefunden werden.

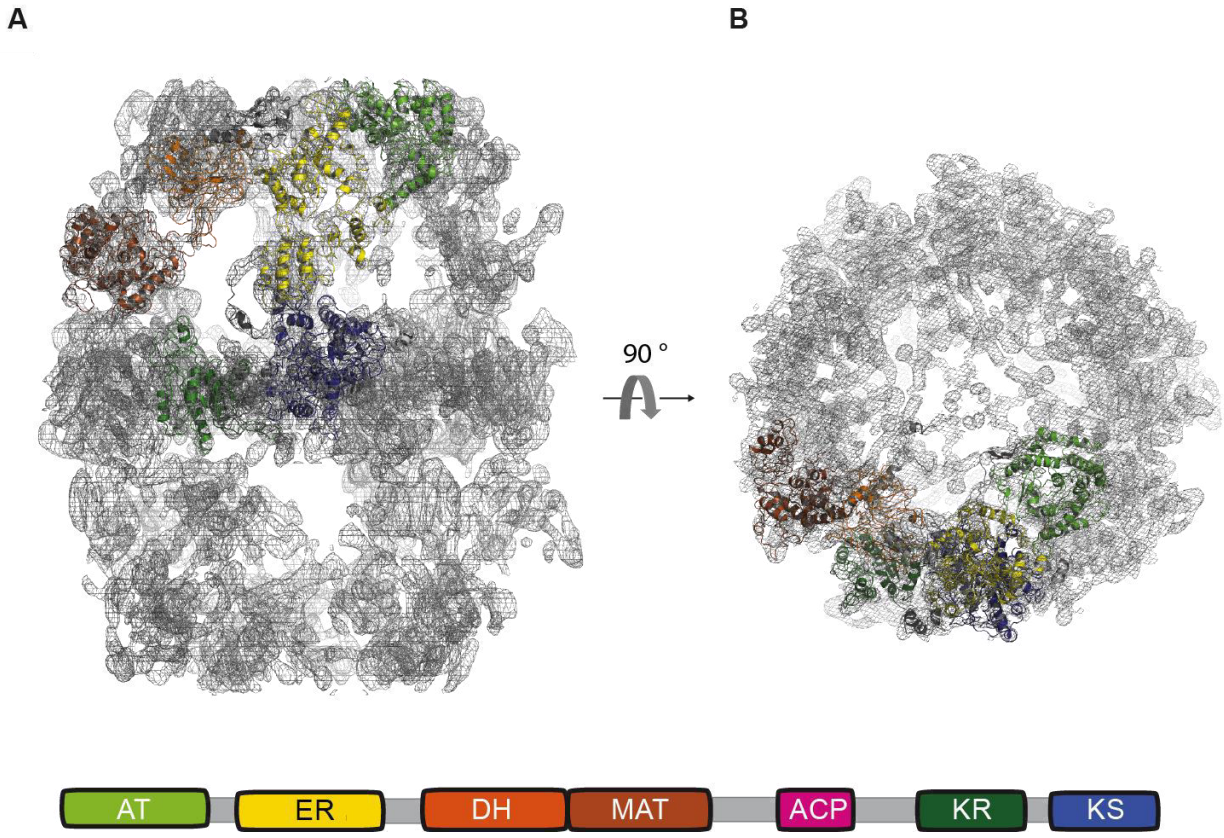



**Abbildung 3.22: Elektronendichte mit gedockten katalytischen Domänen einer Polypeptidkette.** Darstellung in Seitenansicht (A) und (B) in Top-View. Berechnete Elektronendichte der CeFAS des Datensatzes $A_1$. Die Elektronendichte ist als Netz in grau bei einem σ von 1.5 dargestellt. Gezeigt sind die katalytischen Domänen einer Polypeptidkette. Die Domänen sind farblich entsprechend der schematischen Darstellung der Domänenanordnung auf einer Polypeptidkette gekennzeichnet. ACP kann in der Struktur nicht dargestellt werden, da die Position aus den Daten nicht identifizierbar ist.

Die Dimension der gesamten fassartigen Struktur wurde mit 220 Å Durchmesser und 270 Å Höhe bestimmt. Die CeFAS besteht größtenteils aus *α*-Helices (Boehringer *et al.,* 2013; Ciccarelli *et al.,* 2013). Auffällig ist eine sehr geringe Dichte an Domänen im Bereich der *β*-Dome mit zwei „Aussparungen“, die in den Strukturlösungen der MtFAS bereits identifiziert und als Fenster bezeichnet wurden. Das Fenster 2 ist an der dreizähligen Achse positioniert und wird durch die Domänen AT und ER begrenzt. An der Außenwand der Reaktionskammer ist ein weiteres

Fenster (Fenster 2) zu erkennen, das von den Domänen DH, ER und KR begrenzt wird (Boehringer *et al.*, 2013; Ciccarelli *et al.*, 2013).

### 3.4.4 Vergleich der bakteriellen- und der Pilz-FAS-I Struktur

Die Strukturen der bakteriellen FAS-I und der Pilz-FAS-I zeigen eine hohe Homologie, sowohl in der Abfolge der Domänen, wie auch im strukturellen Aufbau der Komplexe. Unterschiede zwischen bakterieller FAS-I und der Pilz-FAS-I finden sich im Stabilitätsgerüst des Fasses und dem Fehlen der PPT-Domäne.

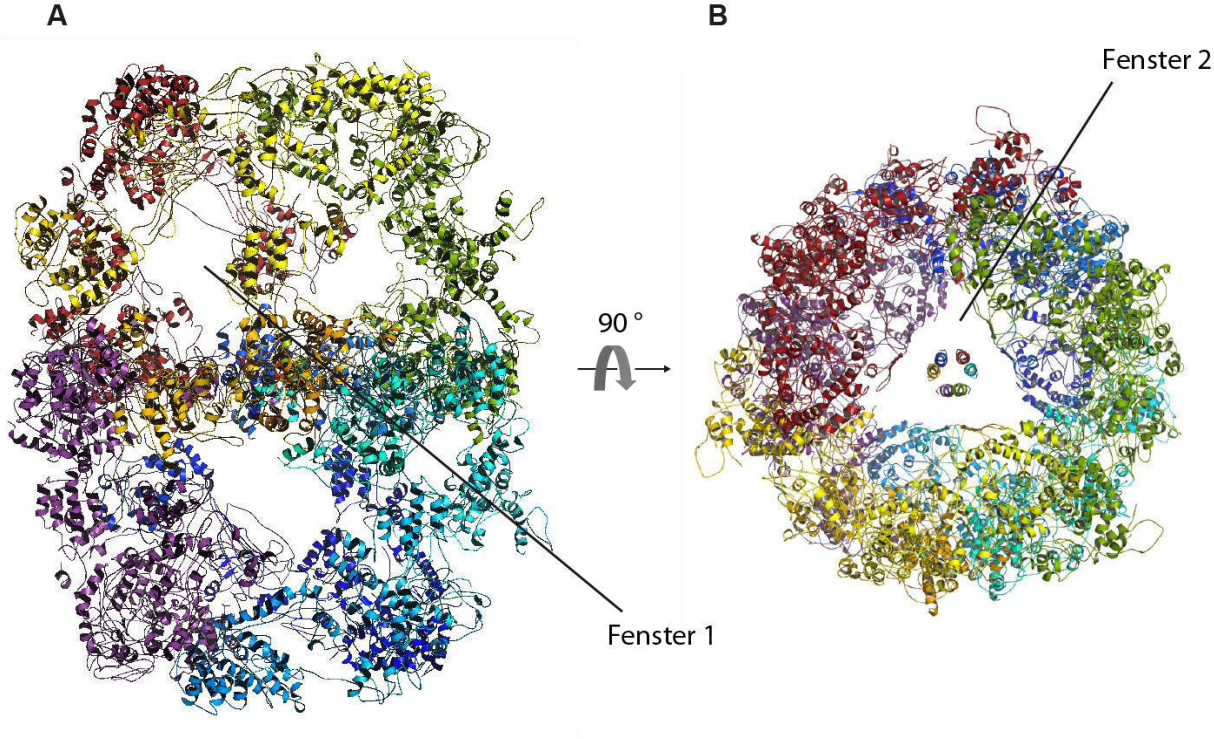



**Abbildung 3.23: Struktur der CeFAS bei einer Auflösung von 7,5 Å.**
CeFAS $C_\alpha$-Rückgrat dargestellt in Seitenansicht (A) und in Draufsicht (B). $C_\alpha$-Rückgrat der CeFAS bei Sicht auf das zentrale Rad (B), ist deutlich die dreizählige Achse des Moleküls zu erkennen. Zusätzlich sind die beiden großen Fenster entsprechend der *M. tuberculosis* Annotierung (siehe Abbildung 3.16), als Fenster 1 für die Seitenwand und Fenster 2 für die Kappen beschriftet.

Abbildung 3.24 zeigt eine Superposition der CeFAS und der ScFAS (siehe Abbildung 3.24). Die oben beschriebenen Fenster der *β*-Dome sind in ScFAS nicht vorhanden, sondern es finden sich hier Struktur-stabilisierende Domänen. So ist in ScFAS Fenster 1 durch eine N-terminale Trimerisierungsdomäne und Fenster 2 durch eine HDD-2 Domäne verschlossen. Unterschiede findet man auch im zentralen Radbereich. Hier sind in CeFAS die Dimerisierungsmodule DM-2 und DM-4 nicht vorhanden.

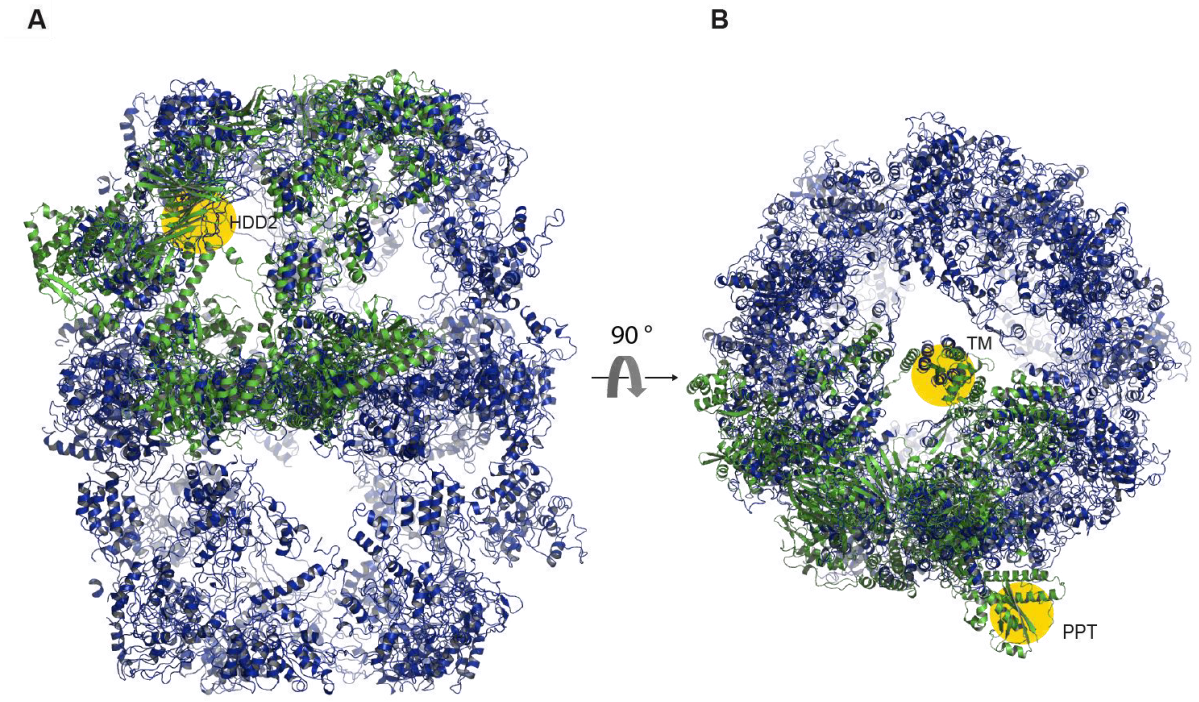



**Abbildung 3.24: Superposition der CeFAS (blau) und der ScFAS (grün).**
Zur Verdeutlichung der Unterschiede zwischen der bakteriellen CeFAS und der fungalen ScFAS (pdb: 2vkz) (Johansson *et al.*, 2008) wurden beide Strukturen durch Superposition überlagert. Fehlende strukturelle Elemente sind farblich hervorgehoben und gekennzeichnet.

### 3.4.5 Unterschiede im zentralen Rad Bereich zwischen der Pilz- und bakteriellen FAS-I

Das strukturelle Element der Nabe ist von besonderer Bedeutung in der Architektur der bakteriellen FAS-I und der Pilz-FAS-I. Es ist das einzige Element, in dem alle Polypeptid-Ketten (bzw. alle *α*-Ketten im heterododekameren Pilz-Komplex) interagieren. Zudem dient die Nabe als Ankerpunkt des zentralen Linkers des ACP. Deshalb wurde die Region um die Nabe mit besonderem Fokus betrachtet. In einer Alignierung mehrerer FAS-I Sequenzen zeigt die Region DM-1, die Verbindung zwischen zentraler Nabe und KR-Domäne, und die Nabe selbst nur eine schwache Konservierung (Abbildung 3.25). Die Sequenzidentität zwischen bakterieller und Pilz-FAS-I liegt für diese Region unter 30%. Jedoch liegt die Konservierung des Bereichs innerhalb der bakteriellen FAS-I, abgeschätzt durch die Sequenzen aus Abbildung 3.24.B, bei mehr als 50% Sequenzidentität (Tabelle 3.7). Auch die Sekundärstrukturvorhersage zeigt Unterschiede für Pilz-FAS-I und bakterieller FAS-I. Während bei Pilz-FAS-I zwei lange *α*-helikale Bereiche vorliegen, ist in der bakteriellen FAS-I die N-terminale *α*-Helix laut Vorhersage durch eine Insertion in zwei Abschnitte geteilt.

Während in MsFAS die Nabenstruktur durch die Elektronendichte gut definiert ist, zeigen die röntgenkristallographischen Daten der CeFAS in diesem Bereich nur eine geringe Dichte. Auch DM-1 weist Unterschiede zwischen MsFAS und CeFAS auf. In MsFAS ist hier kaum Elektronendichte zu sehen, während in CeFAS ein gut erkennbares *α*-helikales Element vorliegt, das sich von der KR-Domäne in Richtung KR erstreckt. Dieses *α*-helikale Element beginnt etwa bei F1971 und umfasst damit den Bereich der durch Sekundärstrukturvorhersage definiert ist. Trotz der unterschiedlichen Verteilung der Elektronendichte ist den Strukturen von MsFAS und CeFAS gemeinsam, dass DM-1 als nicht-rigides Element die Nabe mit der KR-Domäne verknüpft. Damit weist DM-1 in bakterieller FAS-I deutliche Unterschiede auf zu DM-1 in Pilz-FAS-i (siehe Abbildung 3.26).

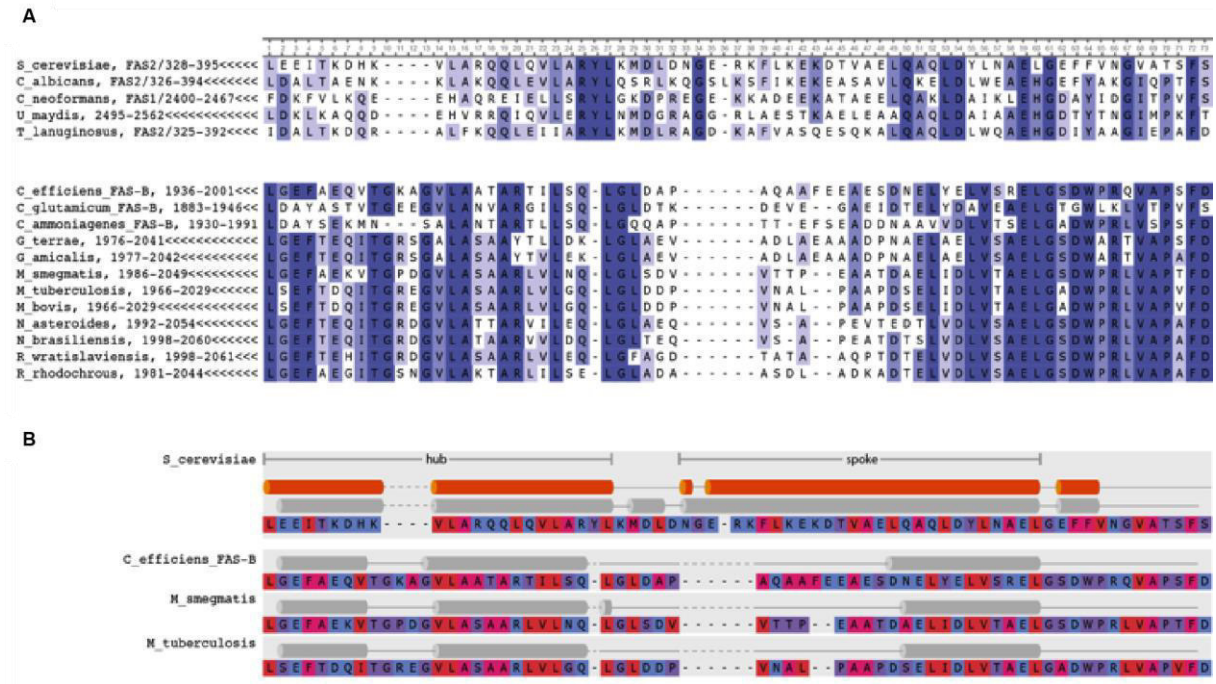



**Abbildung 3.25: Individuelle Sekundärstruktur-Vorhersagen für die DM-1 Region im Zentrum des zentralen-Rades.**

(A) Alignement der bakteriellen und Pilz-FAS-I Sequenzen. Die Bereiche der Aminosäurereste sind angegeben. Sequenzen wurden aligniert und im Anschluss in Untergruppen unterteilt. Die konservierten Bereiche wurden durch verschiedene Farben hervorgehoben. (B) Berechnete und gemessene Sekundärstrukturen einiger FAS-I im selektierten Bereich. Die Vorhersagen der Sekundärstrukturen wurden für jede Sequenzen einzeln durchgeführt (Programm *PSIPRED*). Für ScFAS ist auch die aus den Röntgenstrukturdaten gerechnete Sekundärstruktur angeführt und in orange dargestellt. Die Sequenzen sind im Raster des Alignements dargestellt und entsprechend ihrer Hydrophobizität farblich hinterlegt. Die helikalen Strukturen sind durch Röhren dargestellt und unstrukturierte Bereiche durch Linien.

**Tabelle 3.7: Prozentuale Identitätsmatrix zwischen der bakteriellen und der Pilz-FAS-I im Bereich des DM-1.**

| % Identität der DM-1 | ScFAS | CeFAS | MsFAS | MtFAS |
|---|---|---|---|---|
| ScFAS | - | 25,4 | 29,5 | 27,8 |
| CeFAS | - | - | 63,0 | 60,0 |
| MsFAS | - | - | - | 72,3 |
| MtFAS | - | - | - | - |

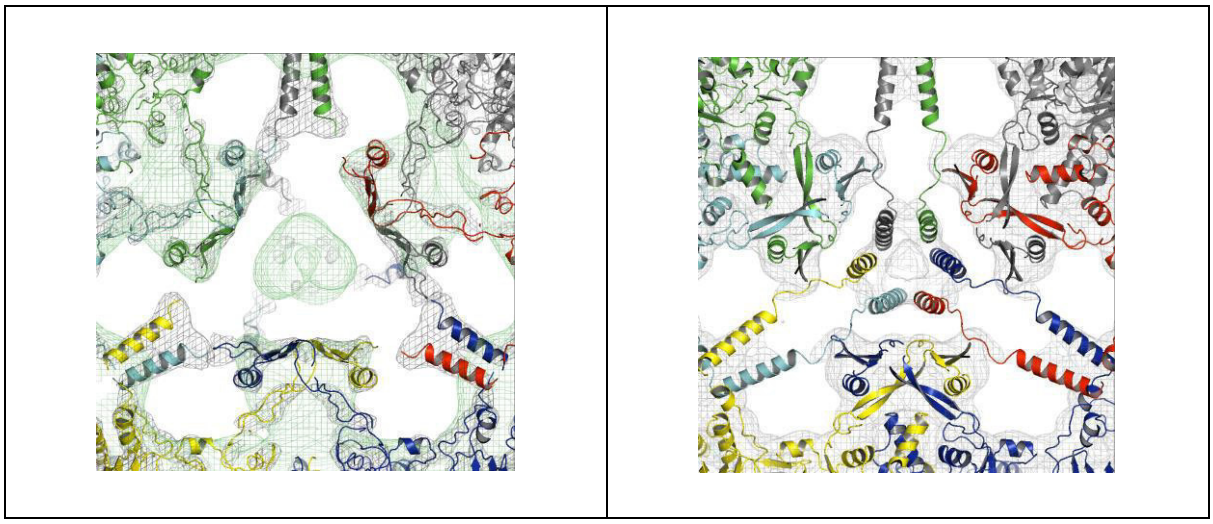


**Abbildung 3.26: Vergleich der zentralen Nabe der bakteriellen FAS-I mit der Pilz-FAS-I.** Blick auf die Nabe in der Röntgenstruktur der CeFAS (links) und ScFAS (rechts). (Links) Röntgenkristallographische Elektronendichte der CeFAS sowie Cryo-EM Elektronendichte der MtFAS sind als Netz dargestellt und hier gefärbt in grau (CeFAS) und grün (MtFAS) gegenübergestellt Eine schwache Elektronendichte erkennt man in der Position der Nabe in der röntgenkristallographischen Omit-Dichte σ von 1.5. Rechte Seite: Elektronendichte der Cryo-EM Struktur der MsFAS, als Netz in grau dargestellt.

### 3.4.6 Beweglichkeit der MAT der CeFAS

Über Cryo-EM konnte für ScFAS (Gipson *et al.*, 2010) und MtFAS (Ciccarelli *et al.*, 2013) bereits eine hohe Beweglichkeit der MPT bzw. MAT Domäne gezeigt werden. Atomare Bewegungen können auch aus kristallographischen Daten anhand von Temperatur-Faktoren (B-Faktoren) abgeleitet werden (Rupp, 2009). Da Atome abhänig von der Temperatur eine Schwingungsbewegung ausführen um ihre Gleichgewichtsposition. Somit treffen Röntgenstrahlen in aufeinanderfolgenden Einheitszellen (siehe Kapitel 1.7) nicht auf die gleichen Atome die an dieser Stelle positioniert sein sollten. Durch diesen Effekt kommt es zu einer Abschwächung den Röntgenstrahles an dieser Stelle.

CeFAS Daten zeigen Durchschnittswerte der B-Faktoren für die MAT-Domäne von 395 $A^2$. Das ist deutlich höher als in der restlichen Struktur in der die

Durchschnittswerte für die B-Faktoren bei 295 Å$^2$ liegen (siehe Abbildung 3.27). Eine erhöhte Flexibilität der MAT der CeFAS, entsprechend der Cryo-EM-Daten der ScFAS und der MtFAS kann daher auch für CeFAS angenommen werden.

In Abbildung 3.28 sind die B-Faktoren der $C_\alpha$-Atome der CeFAS in der *ribbon*-Darstellung für eine Polypeptidkette dargestellt. Die hohen B-Faktoren der MAT-Domäne sind entsprechend reflektiert. Außerdem sind erhöhte B-Faktoren innerhalb der DH- und KR-Domäne zu erkennen (siehe Abbildung 3.28).

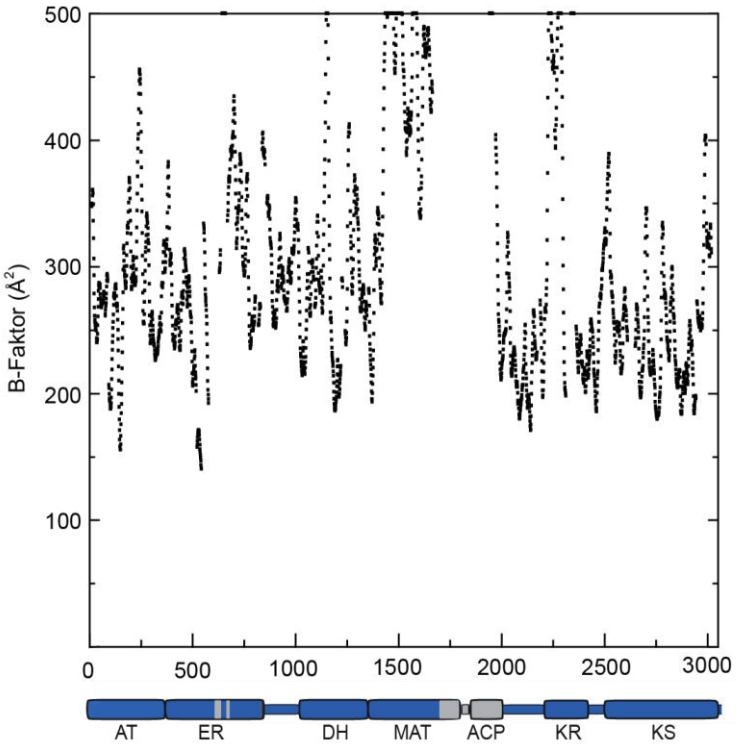



**Abbildung 3.27: B-Faktor Plot der $C_\alpha$-Atome von CeFAS.**
Die B-Faktoren der $C_\alpha$-Atome über eine Polypeptidkette. Die Domänenstruktur ist zur Zuordnung angefügt. Die grau eingefärbten Sequenzabschnitte fehlen im Modell der CeFAS.

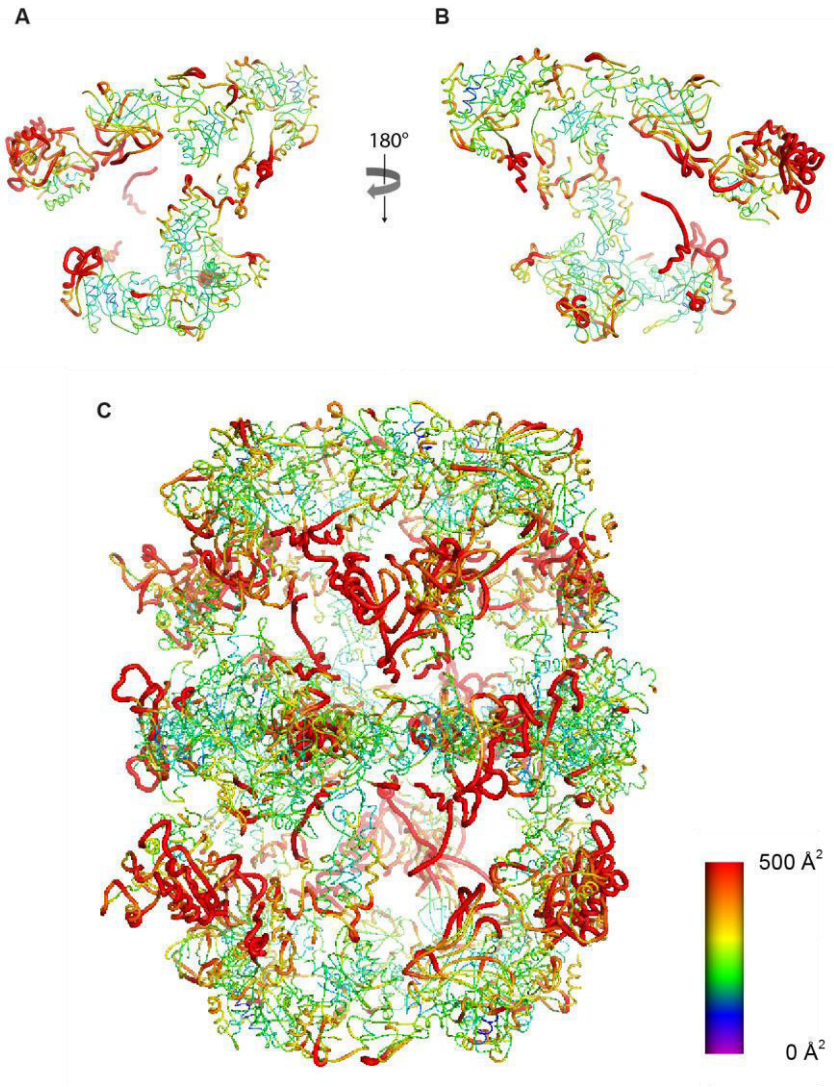



**Abbildung 3.28: B-Faktor der $C_\alpha$-Atome der CeFAS.**
Gezeigt ist eine Polypeptidkette in der Ansicht von außen (A) und von innen (B). Hohe B-Faktoren im Bereich des *β*-Doms stehen niedrigen B-Faktoren im Bereich des zentralen-Rads gegenüber. (C) Hexamere Struktur in B-Faktordarstellung. B-Faktoren sind graphisch dargestellt; blau entspricht einem geringen B-Faktor, bis hin zu rot dies entspricht einem hohen B-Faktors.

### 3.4.8 Unterschiedliche Raumgruppe an drei verschiedenen Stellen eines Kristalles

Die röntgenkristallographische Strukturlösung der CeFAS gestaltete sich durch die geringe Qualität der Kristalle als schwierig. Dies zeigt sich durch geringe Auflösung der Kristalle und durch Fehlordnung im Kristallbau, der die Bearbeitung der Datensätze sehr schwierig gestaltete.

Die Fehlordnung im Kristallbau zeigte sich z. B. in Schwankung der Raumgruppe innerhalb eines Kristalles. Dies ist am Kristall Me47_13 (CaFAS) gezeigt, der an der *beamline* PX-2 (SLS, Villingen) an vier Positionen vermessen wurde. Alle vier Positionen zeigen Unterschiede und ließen sich entsprechend in unterschiedlichen Raumgruppen indizieren. Die Kontrolle des Kristallwachstums erwies sich als Hauptproblem in der Strukturlösung der bakteriellen FAS-I.

<u>Me47_13_left</u>
Raumgruppe: P 2 2 2
Alternative Raumgruppe: P 2 2 21
Einheitszelle: a= 244.09; b= 339.96; c= 586.56; $\alpha$=90.00; $\beta$=90.00; $\gamma$=90.00

<u>Me47_13_middle</u>
Raumgruppe: P 1 2 1
Einheitszelle: a= 247.92; b= 596.36; c= 344.46; $\alpha$=90.00; $\beta$=90.37; $\gamma$=90.00

<u>Me47_13_right</u>
Raumgruppe: P 6 2 2
Einheitszelle: a= 341.46; b= 341.46; c= 246.55; $\alpha$=90.00; $\beta$=90.00; $\gamma$=120.0
Alternative Raumgruppen:
P 61 2 2
P 65 2 2
P 62 2 2
P 64 2 2
P 63 2 2

<u>Me47_13_right_II</u>
Raumgruppe: P 6 2 2
Einheitszelle: a= 342.45; b= 342.45; c= 247.10; $\alpha$=90.00; $\beta$=90.00; $\gamma$=120.00
Alternative Raumgruppen:
P 61 2 2
P 65 2 2
P 62 2 2
P 64 2 2
P 63 2 2

## 3.5 Bildung von Kristallisationskeimen und Nanokristallen der CaFAS

Bedingt durch Schwierigkeiten in der Indizierung der Daten, wurde versucht Information zur Raumgruppe der Kristalle über Cryo-EM-Tomographie an kleinen Kristallen zu gewinnen. Initial war dieser Ansatz gedacht, um abzuschätzen wie sich Proteinkristalle zur Vermessung in der Cryo-EM-Tomographie eignen. Es sei an dieser Stelle angemerkt, dass die bakterielle FAS-I durch ihre Dimension und die gut erkennbare Symmetrie für einen solchen Ansatz sehr geeignet ist (vgl. Abbildung 3.23). Zur Präparation der EM-Grids wurden hanging-drop Kristallisationsansätze (Bedingung 1 (0,1 M MIB-Puffer pH 7,0 und 25% PEG 1500) und Bedingung 2 (0,2 M NaMalonat; 0,1 M Bis-Tris-Propan pH 7,2; 20% PEG 6000 und 3% PGA-LM)) der CaFAS nach zwei Tagen geöffnet. So kommt es zu einem frühen Abbruch des Kristallisationsprozesses und die Bildung von Kristallisationskeimen kann untersucht werden.

Eine zu geringe Dichte an Goldpartikel auf dem Träger führte dazu, dass keine Tomographie unter Bedingung 1 durchgeführt werden konnte. So wurde das Hauptaugenmerk auf die Auswertung der Cryo-EM-Grids in fixierter Anordnung gelegt. Beim Betrachten der EM-Aufnahmen ist es möglich einzelne Partikel von monomerer bis oligomerer regelmäßigen (hexagonaler) Anlagerung zu erkennen (siehe Abbildung 3.28.2 und 3.28.3). Hexagonale Anordnung (2-D Raumgruppe P6) mit einem zentralen und sechs umgebenden Proteinen sind gut zu erkennen (siehe Abbildung 3.28.2). Die hexagonale Anlagerung der in D3-Symmetrie aufgebauten Partikeln repräsentiert die kleinste reguläre Einheit des hexagonalen Proteinkristalles.

Neben den hexagonalen Anordnungen wurden weitere reguläre Muster beobachtet, die als regelmäßige Anordnung von hellen Punkten mit dunkler Umrandung beschrieben werden können (siehe Abbildung 3.28). Die Auswertung dieses Musters ist noch nicht abgeschlossen und bedarf weiterer Verfeinerung und Validierung. Es konnte jedoch ein vorläufiges Modell für eine mögliche Organisation von Partikeln im Kristall berechnet werden. In diesem Modell sind hexagonal angeordnete Monolagen der FAS überlagert (siehe Abbildung 3.29). Während die 2-D Anordnungen laterales Kristallwachstum darstellen, zeigen die 3-D Anordnungen normales Wachstum; also ausgehend von Monoschichten Wachstum in die 3. Dimension. Damit lässt sich annehmen, dass die Cryo-EM Aufnahmen Kristallkeimung zu unterschiedlichen

Zeitpunkten (zuerst Ausbildung von Monolagen und dann Wachstum in 3. Dimension) zeigen. Die so entstandenen Aufnahmen sind die ersten hochaufgelösten Bilder zur Beschreibung des Kristallisationsprozesses von Makromolekülen (McPherson *et al.,* 2000; García-Ruiz, 2003).

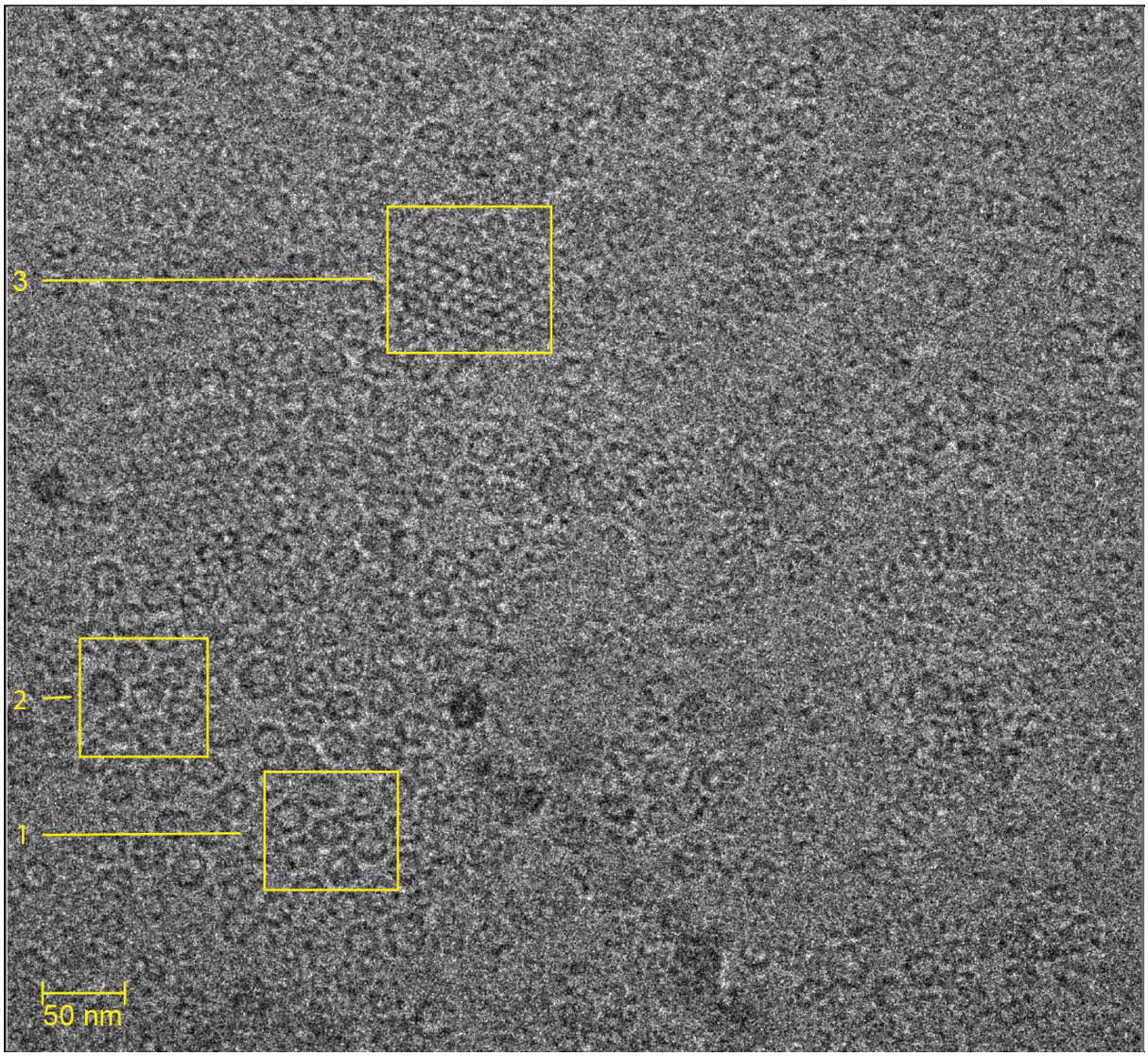



**Abbildung 3.29: Cryo-EM Aufnahme der Kristallkeimbildung.**
Zu sehen sind Partikel in unterschiedlicher Anordnung (Bedingung 1). (1 und 2) Hexagonale Anordnung der FAS-I Partikel, mit einem zentralen Partikel und sechs Satellitenkomplexen. (3) Kristallwachstum in die dritte Ebene. Aufnahmen wurden mit einer 4096 x 4096 slow-scan CCD-Kamera mit *underfocus* $\Delta z$ = 3 µm, einer Vergrößerung von 38 k (Pixelgröße 2.78 A/p) und einer Elektronendosis von 20 e-/Å$^2$ aufgenommen.

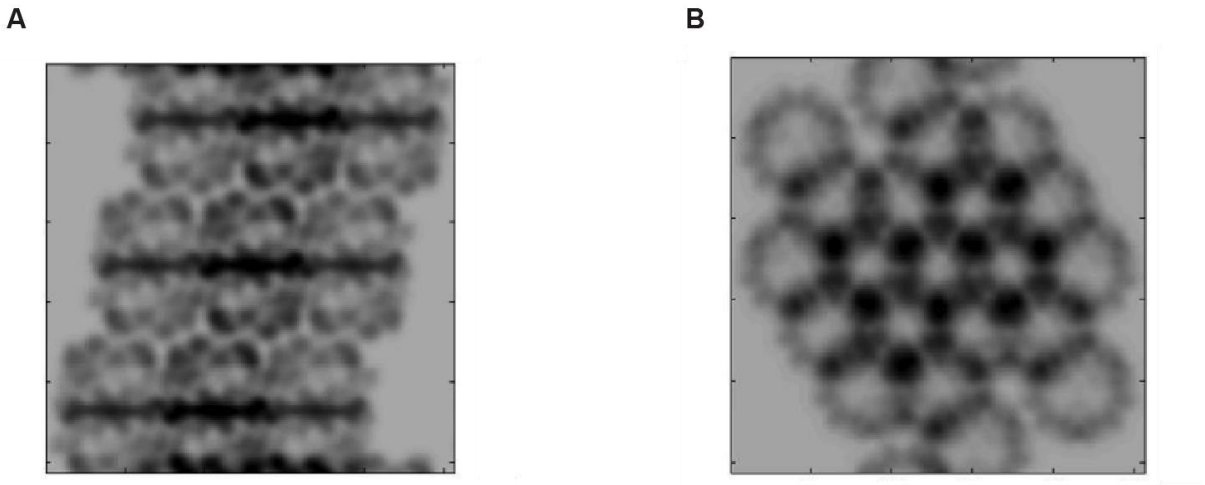



**Abbildung 3.30: Modellbildung zur Anordnung von bakteriellen FAS-I Molekülen in Kristallen.** Die Modelle wurden mit einem pdb-Modell der bakteriellen FAS-I erstellt. Drei Monolagen von Partikeln sind gestapelt und in der Ansicht von oben (A) und von der Seite (B) gezeigt. Wie in (B) gezeigt, wird in dieser Anordnung ein Muster erhalten, welches dem Muster auf den EM-Grids entspricht.

In Abbildung 3.31 ist eine tetragonale Anordnung (2-D Raumgruppe P4) zu erkennen (siehe Abbildung 3.31). Hier haben die einzelnen Partikel deutlich weniger Kontaktfläche und interagieren mit lediglich vier benachbarten Molekülen.

Durch die unzureichende Anzahl an Goldpartikeln kann die Untersuchung der Kristallkeimbildung hier (Bedingung 1) nicht mit CET durchgeführt werden. Jedoch konnten durch eine hohe Dosis pro Fläche sehr gut aufgelöste Aufnahmen der Kristallkeimbildung und dem Wachstum in die dritte Dimension erzielt werden.

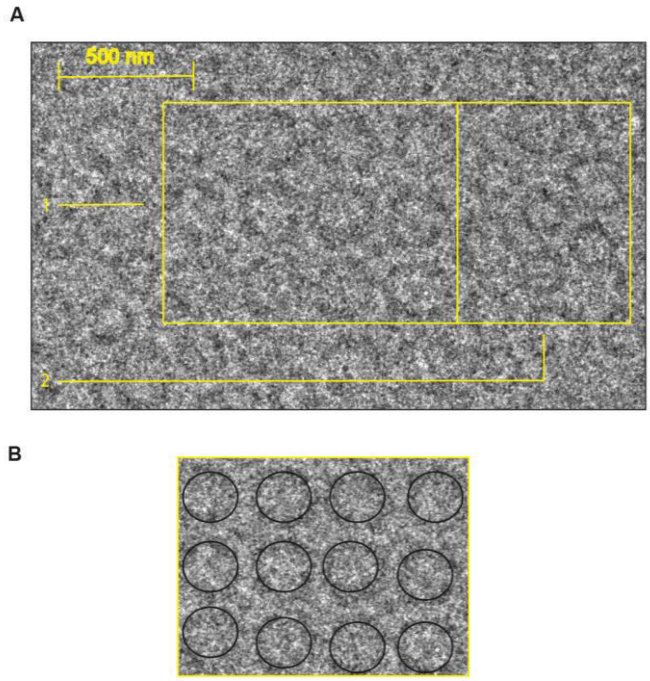



**Abbildung 3.31: Cryo-EM-Aufnahme mit unterschiedlicher Anordnung der Partikel.**
(A) Anordnungen von FAS-I Molekülen in P4 (1) und P6 (2). (B) Ausschnitt aus Abbildung A (Segment 1) und Hervorhebung des tetragonalen Musters durch die Überlagerung mit Kreisen.

# 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die erste dreidimensionale röntgenkristallographische Charakterisierung der bakteriellen FAS-I aus *C. efficiens* präsentiert. Zudem konnten die dynamischen Eigenschaften der bakteriellen FAS-I, insbesondere die Flexibilität der MAT, durch die Untersuchung mittels Röntgenkristallographie, Cryo-EM, Cryo-EM-Tomographie (CET) gezeigt werden.

Im Gegensatz zur Pilz-FAS-I, war zur Kristallisierbarkeit der bakteriellen FAS-I in der Literatur bis dato nichts bekannt. Aufgrund der besonderen medizinischen Bedeutung war das primäre Ziel der Arbeit die Charakterisierung der FAS-I aus *M. tuberculosis* der MtFAS.

Die *negative-stain*-EM Aufnahmen der FAS-I aus *C. ammoniagenes* der CaFAS zusammen mit Arbeiten der Gruppe um Prof. Schweizer in den späten Neunzigern (Meurer *et al.,* 1996; Stuible *et al.,* 1996; Stuible *et al.,* 1997-A; Stuible *et al.,* 1997-B) zeichnen die CaFAS als ein ideales Referenzenzym für MtFAS aus. Des weiteren wurde die FAS-I aus *C. efficiens,* die CeFAS, als zweites Referenzenzym gewählt, zum einen aufgrund der thermotoleranten Eigenschaften von *C. efficiens* (Fudou *et al.,* 2002; Nishio *et al.,* 2003) und zum anderen aufgrund der hohen Sequenzhomologie von 52% zur MtFAS (Boehringer *et al.,* 2013; Enderle *et al.,* 2015).

Die MtFAS wurde strukturell durch Cryo-EM mit einer Auflösung von 17,5 Å und 27 Å (Ciccarelli *et al.,* 2013) bearbeitet. Diese Arbeit zeichnet sich besonders dadurch aus, dass sie die dynamischen Eigenschaften des Enzyms hervorhebt. Hochinteressant war in diesem Zusammenhang, dass MtFAS nicht mit einer D3-Symmetrie rekonstruiert werden konnte. Die Reduktion der Symmetrie ist der hohen Flexibilität des Proteins geschuldet. Als besonders ausgeprägt hat sich die positionelle Variabilität der MAT-Domäne gezeigt. In Rekonstruktionen der MtFAS konnte MAT in drei verschiedenen Konformationen mit drei unterschiedlichen Interaktionsflächen zu benachbarten Domänen gezeigt werden (siehe Abbildung 3.15). Zur Charakterisierung der MtFAS und ihrer positionellen Variabilität wurde in dieser Arbeit maßgeblich beigetragen (Ciccarelli *et al*., 2013).

Die hohe konformationelle Dynamik der bakteriellen FAS-I konnte in dieser Arbeit auch durch Cryo-EM-Tomographie (CET) am Beispiel der CaFAS gezeigt werden.

Wie in Einzelmolekül-Cryo-EM-Messungen an MtFAS, zeigt sich auch in CET eine Asymmetrie der Reaktionskammern, die durch Auslenken einer AT-Domäne entsteht. Die strukturellen Daten an MtFAS und CaFAS legen nahe, bzw. implizieren, dass die konformationelle Variabilität eine generelle Eigenschaft der bakteriellen FAS-I ist.

Als wichtigster Beitrag der vorliegenden Arbeit zur strukturellen Untersuchung der bakteriellen FAS-I zählt die röntgenkristallographische Strukturlösung der CeFAS mit einer Auflösung von 7,5 Å. Insgesamt konnten 2423 von 3022 Aminosäuren, was insgesamt 80% aller Aminosäuren einer Polypeptidkette des Hexamers entspricht, in die Elektronendichte der CeFAS plaziert werden. Dieses Struktur ist eingereicht (pdb: 4x3d) mit finalenl R-Faktoren $R_{work}$ 0,27 und $R_{free}$ 0,32. Die schon erwähnten strukturellen Eigenschaften der bakteriellen FAS-I zusammen mit der hohen konformationellen Dynamik und der hohen Flexibilität einzelner Domänen bedingen die moderate Auflösung bei diesem herausfordernden Kristallisationsprojekt. Neben weiteren Einblicken in diese Proteinklasse konnte auch die dynamische Konformation, speziell durch die erhöhten B-Faktoren, als inhärente Eigenschaft der bakteriellen FAS-I bestätigt werden.

Auch konnte in dieser Arbeit die MtFAS, CaFAS und CeFAS biophysikalisch charkterisiert und ihre Präparation optimiert werden.

## 4.1 Pilz- und bakterielle FAS-I sind verwandte Proteine

Noch bevor Strukturdaten zur bakteriellen FAS-I erhältlich waren, konnte aus den Sequenzvergleichen eine strukturelle Ähnlichkeit mit Pilz-FAS-I antizipiert werden. In beiden Systemen ist die Anordnung der vorhandenen katalytischen Domänen gleich mit Ausnahme von AcpS (bei Eukaryoten PPT), das außerhalb des Leserahmens der bakteriellen FAS-I liegt. Zudem besteht eine hohe Konservierung in Strukturelementen, die für den charakteristischen Aufbau der Architektur nötig sind (Grininger, 2014). Die in diesem Projekt vorgestellte MtFAS, CaFAS und CeFAS unterstreichen die ähnliche Architektur der beiden FAS-I-Systeme aus Eukaryoten und Prokaryoten und konnten einen detaillierteren Einblick in die strukturellen Unterschiede geben.

Die erwähnte Homologie im Aufbau deutet auf eine evolutionäre Verwandtschaft beider Systeme hin (siehe Abbildung 4.1). Eine Hypothese in diesem Zusammenhang zielt auf einen frühen horizontalen Gentransfer von Pilzen ab (Grininger, 2014). Im Gegensatz dazu wird das bakterielle FAS-I Gen nicht als Ergebnis eines Transfers gesehen (Becq *et al.,* 2007; Gamieldien *et al.,* 2002). Wahrscheinlicher in diesem Zusammenhang ist, dass die prokaryotische FAS-I die Matrize für den strukturellen Rahmen der Pilz-FAS-I lieferte.

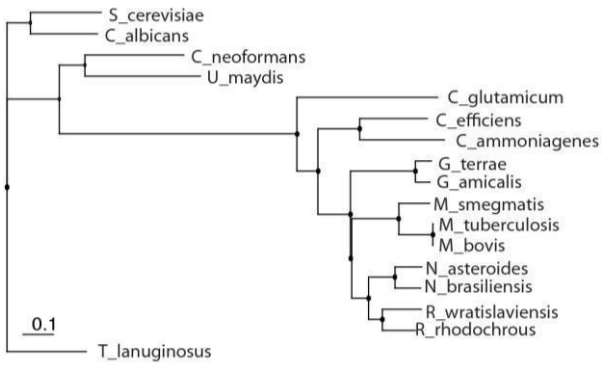



**Abbildung 4.1: Phylogenetische Analyse ausgewählter Pilz- und bakterieller FAS-I-Systeme.** Für die Berechnung des phylogenetischen Baumes wurden die beiden Pilz-FAS-I Ketten als eine *β*-/*α*-pseudo-single-Kette verwendet. Für die Analyse wurde die FAS-I GenBank-Nummer wie folgt genutzt: *Candida albicans* (X74952.1, L29063.1), *Saccharomyces cerevisiae* (CAA82025.1, CAA97948.1), *Cryptococcus neoformans* (XP_571100.1, XP_571099.1), *Ustilago maydis* (XP_759118.1), *Corynebacterium glutamicum* (YP_225128), *C. efficiens* (NP_739002.1), *C. ammoniagenes* (CAA46024.1), *Gordonia terrae* (WP_004019558.1), *Gordonia amicalis* (WP_024498183.1), *M. smegmatis* (AAO43178.1), *M. tuberculosis* (NP_217040), *M. bovis* (NP_856198.1), *Nocardia asteroids* (WP_019045581.1), *Nocardia brasiliensis* (GAJ86521.1), *Rhodococcus wratislaviensis* (GAF47416.1), *Rhodococcus rhodochrous* (ETT26757.1). Die Analyse wurde mit einem *neighbor-joining-algorithm* mit der Jones-Taylor-Thornton Substitution ausgeführt. Für die Modellerstellung wurde das Ugene Software-Paket verwendet. Abbildung aus (Enderle *et al.*, 2015).

Die Arbeit von Bukhari *et al.* zeigt eindeutig die Evolution von einem Einzelprotein zur bakteriellen FAS-I und schlussendlich zur Pilz-FAS-I (Bukhari *et al.,* 2014). Ausgehend von einzelnen Proteinen des FAS-II-Systems wurden zunächst strukturelle Elemente eingefügt, welche spezifische Eigenschaften der separaten Proteine, wie Oligomerisierung oder Interaktion mit anderen Proteinen verbessern. Über Genfusion hat sich das Multienzymsystem der bakteriellen FAS-I entwickelt. Die bakterielle FAS-I blieb, evolutionär betrachtet, im Vergleich zur Pilz-FAS-I in dieser frühen Form konserviert (siehe Abbildung 5.1). Bei der Pilz-FAS-I kam es zu zusätzlichem Einbau von strukturellen Elementen. Oft liegt ein Set an katalytischen Domänen verteilt auf zwei Polypeptidketten vor (siehe Abbildung 4.2). Des weiteren

ist eine große Diversität in der Platzierung des Kettenabbruchs zu erkennen und es tritt Diversität durch teilweise Duplizierung des ACP ein (siehe Abbildung 4.4). Letztere Veränderungen sind als evolutionär spät anzusehen.

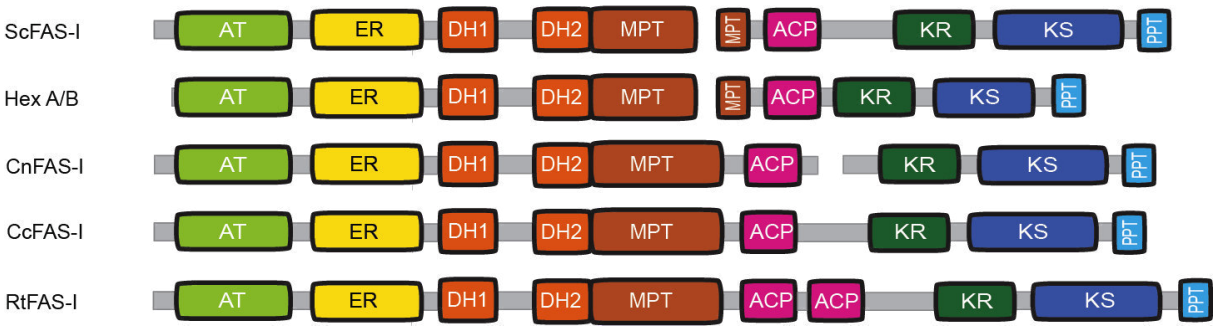



**Abbildung 4.2: Unterschiede bei Pilz-FAS-I-Systeme.**
Zwischen den Organismen der Pilz-FAS-I gibt es Unterschiede in der Aufteilung der Domänen auf *α*- und *β*-Kette und in der Anzahl an vorhandenen ACP Domänen. Gezeigt sind Sequenzen von ScFAS-I (*Saccharomyces cerevisiae* FAS-I); *Aspergillus parasiticus* Hex A/B; CnFAS-I (*Cryptococcus neoformans* FAS-I); CcFAS-I (*Coprinopsis cinerea* FAS-I) und RtFAS-I (*Rhodosporidium toruloides* FAS-I).

## 4.2 Proteinpräparation, Charakterisierung, biophysikalische Untersuchung

Für eine strukturelle Untersuchung von Proteinproben benötigt man einen einfachen Zugang, eine hohe Reinheit sowie eine ausreichende Stabilität des Zielproteins über den gesamten Zeitraum des Experiments.

Die rekombinante Herstellung und erste Reinigungserfolge der CaFAS konnten bereits in (Enderle, 2010) gezeigt werden. Während der Zeit dieser Arbeit durchlief die Herstellung der Wildtyp-FAS-I-Systeme MtFAS, CaFAS und CeFAS weitere Optimierungsschritte hinsichtlich der Reinigung und Stabilität der Proteine. Nach den optimierten Protokollen konnten CaFAS und CeFAS als Hexamer und nahezu aggregationsfrei gereinigt werden (siehe Abbildung 3.1.D), hierzu brauchte es die Optimierung hinsichtlich des Puffersystems und des pH-Wertes. Eine mit CaFAS oder CeFAS vergleichbare Optimierung der MtFAS war nur eingeschränkt möglich; sie lag als leicht aggregiertes Protein sowie als ein Gemisch aus Hexamer und Dimer vor (Kikuchi *et al.,* 1992; Ciccarelli *et al.,* 2013; Enderle *et al.,* 2015). Zu Beginn des Projektes wurde mit MtFAS und CaFAS analytische Ultrazentrifugation (AUZ)

durchgeführt (siehe Abbildung 3.3), um die Fraktionen der Größenausschlusschromatographie (*Size-Exclusion-Chromatography*; SEC) entsprechend zuordnen zu können. Die Pufferbedingungen waren jedoch zu diesem Zeitpunkt noch nicht ausgereift. Dementsprechend fällt auf, dass die MtFAS als Monomer und Dimer, hingegen die CaFAS als Monomer und Hexamer vorliegt (siehe Abbildung 3.1.D und 3.2). Da bei der MtFAS kein Hexamer zu sehen war, kann davon ausgegangen werden, dass es über den Zeitraum des Experimentes nicht stabil war, oder durch den Zentrifugationsprozess in Dimer oder Monomer zerfallen ist. Das Hexamer der CaFAS konnte für die Interpretation der SEC genutzt werden. Aufnahmen von UV/Vis-Spektren im langwelligen Bereich zeigten für alle drei Wildtyp-FAS-I-Systeme die charakteristische Absorption von Flavin (siehe Abbildung 3.1.B) und bestätigen somit die Bindung des Co-Faktors FMN an ER. Dies lässt darauf schließen, dass bei allen drei Systemen ER korrekt gefaltet vorliegt.

Schmelzkurven wurden bei 222 nm CD-spektroskopisch verfolgt und weisen einen nahezu identischen Kurvenverlauf der drei Wildtyp-FAS-I-Systeme bis 32°C auf (siehe Abbildung 3.4.A). MtFAS weist einen geringeren kooperativen Kurvenverlauf auf. Das Protein entfaltet sich in gewissen Bereichen früher als CaFAS und CeFAS. Jedoch schmelzen alle drei FAS-I-Systeme bei einem ähnlichen Schmelzpunkt.

Die Thermofluor-Methode eignet sich hervorragend zur Überprüfung von verschiedenen Pufferzusammensetzungen oder zur Untersuchung des Einflusses von Additiven oder Detergenzien auf das Protein (Ericsson *et al.,* 2008; Reinhard *et al.,* 2012). Wie in dieser Arbeit gezeigt, stimmen die Thermofluor-Ergebnisse sehr gut mit den Ergebnissen der CD-Spektroskopie (Schmelzpunkte) überein. Somit konnte die Thermofluor-Versuchsanordnung auch zur Überprüfung neuer Konstrukte und Pufferbindungen verwendet werden. Die Pufferbedingung 13 ($KP_i$ pH 7,0) die für alle drei Wildtyp-FAS-I-Systeme die höchste Schmelztemperatur zeigt (siehe Abbildung 3.5), erwies sich als nicht geeignet für Kristallisationsexperimente. Zu Beginn der Arbeit wurde auch *negative-stain*-EM zur Beurteilung der Proteinqualität verwendet und somit konnte die Oligomerisierung der CaFAS und Homogenität der Assemblierungen beurteilt werden. Bei der CaFAS (siehe Abbildung 3.8) und MtFAS (siehe Abbildung 3.11) sind Hexamere sowie eine geringer Neigung zur Aggregation zu erkennen.

Neben der Analyse der Proteine in biophysikalische Eigenschaften wurden in dieser Arbeit auch funktionelle Eigenschaften zur Qualitätskontrolle herangezogen. Das

wichtigste Merkmal bildete die Fettsäuresynthese-Aktivität. Die gemessenen Aktivitäten der CaFAS und CeFAS lagen im Bereich der bekannten Werte (Stuible *et al.,* 1997-A) für bakterielle FAS-I aus nativer Präparation und deuten darauf hin, dass alle katalytischen Zentren der CaFAS und CeFAS korrekt gefaltet vorliegen und, dass die posttranslationale Modifikation von ACP für beide Enzyme stattfindet (siehe Abbildung 3.5). Es wurden für CaFAS und CeFAS $C_{16}$- und $C_{18}$-CoA-Ester als Hauptprodukt gemessen. Auch diese Produktverteilung entspricht publizierten Werten (Stuible *et al.,* 1997-A). Lediglich die Produktverteilung der beiden Spezies ist bei CaFAS und CeFAS unterschiedlich. Das Produktspektrum von FAS-I ist abhängig von den eingesetzten relativen Konzentrationen von AcCoA und MaCoA. Daher kann das unterschiedliche Produktspektrum von CaFAS und CeFAS neben enzymspezifischen Gründen auch durch eine unterschiedliche Reinheit der verschiedenen Chargen von Acetyl-CoA und Malonyl-CoA bedingt sein, die für entsprechende Experimente verwendet wurden.

## 4.3 Proteinengineering zur Optimierung der Kristallisierbarkeit

Die biophysikalische Charakterisierung und die zu einem späteren Zeitpunkt des Projektes durchgeführten Cryo-EM-Messungen zeigten eine Instabilität des Proteins, die aus der konformationellen Dynamik resultiert. Daher wurde versucht, das bakterielle Protein durch den Einbau von strukturellen Elementen zu stabilisieren. Als geeignetes Element wurde die N-terminale Trimerisierungsdomäne (TM) der *β*-Kette der Pilz-FAS-I identifiziert, welche die Kappen ihrer Reaktionskammer durch Interaktion an der dreizähligen Achse schließt (siehe Abbildung 3.24). Um eine höhere Stabilität in der Kristallisation der bakteriellen FAS-I zu erreichen, wurden diese N-terminalen TM-Enden in der CaFAS an gleicher Stelle eingeführt. Durch Überlagerung von Proteinsequenzen sowie gestützt durch 3D Informationen wurde die Klonierungsstrategie für die Einführung dieser Domäne aus Pilz-FAS-I Systemen TlFAS (Jenni *et al.,* 2007) und ScFAS (Leibundgut *et al.,* 2007; Lomakin *et al.,* 2007; Johansson *et al.,* 2008) entworfen. Beide resultierenden Konstrukte, TriT-CaFAS und TriS-CaFAS, wiesen ein hohes Aggregationspotential in der SEC auf (siehe Abbildung 3.1.E). Auf aggregiertes bzw. fehlgefaltetes Protein lässt sich auch aus *negative-stain*-EM Aufnahmen schließen (siehe Abbildung 3.10). Zudem ist bei

diesen Aufnahmen keine Verknüpfung an der dreizähligen Achse durch die TM erkennbar. Auch der frühe Anstieg des CD-Signals in Schmelzkurven dokumentiert eine geringere Stabilität der Proteine (siehe Abbildung 3.4.A und 3.4.B). Somit kann aus den thermischen Stabilitäten sowie den elektronenmikroskopischen Aufnahmen abgeleitet werden, dass die Fusion der N-terminalen TM keinen stabilisierenden Effekt auf CaFAS hatte; vermutlich da die TM keine stabilen Interaktionen eingehen. Am Konstrukt der CeFAS wurden durch zwei Punktmutationen am ACP die Serinreste S1778 und S1779 jeweils zu Alanin verändert. Dies sollte eine eventuelle posttranslational Modifikation durch *E. coli* eigenes AcpS ausschließen und die Herstellung von homogenen Präparationen an nicht posttranslational modifiziertem Protein erlauben. Kristalle dieses Konstrukts lieferten die Daten, welche schließlich zur Strukturlösung verwendet werden konnten.

## 4.4 Strukturlösung der bakteriellen FAS-I in drei verschiedenen Teilprojekten

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die medizinisch hochrelevante MtFAS und parallel als Referenzenzym, die bereits strukturell und funktionell untersuchte CaFAS (Morishima *et al.*, 1982; Stuible *et al.,* 1997-A; Ciccarelli *et al.,* 2013), bearbeitet. Wie bereits dargelegt, gestaltete sich die Kristallisation der MtFAS als schwierig; so konnte über die komplette Arbeit nur ein vollständiger Datensatz eines MtFAS Kristalls am Synchrotron gemessen werden (siehe Tabelle 3.1). Die Struktur der MtFAS wurde in einer seit Jahren erfolgreichen Kollaboration (Anselmi *et al.*, 2010; Gibson *et al.,* 2010; Ciccarelli *et al.,* 2013) mit der Abteilung Strukturbiologie (MPI für Biophysik, Prof. Kühlbrandt) durch Cryo-EM gelöst.

Die Arbeit an CaFAS führte schnell zu ersten Kristallisationserfolgen, jedoch gestaltete sich die Bearbeitung der gesammelten kristallographischen Daten aufgrund von Kristallfehlbau und schlechter Auflösung in der Anfangsphase als schwierig. In einer Kollaboration mit der Abteilung Molekulare Strukturbiologie (MPI für Biochemie, Prof. Baumeister) wurden Kristallisationstropfen der CaFAS mit Cryo-EM und CET vermessen. Neben der Beobachtung der Kristallkeimbildung konnten in dem Versuch zudem zwei Elektronendichten der CaFAS mit CET berechnet werden. Eine Publikation dieser Daten ist in Vorbereitung.

Zu einem späteren Zeitpunkt in der Arbeit wurde die Kristallisation der bakteriellen FAS-I auch mit der FAS-I aus dem thermotoleranten Organismus *C. efficiens* vorgenommen. Mit diesem Konstrukt wurde letztlich eine höhere Auflösung erzielt und ein Datensatz konnte gesammelt werden, der bei moderater Auflösung keinen Fehlbau zeigte. Dieser Datensatz (Datensatz $A_1$, siehe Tabelle 3.1) konnte zur Strukturlösung der CeFAS mittels Röntgenkristallographie durch MR verwendet werden. Als Suchmodell diente die Cryo-EM-Struktur der MsFAS (pdb: 3zen) (Boehringer *et al.,* 2013) (siehe Kapitel 3.4).

## 4.5 Röntgenkristallographische Strukturlösung und strukturelle Analyse

### 4.5.1 Kristallisation der bakteriellen FAS-I

Die Kristallisation von Makromolekülen ist aufgrund der schwachen Interaktionen zwischen den Molekülen und der vergleichsweise hohen Dynamik globulärer Folds nicht trivial (Rupp, 2009). Zudem sind Proteine durch ihre biologische Funktion und den Freiheitsgraden des $C_\alpha$-Rückgrades, wie auch ihrer Seitenketten flexibel (Marsh & Teichmann, 2013). Bei Proteinkomplexen steigern sich diese der Kristallisation widersetzenden Effekte weiter. Intermolekulare Kontakte nehmen proportional zum Molekulargewicht des Proteins oder Komplexes ab und ihre Untereinheiten verhalten sich in der Dynamik im Vergleich zu Einzelproteinen wie starre Körper (Friedman & Beychok, 1979; Levy *et al.,* 2008; Marsh & Teichmann, 2014).

Auch nach erfolgreicher Kristallisation von Komplexen besitzen Kristalle mit hoher Wahrscheinlichkeit eine innere Unordnung und zudem Fehler beim Aufbau des Kristallgitters, die teilweise die Strukturlösung unmöglich machen. Kristalle mit einer großen Einheitszelle, den Bausteinen eines Kristalls, streuen zudem schwächer, da sie mit weniger Einheitszellen pro Kristallvolumen aufgebaut sind (Leibundgut *et al.,* 2007).

Bei der strukturellen Bearbeitung der MtFAS mit Cryo-EM (siehe Kapitel 3.4) (Ciccarelli *et al.,* 2013) konnte die Flexibilität der bakteriellen FAS-I zum ersten Mal gezeigt und die damit verbundene außergewöhnliche Schwierigkeit der Kristallisation dieses Enzymes veranschaulicht werden.

Eine Kristallisation kann nur dann erfolgreich sein, wenn die Kristallisationsbedingungen zum kontrollierten Abscheiden einer Konformation des Proteins führen und es zu einem geordneten Wachstum eines periodischen Proteinkristalles kommt. CaFAS und CeFAS zeigten schnell Kristallisationserfolge, jedoch waren erste Datensätze durch geringe Streuung bei Diffraktionsexperimenten an Synchrotron-*beamlines* und eingeschränkte Kristallqualität beeinträchtigend.
Schlussendlich konnte nur der Datensatz $A_1$ (siehe Tabelle 3.1) der CeFAS zur Strukturlösung verwendet werden. Dieser zeigte eine akzeptable Auflösung für eine röntgenkristallographische Strukturlösung mit moderater Mosaizität und keinen Kristallfehlbau. Der Datensatz $A_2$ der CeFAS (siehe Tabelle 3.1) mit einer höheren Auflösung im Vergleich zum Datensatz $A_1$, konnte wegen Kristallfehlbaus für die Strukturlösung nicht verwendet werden. Es konnte keine korrekte für *molecular replacement* (MR) gefunden werden.
Die Schwierigkeit in der Bearbeitung der bakteriellen FAS-I zeigte sich bei Betrachtung des inhomogenen Kristallisationsverhaltens der CaFAS (siehe Abbildung 3.18). Es sind verschiedene Anordnungen von Komplexen im Anfangsstadium der Kristallisation ersichtlich. Diese Aufnahmen sind wertvoll, da sie durch Abbildung von individuellen Partikeln eine Verteilung der strukturellen Eigenschaften zeigen. Es zeigen sich hexamere Strukturen mit teils großen Unterschieden in den Öffnungen der Kappen.
Probleme im Kristallbau, die aufgrund der Komplexität (Größe und Dynamik) der Proteine auftraten, zeigen sich auch in integrierten Datensätzen eines einzelnen Proteinkristalls (siehe Kapitel 3.4.8). Vier Datensätze, gesammelt an vier Positionen des Kristalls, weisen Unterschiede in Raumgruppen und Zellparametern auf. Trotz der Probleme konnten niedrig aufgelöste Daten erhalten werden. Nach der Kristallstruktur der Säuger-FAS und der Pilz-FAS-I konnte somit erstmals die Kristallisierbarkeit der bakteriellen FAS-I gezeigt werden. Auf der Suche nach Kristallisationsbedingungen für Multienzymkomplexe greift man auf die bereits für kleinere Moleküle etablierten Techniken zurück, die allerdings für Komplexe weit mehr extensive Optimierung benötigen (Mueller *et al.,* 2007).

### 4.6.2 Strukturlösung der CeFAS mittels Röntgenkristallographie

Die Integration des Datensatzes $A_1$ ergab eine hexagonale Raumgruppe $H_{32}$ mit einer Polypeptidkette in der asymmetrischen Einheitszelle (siehe Abbildung 3.22). Dies steht im Gegensatz zu den vier publizierten Pilz-FAS-I Modellen

(pdb: 2cdh, Jenni *et al.,* 2006); (pdb: 2uv9; 2uva; 2uvb; 2uvc, Jenni *et al.,* 2007); (pdb: 2uv8, Leibundgut *et al.,* 2007); (pdb: 2pff, Lomakin *et al.,* 2007); (pdb: 3hmj, Johansson *et al.,* 2008). Die Pilz-FAS-I kristallisiert in einer tetragonalen Raumgruppe. Die asymmetrische Einheitszelle besteht aus je sechs (3*α* und 3*β*) Polypeptidketten, die so eine Hälfte des Komplexes bilden.

Das Kristallwachstum aller bakteriellen FAS-I-System wurde bei 4°C (Leibundgut *et al.,* 2007, Johansson *et al.,* 2008) durchgeführt. 3D-Kristalle wurden mit einer Nylonschlaufe geerntet und mit einem Gefrierschutz, der 20% Ethylenglykol enthielt versetzt, um sie in flüssigem Stickstoff lagern und transportieren zu können. Alle erfolgreichen Kristallmessungen der bakteriellen FAS-I wurden mit der Tieftemperatur-Methode am European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Frankreich) durchgeführt. Die Messung der relevanten Daten der CeFAS Datensätze $A_1$ und $A_2$ (siehe Tabelle 3.1) erfolgte an der *beamline* ID14-4 (ESRF, Frankreich). Die gesammelten Daten wurden mit dem Programm iMosflm (Battye *et al.,* 2011) integriert und im Anschluss mit Aimless (Blessing *et al.,* 1995) und Scala (Evans, 2005) skaliert.

Das Phasenproblem der CeFAS wurde mittels *Molecular Replacement* (MR) mit der MsFAS (pdb: 3zen) (Boehringer *et al.,* 2013) als Suchmodell gelöst. MR erfolgte unter Verwendung des Programms Molrep (Vagin & Teplyakov, 1997). Die Lösung von Molrep wurde mit dem Programm Phaser (McCoy *et al.,* 2007) überprüft. Nach einer Mutation der Primärsequenz der MsFAS zu CeFAS mit Sculptor (Bunkóczi & Read, 2011) wurden die initialen Strukturdaten mit Refmac5 verfeinert (Murshudov *et al.,* 2011). Nach der *rigid-body*-Verfeinerung wurde begonnen das Modell schrittweise zu verfeinern; z. B. mit TLS-Verfeinerungen. Während des gesamten Verfeinerungsprozesses wurde das Modell in Coot (Emsley & Cowtan, 2004) ausgewertet und gebaut. Das verfeinerte Modell besteht am Abschluss des Verfeinerungsprozesses aus 2450 von 3022 Aminosäuren (siehe Abbildung 4.3). Dies entspricht 81% der Polypeptidsequenz. Insgesamt 19% der Polypeptidkette konnte daher aufgrund schlechter Elektronendichte nicht gebaut werden. Eine Strukturlösung der CeFAS stellte sich als äußerst schwieriges Problem dar und wäre ohne den großen Einsatz von Dr. Karthik Paithankar nicht möglich gewesen.

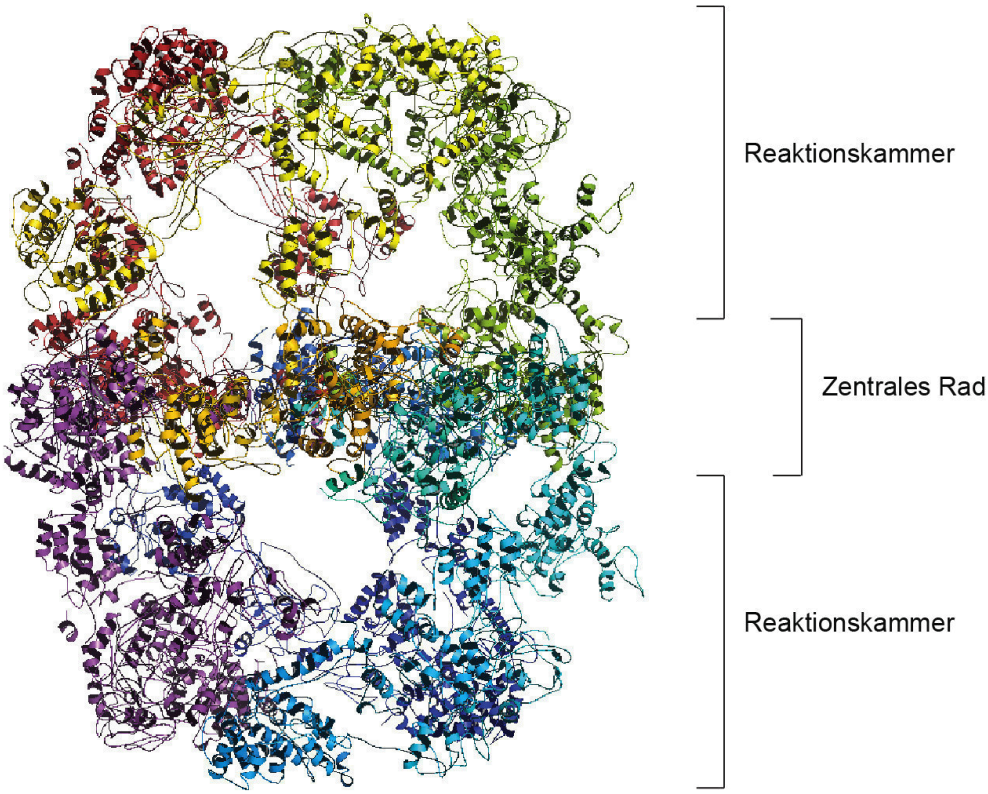



**Abbildung 4.3: Röntgenkristallographische Struktur der CeFAS.**
Seitenansicht des fassartigen Komplexes der CeFAS. Sechs Ketten formen die beiden Reaktionskammern die durch das zentrale Rad equatorial getrennt sind.

### 4.6.3 Struktureller Vergleich mit der Pilz-FAS-I

Die ScFAS weist ein Molekulargeweicht von 2,6 MDa auf, die bakterielle FAS-I hingegen von 1,9 MDa. Die bakterielle FAS-I kann aufgrund der Eigenschaften als eine Minimal-Version der Pilz-FAS-I angesehen werden. Insgesamt 50% der Aminosäuren der Pilz-FAS-I-Sequenz kodieren für den strukturellen Rahmen des Enzyms. Bei der bakteriellen FAS-I beträgt dieser Anteil an strukturbildenden Elementen nur 35% der Aminosäuren (Grininger *et al.,* 2014). Die Dimension der Pilz- und der bakteriellen FAS-I sind trotzdem nahezu gleich (siehe Abbildung 4.4). Die bakterielle FAS-I besitzt eine fassartige Struktur mit einer Höhe von 270 Å und einem Durchmesser der äquatorialen Ebene von 220 Å. Der Unterschied zur Pilz-FAS-I von 35 Å in der Breite kommt dadurch zustande, dass in der Pilz-FAS-I PPT (AcpS in Prokaryoten) und DM-4 vorhanden sind, die in der bakteriellen FAS-I fehlen (siehe Abbildung 4.4.V). Die bakterielle FAS-I weist eine massive Reduktion der strukturgebenden Elemente auf. So fehlen neben den schon erwähnten beiden Elementen die strukturellen Elemente DM-2 im zentralen Rad, die N-terminale

Domäne TM, HDD-2 der DH-Domäne und das *β*-hairpin-Motiv der MPT (siehe Abbildung 3.24). Evolutionär betrachtet hat die Pilz-FAS-I in ein Vorläufer Molekül, das bakterielle FAS-I ähnlich war, katalytisch inaktive Domänen zur Stabilisierung eingeführt. So kam es so zu einer Einschränkung der Flexibilität der fassartige Struktur (siehe Abbildung 1.2). Diese Strukturunterschiede führen in der Pilz-FAS-I dazu, dass etwa 20% der zugänglichen Oberfläche in Interaktionen involviert ist (170,719 Å$^2$ von 850,893 Å$^2$) (pdb: 3hmj) (Johansson *et al.,* 2008). Wie bei CeFAS gezeigt, ist der Anteil an Oberfläche bei der bakteriellen FAS-I deutlich geringer (CeFAS: 5%; 39,990 Å$^2$ von 781,900 Å$^2$).

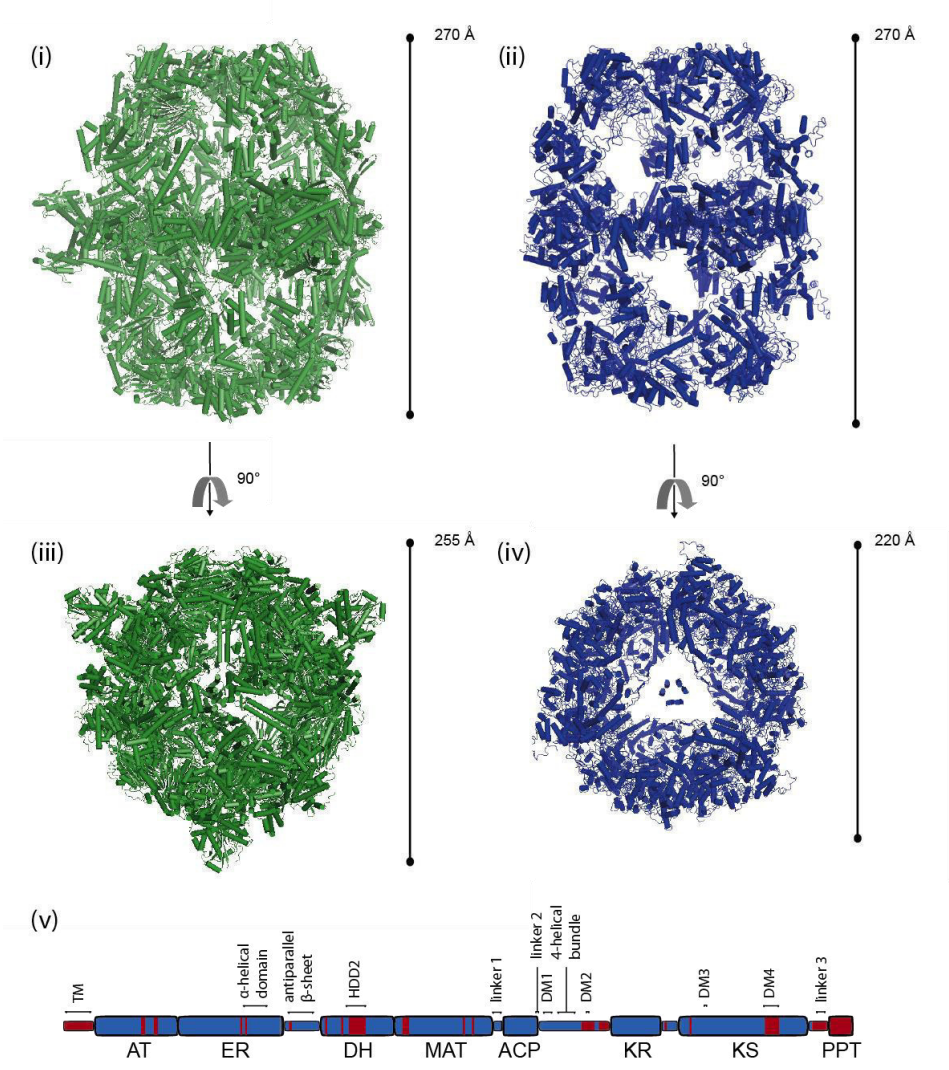



**Abbildung 4.4: Vergleich der Pilz- und bakteriellen FAS-I.**
(i+ii) Blick auf die Reaktionskammer der ScFAS (pdb: 3hmj) (Johansson *et al.,* 2008) und der CeFAS. (iii+iv) Blick auf die Kappen der ScFAS und der CeFAS in Draufsicht. Beim Betrachten der Abbildungen von ScFAS und CeFAS werden die strukturellen Unterschiede zwischen Pilz-FAS-I und bakterieller FAS-I deutlich. (v) In blau ist die bakterielle FAS-I dargestellt, in rot sind die zusätzlichen Domänen oder Sequenzabschnitte der Pilz-FAS-I eingefügt.

### 4.6.4 Zwei große Öffnungen bei der bakteriellen FAS-I

Beim Vergleich der Strukturen der Pilz- und bakteriellen FAS-I fallen die beiden großen Öffnungen auf (siehe Abbildung 3.23), die als Fenster 1 und Fenster 2 bezeichnet werden. Sie befinden sich in der Seitenwand der Reaktionskammer im Bereich MAT/DH/ER (Fenster 1) und an den Kappen der fassartigen Struktur (Fenster 2) an der 3-zähligen Achse (siehe Abbildung 3.23). Das Fenster 2 ist von einer hohen Flexibilität geprägt (siehe Abbilungen 3.13, 3.14., 3,17 und 3.27). Diese konnte anhand der MtFAS gezeigt werden. Auch weisen CaFAS und CeFAS eine Flexibilität in der MAT auf, allerdings konnten für diese Proteine keine offenen Formen wie bei der MtFAS identifiziert werden.

Die im Vergleich zur Pilz-FAS-I größeren Öffnungen könnten auch darauf hindeuten, dass die bakterielle FAS-I mit löslichen Makromolekülen interagiert und, dass durch die großen Fenster die entsprechende Zugänglichkeit zu den katalytischen Zentren ermöglicht wird. Durch funktionelle Studien konnte für die MsFAS gezeigt werden, dass ihr duales Produktspektrum durch die Anwesenheit von Polysacchariden und BSA beeinflussbar ist (Brindley *et al.,* 1969; Zimhony *et al.,* 2004; Papaioannou *et al.,* 2007).

Die Zugänglichkeit zu den katalytischen Zentren könnte auch für kleine Proteine zur spezifischen Interaktion mit FAS-I möglich sein. Zum Beispiel wurde im Genom ein ACP (AcpA) identifiziert, das in seiner Funktion nicht beschrieben ist, aber aufgrund von bekannten strukturellen Eigenschaften für den Transport langer Acyl-CoA geeignet sein könnte. Die AcpA Struktur ist nicht publiziert, aber in der PDB-Datenbank hinterlegt (pdb: 2CGQ).

### 4.6.5 Kristallographische B-Faktoren

Ein röntgenkristallographisches Experiment spiegelt einen Durchschnittswert über Zeit und Raum wieder, das durch die Verteilung der Spots analysiert werden kann (Rupp, 2009). Eine Unordnung in der Kristallpackung hat einen großen Einfluss auf die Güte der Daten. Regionen mit einer guten Ordnung ergeben eine gut interpretierbare Elektronendichte, Regionen mit einer geringeren Ordnung ergeben eine schwache und fragmentierte Elektronendichte.

Das Ziel der Kristallographie ist es, die erhaltene Elektronendichte zu interpretieren, indem das Strukturmodell in der Elektronendichte platziert wird. Schlussendlich gibt es für jedes $C_{\alpha}$-Atom drei Ortskoordinaten und einen zugehörigen B-Faktor, der die

Position des Atoms im Raum und sein Streuvermögen beschreibt. Je höher der B-Faktor für das $C_\alpha$-Atom ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Position des Atoms genau der angegebenen Position entspricht, die ihm von den Ortskoordinaten im Modell zugeschrieben wird. Dieser Wert gibt somit auch Aufschluss über die Flexibilität des $C_\alpha$-Rückgrats in der Elektronendichte (Trueblood *et al.*, 1996; Rupp, 2009). Die B-Faktoren der CeFAS zeigen einen Durchschnittswert von 333 $Å^2$. Speziell die flexible MAT hat einen Durchschnittswert von 430 $Å^2$ (siehe Abbildungen 3.27 und 3.28). Dieser hohe Wert korreliert mit der beschrieben und bekannten Flexibilität der MAT (Ciccarelli *et al.,* 2013).

### 4.6.6 Mobilität MAT in der bakteriellen FAS-I

Die ScFAS ist ein starres Molekül und die Flexibilität des Proteins beschränkt sich im Wesentlichen auf die mobile ACP Domäne (Gipson *et al.*, 2010). Die strukturelle Untersuchung der drei bakteriellen FAS-I-Systeme, die in dieser Arbeit vorgenommen wurden, beinhaltete auch die Charakterisierung der Flexibilität der funktionellen Domänen innerhalb des fassartigen Komplexes. Mit Cryo-EM konnte die positionelle Variabilität der MAT-Domäne aus MtFAS von 40 Å gezeigt werden und daraus auf eine Dynamik dieser Domäne geschlossen werden (Ciccarelli *et al.,* 2013). CET Rekonstruktionen an CaFAS zeigen auch für dieses Protein eine Dynamik der MAT durch unterschiedliche Positionierungen dieser Domäne innerhalb des hexameren Komplexes (siehe Abbildung 3.13 und 3.14).

Ein Vergleich der röntgenkristallographischen Daten der ScFAS und CeFAS erklärt die Mobilität von MPT und MAT. Die MPT-Domäne, das MAT-Äquivalent der ScFAS, gebildet aus dem C-Terminus der *β*-Kette (1667-2077 Aminosäurereste der ScFAS) und dem N-Terminus der *α*-Kette (1-90), zeigt insgesamt drei Interaktionsflächen (pdb:3hmj) (Johansson *et al.,* 2008); (i) 830 $Å^2$ mit der DH der gleichen Polypeptidkette (3,8% der gesamten MPT zugängliche Oberfläche der MPT von 22000 $Å^2$); (ii) 355 $Å^2$ zur AT der Nachbarkette *β*-Kette (1,6%) und (iii) 240 $Å^2$ zur KR der *α*-Kette im Bereich des zentralen Rades (1,1%). Die bakterielle MAT teilt sich insgesamt nur 352 $Å^2$ Interaktionsfläche zur DH der gleichen Kette. Das entspricht nur 1,9% der gesamten zugänglichen Oberfläche von 19,000 $Å^2$ (siehe Abbildung 4.5).

Die Flexibilität der MAT der CeFAS spiegelt sich auch in einer Erhöhung der B-Faktoren wieder (siehe Abbildung 4.5) (Artymiuk *et al.,* 1979). Bei der Betrachtung

der B-Faktoren der ScFAS (pdb: 3hmj) (Johansson *et al.,* 2008) fällt auf, dass diese insgesamt geringer sind. Hohe Werte findet man nur für Loop-Regionen, TM, und die an die Außenseite der Fass-Struktur angefügte PPT-Domäne (siehe Abbildung 4.5).

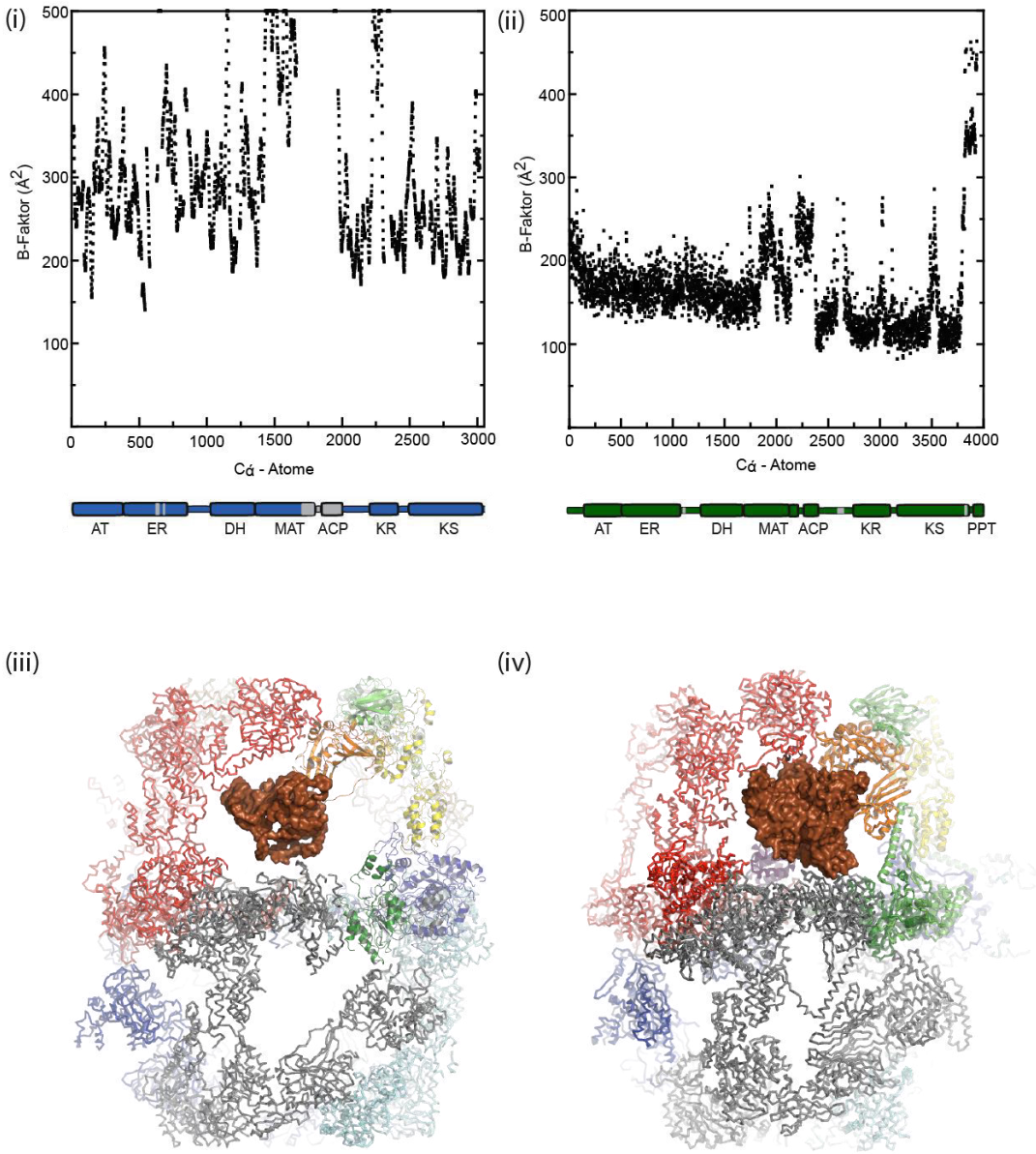



**Abbildung 4.5: B-Faktor Plot der $C_\alpha$-Atome von CeFAS und ScFAS und der Positionierung der MAT/MPT im jeweiligen FAS-I Komplex.**

(i+ii) Plot von B-Faktoren der $C_\alpha$-Atome aus den zugehörigen Polypeptidketten von CeFAS (i) und ScFAS (ii). Die Domänenstruktur ist zur Übersicht angefügt. Die grau eingefärbten Sequenzabschnitte fehlen im Modell der entsprechenden FAS-I. (iii+iv) Hervorgehobene MAT der CeFAS und MPT der ScFAS (pdb: 3hmj) (Johansson *et al.,* 2008). Bei CeFAS sind die kleineren Ausmaße der Domäne und die fehlende Interkation mit der KR-Domäne sowie der DH-Domäne durch die fehlende HDD-2-Domäne deutlich erkennbar.

### 4.6.7 Dynamik im zentralen Rad

Das zentrale Rad spielt eine wichtige Rolle in der Stabilität der Pilz-FAS-I. Die *α*-Helix der Speiche ist gepaart mit einer *α*-Helix in C2-Symmetrie. Diese Filamentstruktur bildet das strukturelle Element DM-1 und stellt die Verbindung der Nabe zur KR Domäne dar. Die Nabe ist somit das einzige strukturelle Element in der Pilz-I und bakteriellen FAS-I, in der alle Polypeptidketten intramolekular interagieren. Nebenbei ist die Nabe noch äquatorialer Anker des C-terminalen Linkers des ACP. Die röntgenkristallographischen Ergebnisse zeigen amphiphile Eigenschaften der *α*-Helix der Nabe (siehe Abbildungen 3.25 und 3.26).

Das Alignement (siehe Abbildung 3.25) zeigt die geringe Konservierung der AS-Sequenz zwischen Pilz- und bakteriellen FAS-I im Bereich der zentralen Nabe und der Speichen. Während der Speiche/Nabe-Bereich in der Pilz-FAS-I durch zwei lange *α*-Helix-Segmente ausgebildet wird (eine *α*-Helix bildet die Nabe, die andere die Speiche), zeigen Sekundärstruktur-Vorhersagen, dass in der bakteriellen FAS-I drei *α*-Helices (7, 12 und 12 AS-Reste) diesen Bereich ausbilden. Es scheint, dass in der bakteriellen FAS-I die lange Helix der Nabe durch einen Einschub von fünf Resten in zwei Teile getrennt ist. In der MtFAS ist in dieser eingeschobenen Sequenz ein Prolin als Helix-Brecher zu finden. Die Elektronendichten von MsFAS und CeFAS entsprechen dieser Vorhersage allerdings nicht. Die MsFAS Struktur zeigt nur eine einzelne Helix in der Nabe (pdb: 3zen) (Boehringer *et al.*, 2013). Es ist möglich, dass die Insertion in der ausgebildeten Nabe lediglich *α*-Helix-destabilisierend und nicht -brechend ist. Solche Phänomene finden sich auch in *α*-helikalen Transmembran-Proteinen. Hier sind Proline als destabilisierende Elemente oft von funktioneller Relevanz (Yohannan *et al.*, 2004). Die schlechte Elektronendichte der MsFAS und CeFAS im Bereich der Nabe kann hier keinen weiteren Aufschluss geben.

Zusammenfassend lässt sich jedoch feststellen, dass der Bereich der Speiche (DM-I)/Nabe in Pilz-FAS-I und bakterieller FAS-I unterschiedliche Eigenschaften aufweist. Während dieser Bereich in Pilz-FAS-I rigide ist und demnach die Nabe konformationell einschränkt, ist dieser Bereich in bakterieller FAS-I deutlich weniger stabilisiert. Über funktionelle Konsequenzen kann hier nur spekuliert werden. Da die Nabe mit dem unstrukturierten Ende von ACP verknüpft ist, könnte die Flexibilität funktionelle Gründe haben.

## 4.7 Kristallkeimbildung und Cryo-EM Tomographie

Die Untersuchung der Kristallkeimung und des Wachstums von Proteinkristallen zu visualisieren, ist schwierig, jedoch gleichzeitig sind Erkenntnisse darüber wichtig, vor allem für mögliche Verbesserungen des Prozesses der Kristallisation für die röntgenkristallographische Strukturlösung. Der Prozess der Kristallkeimbildung und die Formation von Proteinkristallen sind bis zum heutigen Zeitpunkt nur durch Modelle beschrieben und konnten noch nicht auf molekularem Niveau abgebildet werden. Durch ein entsprechendes Untersuchungsobjekt, das verschiedene strukturelle Voraussetzungen wie gewisse Größe und gut erkennbare Symmetrie erfüllt, könnte dies gezeigt werden (Garzia-Ruiz, 2003).

Der Komplex der bakterielle FAS-I, der in den zurückliegenden Kapiteln beschrieben wurde und als ein großes und hoch-symmetrischen Protein (Fass mit einer Höhe von 270 Å; einem Durchmesser von 220 Å; D3-Symmetrie) vorliegt, bildet die ideale Voraussetzung für elektronenmikroskopische Untersuchungen des Kristallisationsprozesses. Diese Voraussetzungen eröffneten die Möglichkeit, Kristallisationstropfen der bakteriellen FAS-I zu untersuchen, um Kristallkeimung und -wachstum auf molekularer Ebene sichtbar zu machen.

Proteinkristalle werden durch Selbstassemblierung von Makromolekülen aufgebaut. Arbeiten von McPherson *et al.* zeigen die Oberfläche von Proteinkristallen mit *Atomic-force-microscopy* (AFM) (siehe Abbildung 4.6) (McPherson *et al.*, 2000). AFM benötigt allerdings große Proteinkristalle (50-200 µm), deren Oberfläche in Einzelexperimenten abgetastet und dadurch abgebildet werden kann. EM hingegen bietet nahezu native Bedingungen ohne chemische Fixierung und Dehydration des Untersuchungsobjektes (Sharma, 2005). Auswirkung auf die Probe hätte lediglich die Präparation des EM-Grids; das Auftragen der Moleküle auf die Oberfläche und das anschließende Eintauchen des EM-Grids in flüssiges Ethan.

Bemerkenswert bei den Abbildungen ist die hexagonale 2D-Anordnung weniger Moleküle sowie die, bereits über Modelle vorgeschlagene, in die dritte Dimension fortgesetzte Anordnung zu Blöcken (siehe Abbildungen 3.12, 3.29.1, 4.7). Die EM-Bilder zeigen Schnappschüsse des Aufbaus von Kristallen; ein initiales, laterales Wachstum wird von einem normalen in dritte Dimension gehende gefolgt. Es sei noch angemerkt, dass auch in diesen Anordnungen die Flexibilität des Komplexes durch die unterschiedliche Größe der Öffnungen der Kappen (Ciccarelli *et al.,* 2013) erkennbar ist (siehe Abbildung 3.29).

Diese Ergebnisse der Kristallkeimbildung stellen nach bestem Wissen den ersten Einblick in das Kristallwachstum von Proteinkristallen auf molekularer Ebene dar. Die in diesem Versuch gewählte Probenvorbereitung der Kristallkeimungsvisualisierung bietet großes Potential für die Weiterentwicklung der Probenvorbereitung von Nanokristallen für die XFEL (*X-ray-free-electron-laser*)-Technologie. Wie auch in Stevenson et al. 2014 gezeigt, konnten hier mit Elektronenmikroskopie Nanokristalle detektiert (siehe Abbildung 4.6) und weiter für XFEL-Messungen optimiert werden (Stevenson *et al.*, 2014). Diese Kristalle konnten visuell zuvor am Lichtmikroskop nicht detektiert werden.

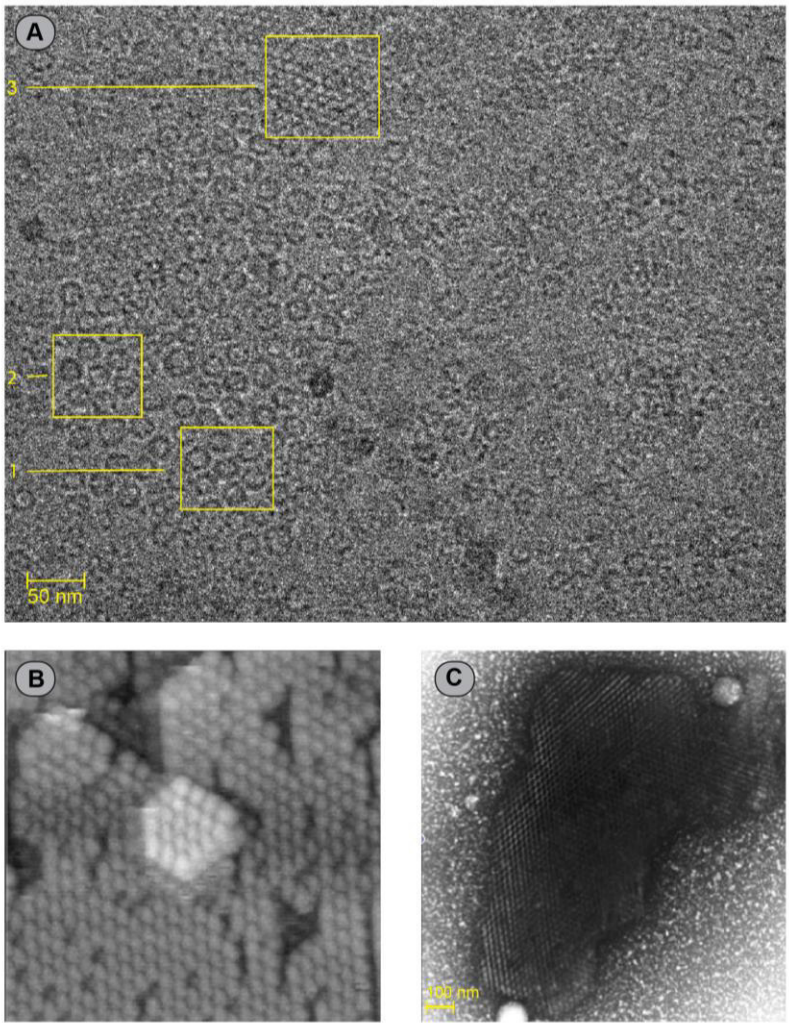



**Abbildung 4.6: Vergleich zwischen verschiedenen elektronenmikroskopischen und AFM Aufnahmen von Nukleationskeimen sowie Nanokristallen.**
(A)Kristallkeimbildung wird am Beispiel von CaFAS Partikeln gezeigt, (1) und (2) zeigen hexagonale Anordnungen, (3) das Wachstum in die dritte Dimension. (B) Gezeigt werden Kristallisationsinseln beim Wachstum eines *satellite tobacco mosaic virus* Kristalls, die Aufnahme hat die Masse von 470 x 470 $nm^2$ (McPherson *et al.,* 2000). Die elektronenmikroskopische Aufnahme eines RPBII_GFP Nanokristalles zeigt dessen periodischen Aufbau. Aufnahme aus (Stevenson *et al.,* 2014).

Mit der CET war es möglich, zwei Tomogramme der CaFAS zu rekonstruieren. Durch das Plotten von hochkonzentrierten Proteinlösungen aus einem Kristallisationstropfen wurde eine hohe Dichte von Partikeln auf dem EM-Grid erzielt und die obere Hälfte des Komplexes konnte mit guter Qualität rekonstruiert werden. Die Rekonstruktion des Partikels in der Grid-nahen Hälfte lieferte durch die zu hohe

Dichte der Moleküle Artefakte. Auch CET zeigt schließlich die Flexibilität des Komplexes der CaFAS (siehe Abbildungen 3.13 und 3.14). Zu erkennen ist eine Bewegung der MAT und die damit verbundene leichte Öffnung des Domes. Hier scheint eine konformationelle Flexibilität anderer Domänen beteiligt zu sein, eventuell in ähnlicher Weise wie schon für die MtFAS durch Cryo-EM gezeigt (Ciccarelli *et al.,* 2013).

## 4.8 Resümee und Ausblick

Die Biosynthese von Fettsäuren (FS) spielt in Prokaryoten und Eukaryoten eine zentrale Rolle im Zellmetabolismus. FS besitzen wichtige Aufgaben in der Zelle, wie Energiespeicherung, Signal-Transduktion und Aufbau der Zellmembran. Der Aufbau der Zellwand in Prokaryoten der CMN-Gruppe zeichnet sich durch eine mit Mykolsäuren verstärkte Struktur aus. Die Zellwand schützt den Organismus besser gegen äußere Einflüsse wie Hitze und Säuren und stellt gleichzeitig eine effektive Permeabilitätsbarriere gegen kleine Wirkstoffe dar. Der Fettsäuresynthese in der CMN-Gruppe liegt, anders als in den anderen Prokaryoten, ein Pilz-FAS-I ähnlicher fassartiger Multienzymkomplex zugrunde. Dieses Enzym konnte in dieser Arbeit strukturell über verschiedene EM-Anwendungen und mittels Röntgenkristallographie charakterisiert werden.

So ist in Ciccarelli *et al.* die erste Elektronendichte der MtFAS gezeigt (Ciccarelli *et al.*, 2013), und in Enderle *et al.* die erste röntgenkristallographische Strukturklärung der bakteriellen FAS-I (Enderle *et al.,* 2015). Beide Ergebnisse eröffnen in struktureller und funktioneller Hinsicht neue Forschungsfelder.

Strukturell bleibt weiterhin das Bestreben bestehen, über die Lösung einer hochaufgelösten Struktur einen wichtigen Schritt zum rationalen Design von Inhibitoren der FAS-I von *M. tuberculosis* zu gehen und somit zur Optimierung der Therapie von TB beizutragen. Neben einer Inhibierung einzelner katalytischer Zentren wird aufgrund der konservierten funktionellen Domänen zur Säuger-FAS-I und aufbauend auf die Ergebnisse dieser Arbeit auch die Inhibierung durch Verhinderung der Assemblierung des Multienzymkomplexes in den Vordergrund rücken (Grininger 2014).

Elektronendichten aus Cryo-EM (Boehringer *et al.,* 2013; Ciccarelli *et al*., 2013) und Röntgenkristallographie (Enderle *et al.,* 2015) zeigen die hohe Flexibilität des Enzymes in der MAT-Domäne. Es ist sehr wahrscheinlich genau diese Problematik der hohen konformationellen Flexibilität, die die schlechte Qualität der Kristalle bedingt. Ziel von weiteren Projekten wird sein, durch konformationelle Einschränkung eine höher aufgelöste Struktur zu generieren. Dies könnte erreicht werden durch Crosslinking von ACP zu einer katalytischen Domäne, z. B. DH (Bruegger *et al.,* 2013). Bei Cryo-EM könnte über größere Datensätze und unter dem Einsatz von neuen direkten Detektoren eine Strukturlösung bei höherer Auflösung erzielt werden mit dem Vorteil, dass hier auch die Dynamik des Proteins weiter untersucht werden könnte. Insbesondere könnte man dadurch auch Fragen adressieren, die auf die Auswirkung der Dynamik der Fass-Struktur auf den Reaktionsmodus des ACP abzielen. Bedingt durch die doppelte Verankerung von ACP an die Reaktionskammer und das zentrale Rad sollte ein Einfluss der Dynamik des Gesamtproteins auf die Dynamik von ACP bestehen.
Durch die Analyse von Kristallisationstropfen der CaFAS mit Cryo-EM konnte die Bildung von Proteinkristallen zu verschiedenen Stadien bei hoher Auflösung festgehalten werden. Da diese Mikrokristalle potentielle Targets für XFEL darstellen, besteht auch die Möglichkeit einer strukturellen Untersuchung mit Hilfe dieser Methode. Eine strukturelle Bearbeitung der bakteriellen FAS-I mit X-FEL hat den großen Vorteil, dass nur Mikrokristalle Verwendung finden würden, wodurch das Problem der Fehlordnung der Kristalle minimiert werden könnte. In einem zusätzlichen Schritt könnten zudem Kristallkeime mit CET untersucht und dreidimensional rekonstruiert werden. Dies würde eine noch bessere Beschreibung des Baus von Kristallen erlauben.

Neben der strukturellen Bearbeitung der bakteriellen FAS-I bietet eine weitere funktionelle Untersuchung dieses Enzyms eine Fülle von Möglichkeiten. Für die beiden Referenzenzyme der CaFAS und CeFAS konnten hohe spezifische Aktivitäten bestimmt werden. Für MtFAS gibt es in diesem Aspekt jedoch Probleme. Eventuell liegt das Problem in einer rekombinant nicht stattfindenden *post-translationalen* Modifikation dieses Enzyms. Die Masterarbeit von Herrn Emanuel Peplau zu diesem Thema, durchgeführt während der Entstehung dieser

Arbeit, konnte das Problem nicht lösen. Somit verhindert die nicht-vorhandene Aktivität von MtFAS bislang funktionelle Untersuchungen.

Ein großes funktionelles Interesse an MtFAS besteht z. B. in der Untersuchung des dualen Produktspektrums der MtFAS. Die mycobakterielle FAS-I zeichnet sich durch die unterschiedlichen Produkte $C_{16}$- und $C_{26}$-CoA aus. Dieses ist für ein FAS-I System recht ungewöhnlich. Eine Analyse der zugrundeliegenden molekularen Grundlagen, wie auch der Einfluss von kleinen Molekülen wie Polysacchariden und BSA auf das Produktspektrum hat, wäre interessant.

# 5. Anhang

## 5.1 Abbildungs-, Tabellen- und Abkürzungsverzeichnis

### 5.1.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Reaktionszyklus und Domänenorganisation der bakteriellen FAS-I.
Abbildung 1.2: Kristallstruktur bei 4.5 Å und Domänenorganisation der Pilz-FAS-I.
Abbildung 1.3: *Negative-stain*-EM Aufnahmen der bakteriellen FAS-I aus *Brevibakterium ammoniagenes*.
Abbildung 1.4: Domänenstrukturen der drei FAS-I-Systeme.
Abbildung 1.5: Aufbau der Zellwand von *M. tuberculosis* Bakterien.
Abbildung 1.6: Mykolsäurebiosynthese und ihre Inhibierung in *M. tuberculosis*
Abbildung 1.7: Nukleationszonen dargestellt in einem Kristallisationsgramm.
Abbildung 2.1: Dehydration von Proteinkristallen.
Abbildung 2.2: Arbeitsfluss der Gridpräparation für die Kristall-EM.
Abbildung 3.1: Präparation der bakteriellen FAS-I.
Abbildung 3.2: Instabilität der MtFAS.
Abbildung 3.3: AUZ von ScFAS, CaFAS und MtFAS.
Abbildung 3.4: Schmelzkurven der Wildtyp-FAS-I und der Fusionskonstrukte.
Abbildung 3.5: Thermische Stabilitäten der Proteine CaFAS, CeFAS und MtFAS nach der Thermofluor-Methode.
Abbildung 3.6: Aktivitätsassay der CeFAS.
Abbildung 3.7: Produktspektrum der CaFAS.
Abbildung 3.8.: *Negative-stain*-EM Aufnahme der CaFAS.
Abbildung 3.9: Rekonstruktion der CaFAS.
Abbildung 3.10: *Negative-stain*-EM Aufnahme der TriS-CaFAS.
Abbildung 3.11: *Negative-stain*-EM Aufnahme der MtFAS.
Abbildung 3.12: Cryo-EM Aufnahmen (Bed. 2).
Abbildung 3.13: Tomogramm 1 der CaFAS.
Abbildung 3.14: Tomogramm 2 der CaFAS.
Abbildung 3.15: Elektronendichten der drei Rekonstruktionen der MtFAS.
Abbildung 3.16: MtFAS mit der gedockten röntgenkristallographischen Struktur der ScFAS.
Abbildung 3.17: Drei Positionen der MAT-Domäne.

Abbildung 3.18: Kristallbilder der CaFAS.
Abbildung 3.19: Kristallbilder der CeFAS.
Abbildung 3.20: Diffraktionsbilder zweier CeFAS Kristalle aufgenommen an der *beamline* ID14-4 (ESRF, Grenoble).
Abbildung 3.21: Elektronendichte der CeFAS bei einer Auflösung von 7,5 Å.
Abbildung 3.22: Elektronendichte mit gedockten katalytischen Domänen einer Polypeptidkette.
Abbildung 3.23: Struktur der CeFAS bei einer Auflösung von 7,5 Å.
Abbildung 3.24: Superposition der CeFAS (blau) und der ScFAS (grün).
Abbildung 3.25: Individuelle Sekundärstruktur-Vorhersagen für die DM-1 Region im Zentrum des *α*-Rades.
Abbildung 3.26: Vergleich der zentralen Nabe der bakteriellen FAS-I mit der Pilz-FAS-I.
Abbildung 3.27: B-Faktor Plot der $C_{\alpha}$-Atome von CeFAS.
Abbildung 3.28: B-Faktor der $C_{\alpha}$-Atome der CeFAS.
Abbildung 3.29: Cryo-EM Aufnahme der Kristallkeimbildung.
Abbildung 3.30: Modellbildung zur Anordnung von bakteriellen FAS-I Molekülen in Kristallen.
Abbildung 3.31: Cryo-EM-Aufnahme mit unterschiedlicher Anordnung der Partikel.
Abbildung 4.1: Phylogenetische Analyse ausgewählter Pilz- und bakterieller FAS-I Systeme.
Abbildung 4.2: Unterschiede bei Pilz-FAS-I-Systeme.
Abbildung 4.3: Röntgenkristallographische Struktur der CeFAS.
Abbildung 4.4: Vergleich der Pilz- und bakteriellen FAS-I.
Abbildung 4.5: B-Faktor Plot der $C_{\alpha}$-Atome von CeFAS und ScFAS und der Positionierung der MAT/MPT im jeweiligen FAS-I Komplex.
Abbildung 4.6: Vergleich zwischen verschiedenen elektronenmikroskopischen und AFM Aufnahmen von Nukleationskeimen sowie Nanokristallen.
Abbildung 5.1: Alignement strukturell bekannter bakteriell und Pilz-FAS-I-Systeme.
Abbildung 5.2: *pET22b* (+) Vektor.
Abbildung 5.3: *pETCoco-I* (+) Vektor.

### 5.1.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Puffer für die Strep-Tactin-Sepharose-Säule.

Tabelle 2.2: Puffer für die Gelfiltration.

Tabelle 2.3: Thermofluor-Pufferscreen.

Tabelle 2.4: *E. coli*-Stämme.

Tabelle 3.1: Statistik zur Datensammlung der bakteriellen FAS-I.

Tabelle 3.2: Strukturklärung der CeFAS (*).

Tabelle 3.3: Die Lösung für MR des Datensatz $A_1$.

Tabelle 3.4: R-Faktoren der MR-Lösung.

Tabelle 3.5: R-Faktoren nach Strukturverfeinerung.

Tabelle 3.6: Verfeinerungsstatistik des Datensatz $A_1$.

Tabelle 3.7: Prozentuale Identitätsmatrix zwischen der bakteriellen und der Pilz-FAS-I im Bereich des DM-1.

### 5.1.3 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| Ac | Acetyl |
| AcCoA | Acetyl-CoA |
| ACP | Acyl-Carrier-Protein |
| AcpS | Acyl-Carrier-Protein-Synthase |
| Abt. | Abteilung |
| AT | Acetyl-Transferase |
| BSA | Rinder-Serum-Albumin |
| BTP | BisTrisPropan |
| CaFAS | *Corynebakterium ammoniagenes* |
| CAPSO | N-cyclohexyl-2-hydroxyl-3-aminopropanesulfonischesäure |
| CeFAS | *Corynebakterium efficiens* |
| CET | Cryo-EM-Tomographie |
| CoA | Coenzym-A |
| Cryo-EM | Einzelmolekül-Cryo-Elektronenmikroskopie |
| Da | Dalton |
| DH | Dehydratase |
| DM | Dimerisierungsdomänen |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNase-I | Desoxyribonuclease-I |
| *E. coli* | *Escherichia coli* |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EM | Elektronenmikroskopie |
| ER | Enoyl-Reduktase |
| ESI | Elektronenspray-Ionisation |
| FAS | Fettsäuresynthasen |
| FMN | Flavinmononukleotid |
| FS | Fettsäuren |
| g | Gewichtskraft |
| h | Stunde |
| HABA | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HDD | Hot-Dog-Domänen |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HIV | Humanen-Immundefizienz-Virus |

| | |
|---|---|
| HMW | High-Molecular-Weight |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| IPTG | Isopropyl-*β*-D-thiogalactopyranosid |
| K | Kalium |
| K | Kelvin |
| k | Kilo |
| KR | Ketoacyl-Reduktase |
| KS | Ketoacyl-Synthase |
| KW | Kohlenwasserstoffkette |
| l | Liter |
| M | Mega |
| m | milli |
| Ma | Malonyl |
| MaCoA | Malonyl-CoA |
| MAT | Malonyl/Acyl-Transferase |
| MDR-TB | Deutsch, multiresistenten-Tuberkulose |
| MES | 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure |
| min | Minute |
| MPT | Malonyl/Palmityl-Transferase |
| MS | Massenspektrometrie |
| MsFAS | *Mycobakterium smegmatis* |
| MtFAS | *Mycobakterium tuberculosis* |
| Na | Natrium |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NRPS | Nicht-Ribosomalen-Polypeptid-Synthasen |
| p.a. | *pro analysi*, analysenrein |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglycol |
| PKS | Polyketidsynthese |
| PPT | Phosphopantetheintransferase |
| PSI | Pound-force per square inch |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| s | Sekunde |

| | |
|---|---|
| ScFAS | *Saccharomyces cerevisiae* |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| SOC | Super Optimal Broth |
| TB | Tuberkulose |
| TBE | Tris-Borsäure-EDTA |
| TlFAS | *Thermomyces lanuginosus* |
| TM | Trimerisierungsdomänen |
| Tricin | *N*-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| WHO | Weltgesundheitsorganisation |
| Ψ KR | Pseudo-Ketoreduktase |
| Ψ ME | Pseudo-Methyltransferase |

## 5.2 Literaturverzeichnis

**Andersen, P. & Kaufmann, S. H. E.** (2014). Novel vaccination strategies against Tuberculosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4, 1-19.

**Anselmi, C., Grininger, M., Gipson, P. & Faraldo-Gómez, J. D.** (2010). Mechanism of substrate shuttling by the acyl-carrier protein within the fatty acid mega-synthase. *J Am Chem Soc* 132, 12357-12364.

**Artymiuk, P. J., Blake, C. C. T., Grace, D. E. P., Oatley, S. J., Phillips, D. C. & Sternberg, M. J. E.** (1979). Crystallographic studies of the dynamic properties of lysozyme. *Nature* 280, 563-568.

**Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K. S., Wilson, D., *et al.*** (1994). InhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 263, 227-230.

**Becq, J., Gutierrez, M. C., Rosas-Magallanes, V., Rauzier, J., Gicquel, B. & Neyrolles, O. P. D.** (2007). Contribution of horizontally acquired genomic islands to the evolution of the tubercle bacilli. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1861-1871.

**Bhatt, A., Molle, V., Besra, G. S., Jacobs, W. R. Jr. & Kremer, L.** (2007). The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development. *Mol. Microbiol.* 64, 1442-1454.

**Blessing, R. H**. (1995). An empirical correction for absorption anisotropy. *Acta Cryst*. A 51, 33-38.

**Bloch, K. & Vance, D.** (1977). Control mechanisms in the synthesis of saturated fatty acids. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 263-298.

**Boehringer, D., Ban, N. & Leibundgut, M.** (2013). 7.5-Å Cryo-EM structure of the mycobacterial fatty acid synthase. *J. Mol. Biol.* 425, 841-849.

**Brennan, P. J.** (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 83, 91-97.

**Brignole, E. J., Smith, S. & Asturias, F. J.** (2009). Conformational flexibility of metazoan fatty acid synthase enables catalysis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 190-197.

**Brindley, D. N., Matsumura, S. & Bloch, K.** (1969). *Mycobacterium phlei* fatty acid synthetase - a bacterial multienzyme complex. *Nature* 224, 666-669.

**Bruegger, J., Haushalter, B., Vagstad, A., Shakya, G., Mih, N., Townsend, C. A., *et al.*** (2013). Probing the selectivity and protein-protein interactions of a nonreducing fungal polyketide synthase using mechanism-based crosslinkers. *Chem. Biol.* 20, 1135-1146.

**Brunger, A. T., De La Barre, B., Davies, J. M. & Weis, W. I.** (2009). X-ray structure determination at low resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr*. 65, 128-133.

**Bukhari, H. S. T., Jakob, R. P. & Maier, T.** (2014). Evolutionary Origins of the Multienzyme Architecture of Giant Fungal Fatty Acid Synthase. *Structure* 22, 1-11.

**Bunkóczi, G. & Read, R. J.** (2011). Improvement of molecular-replacement models with Sculptor. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr*. 67, 303-312.

**Burton, D. N., Collins, J. M., Kennan, A. L. & Porter, J. W.** (1969). The effects of nutritional and hormonal factors on the fatty acid synthetase level of rat liver. *J. Biol. Chem*. 244, 4510-4516.

**Campbell, J. W. & Cronan, J. J. E.** (2001). Bacterial fatty acid biosynthesesis: Targets for Antibacterial drug discovery. *Annu. Rev. Microbiol*. 55, 305-332.

**Ciccarelli, L., Connell, S. R., Enderle, M., Mills, D. J., Vonck, J. & Grininger M.** (2013). Structure and conformational variability of the *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase multienzyme complex. *Structure* 21, 1251-1257.

**Daffé, M. & Draper, P.** (1998). The envelope layers of mycobacteria with reference of their patagenicity. *Adv. Microb. Physiol.* 39, 131-203.

**Dauter, Z.** (1999). Data-collection strategier. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr*. 55, 1703-1717.

**Dauter, Z.** (2010). Carrying out an optimal experiment. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr*. 66**,** 389-392.

**Dutta, S., Whicher, J. R., Hansen, D. A., Hale, W. A., Chemler, J. A., Congdon, G. R., *et al.*** (2014). Structure of a modular polyketide synthase. *Nature* 510, 512-517.

**Dym, O., Albeck, S., Peleg, Y., Schwarz, A., Shakked, Z., Burstein, Y., *et al.*** (2009). Structure - function analysis of the acyl carrier protein synthase (AcpS) from *Mycobacterium tuberculosis. J. Mol. Biol.* 393, 937-950.

**Edwards, A. L., Matsui, T., Weiss, T. M. & Khosla, C.** (2014). Architectures of whole-module and bimodular proteins from the 6-deoxyerythronolide B synthase. *J. Mol. Biol.* 426, 2229-2245.

**Eggeling, L. & Sahm, H.** (1999). L-Glutamate and L-lysine: Traditional products with impetuous developments. *Appl Microbiol Biotechnol* 52, 146-153.

**Emsley, P. & Cowtan, K.** (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr***.** 60, 2126-2132.

**Enderle, M.** (2010). Struktur- und Funktionsstudie zur bakteriellen Fettsäuresynthase Typ-I. *FH Aachen*, Diplomarbeit.

**Enderle, M., McCarthy, A., Paithankar, K. & Grininger, M.** (2015). Crystallization and X-ray diffraction studies of a complete bacterial fatty acid synthase type I. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 71**,** 1401-1407.

**Ericsson, U. B., Hallberg, B. M., Detitta, G. T., Dekker, N. & Norlund, P.** (2006). Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal. Biochem.* 357, 289-298.

**Evans, P.R.** (2005). Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr* 62, 72-82.

**Friedman, F. K. & Beychok, S.** (1979). Probes of subunit assembly and reconstitution pathways in multisubunit proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 48, 217-250.

**Fudou, R., Jojima, Y., Seto, A., Yamada, K., Kimura, E., Nakamatsu, T., *et al.*** (2002). *Corynebacterium efficiens* sp. nov., a glutamic-acid-producing species from soil and vegetables. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 52**,** 1127-1131.

**Gago, G., Diacovich, L., Arabolaza, A., Tsai, S. C. & Gramajo, H.** (2011). Fatty acid biosynthesis in actinomycetes. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 475-497.

**Gamieldien, J., Ptitsyn, A. & Hide, W.** (2002). Eukaryotic genes in *Mycobacterium tuberculosis* could have a role in pathogenesis and immunomodulation. *Trends. Genet*. 18, 5-8.

**Gannoun-Zaki, L., Alibaud, L. & Kremer, L.** (2013). Point mutations within the fatty acid synthase type II dehydratase components HadA or HadC contribute to isoxyl resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 57, 629-632.

**Garman, E. F.** (2010). Radiation damage in macromolecular crystallography: what is it and why should we care? *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 339-351.

**Garman, E. F.** (2014). Developments in X-ray crystallographic structure determination of biological macromolecules. *Science* 343, 1102-1108.

**García-Ruiz, J. M.** (2003). Nucleation of protein crystals. *J. Struct. Biol*. 142, 22-31.

**Gavalda, S., Leger, M., van der Rest, B., Stella, A., Bardou, F., Montrozier, H., *et al.*** (2009). The Pks13/FadD32 crosstalk for the biosynthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 284, 19255-19264.

**Gipson, P., Mills, D. J., Wouts, R., Grininger, M., Vonck, J. & Kühlbrandt, W.** (2010). Direct structural insight into the substrate-shuttling mechanism of yeast fatty acid synthase by electron cryomicroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 9164-9169.

**Gokhale, R. S., Saxena, P., Chopra, T. & Mohanty, D.** (2007). Versatile polyketide enzymatic machinery for the biosynthesis of complex mycobacterial lipids. *Nat. Prod. Rep*. 24, 267-277.

**Grininger, M.** (2014).
Perspectives on the evolution, assembly and conformational dynamics of fatty acid synthase type-I (FAS-I) systems. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 25, 49-56.

**Hardwicke, M. A., Rendina, A. R., Williams, S. P., Moore, M. L., Wang, L., Krueger, J. A., *et al.*** (2014). A human fatty acid synthase inhibitor binds *β*-ketoacyl reductase in the keto-substrate site. *Nat. Chem. Biol.* 10, 774-779.

**Harrison, C.** (2013). Antibacterial drugs: hitting the tuberculosis wall. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 578-579.

**Harrison, C.** (2004). Whither structural biology? *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 12-15.

**Heras, B. & Martin, J. L.** (2005). Post-crystallization treatments for improving diffraction quality of protein crystals. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 61, 173-1180.

**Hertweck, C.** (2009). The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 4688-4716.

**Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Plitzko, J. M. & Engelhard, H.** (2008). Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 3963-3967.

**Hopwood, D. A. & Sherman, D. H.** (1990). Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* 24, 37-66.

**Jenke-Kodama, H. & Dittmann, E.** (2005). Combinatorial polyketide biosynthesis at higher stage. *Mol. Syst. Biol.* 1, 1-2.

**Jenni, S., Leibundgut, M., Maier, T. & Ban, N.** (2006). Architecture of a fungal fatty acid synthase at 5 Å resolution. *Science* 311, 1263-1267.

**Jenni, S., Leibundgut, M., Boehringer, D., Frick, C., Mikolásek, B. & Ban, N.** (2007). Structure of fungal fatty acid synthase and implications for iterative substrate shuttling. *Science* 316, 254-261.

**Johansson, P., Wiltschi, B., Kumari, P., Vonrhein, C., Vonck, J., Oesterhelt, D. & Grininger, M.** (2008). Inhibition of the fungal fatty acid synthase type-I multienzyme complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 12803-12808.

**Johansson, P., Mulinacci, B., Koestler, C., Vollrath, R., Oesterhelt, D. & Grininger, M.** (2009). Multimeric options for the auto-activation of the *Saccharomyces cerevisiae* FAS type-I megasynthase. *Structure* 17, 1063-1074.

**Kalinowski J, Bathe, B., Bartels, D., Bischoff, N., Bott, M., Burkovski, A., *et al.*** (2003). The complete Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* 104, 5-25.

**Kikuchi, S., Rainwater, D. L. & Kolattukudy, P. E.** (1992). Purification and characterization of an unusually large fatty acid synthase from *Mycobacterium tuberculosis* var. bovis BCG. *Arch. Biochem. Biophys.* 295, 318-326.

**Kittendorf, J. D. & Sherman, D. H.** (2006). Developing tools for engineering hyvrid polyketide synthetic patahways. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 597-605.

**Kleywegt, G. J. & Jones, T. A.** (1997). Model building and refinement practice. *Meth. Enzymol.* 277, 208-230.

**Kremer, L., Douglas, J. D., Baulard, A. R., Morehouse, C., Guy, M. R., Alland, D., *et al.*** (2000). Thiolactomycin and related analogues as novel anti-mycobacterial agents targeting KasA and KasB condensing enzymes in m*ycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 275, 16857-16864.

**Lamichhane, G., Zignol, M., Blades, N. J., Geiman, D. E., Dougherty, A., Grosset, J., *et al.*** (2003). A postgenomic method for predicting essential genes at subsaturation levels of mutagenesis: application to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 7213-7218.

**Leibundgut, M., Jenni, S., Frick, C. & Ban, N.** (2007). Structural basis for substrate delivery by acyl carrier protein in the yeast fatty acid synthase. *Science* 316, 288-290.

**Leibundgut, M., Maier, T., Jenni, S. & Ban, N.** (2008). The multienzyme architecture of eukaryotic fatty acid synthases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18, 714-725.

**Levy, E. D., Erba, E. B., Robinson, C. V. & Teichmann, S. A.** (2008). Assembly reflects evolution of protein complexes. *Nature* 453, 1262-1265.

**Linn, T. C.** (1981). Purification and crystallization of rat liver fatty acid synthetase. *Arch. Biochem. Biophys*. 209, 613-619.

**Lomakin, I.B., Xiong, Y. & Steitz, T.A.** (2007). The crystal structure of yeast fatty acid synthase, a cellular machine with eight active sites working together. *Cell* 129, 319-332.

**Lynen, F.** (1967). The role of biotin.dependent carboxylations in biosynthetic reactions. *Biochem. J.* 102, 381-400.

**Lynen, F.** (1969). Yeast fatty acid synthetase. *Methods enzymol.* 14, 17-33.

**Lynen, F.** (1980). On the structure of fatty acid synthetase of yeast. *Eur. J. Biochem.* 112, 431-442.

**Maier, T., Jenni, S. & Ban, N.** (2006). Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution. *Science* 311, 1258-1262.

**Maier, T., Leibundgut, M. & Ban, N.** (2008). The crystal structure of a mammalian fatty acid synthase. *Science* 321, 1315-1322.

**Maier, T., Leibundgut, M., Boehringer, D. & Ban, N.** (2010). Structure and function of eukaryotic fatty acid synthases. *Q. Rev. Biophys.* 43, 373-422.

**Marrakchi, H., Lanéelle, M.-A. & Daffé, M.** (2014). Mycolic acids: structures, biosynthesis, and beyond. *Chem. Biol.* 21, 67-85.

**Marsh, J. A. & Teichmann, S. A.** (2013). Protein flexibility facilitates quaternary structure assembly and evolution. *PLoS Biol.* 12 (5), 1-11.

**McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. & Read, R. J.** (2007). Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* 40, 658-674.

**McPherson, A., Malkin, A. J. & Kuznetsov, Y. G.** (2000). Atomic force microscopy in the study of macromolecular crystal growth. *Annu. Review Biophys.* 29, 361-410.

**Menzella, H. G. & Reeves, C. D.** (2007). Combinatorial biosynthesis for drug development. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 238-245.

**Matthews B. W.** (1969). Solvent Content of Protein Crystals. *J. Mol. Biol.* 33**,** 491-497.

**Meurer, G., Biermann, G., Schütz, A., Harth, S. & Schweizer, E.** (1992). Molecular structure of the multifunctional acid synthetase gene of *Brevibacterium ammoniagenes*: its sequence of catalytic domains is formally consistent with a head-to-tail fusion of the two yeast genes FAS1 and FAS2. *Mol. Gen. Genet.* 232, 106-116.

**Morishima, N., Ikai, A., Noda, H. & Kawaguchi, A.** (1982). Structure of bacterial fatty acid synthetase from *Brevibacterium ammoniagenes*. *Biochim. Biophys.* 708, 305-312.

**Murshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., *et al.*** (2011). REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67**,** 355-367.

**Nickell, S., Förster, F., Linaroudis, A., Net, W. D., Beck, F., Hegerl, R., *et al.*** (2005). TOM software toolbox: acquisition and analysis for electron tomography. *J. Struct. Biol.* 149, 227-234.

**Nishio, Y., Nakamura, Y., Kawarabayasi, Y., Usuda, Y., Kimura, E., Sugimoto, S., *et al.*** (2003). Comparative complete genome sequence analysis of the amino acid replacements responsible for the thermostability of *Corynebacterium efficiens*. *Genome Res*. 13,1572-1579.

**Oesterhelt, D., Bauer, H. & Lynen, F.** (1969). Crystallization of a Multienzyme Complex - Fatty Acid Synthetase From Yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63, 1377-1382.

**Papaioannou, N., Cheon, H. S., Lian, Y. & Kishi, Y.** (2007). Product-regulation Mechanisms for fatty acid biosynthesis catalyzed by *mycobacterium smegmatis* FAS-I. *ChemBioChem* 8, S. 1775-1780.

**Perham, R. N.** (2000). Swinging arms and swinging domains in multifunctional enymes: Catalytic machines for multistep reaction. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 961-1004.

**Peterson, D. O. & Bloch, K.** (1977). *Mycobacterium smegmatis* fatty acid synthetase. Long chain transacylase chain length specificity. *J Biol Chem* 252, 5735-5739

**Radmacher, E., Alderwick, L. J., Besra, G. S., Brown, A. K., Gibson, K. J. C., Sahm, H., *et al.*** (2005). Two functional FAS-I type fatty acid synthases in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* 151, 2421-2427.

**Redecke, L., Nass, K., DePonte, D. P., White, T. A., *et al.*** (2013). Natively inhibited Trypanosoma brucei cathepsin B structure determined by using an X-ray laser. *Science* 339**,** 227-230.

**Reinhard, L., Mayerhofer, H., Geerlof, A., Mueller-Dieckmann, J. & Weiss, M. S.** (2013). Optimization of protein buffer cocktails using thermofluor. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 69, 209-214.

**Rupp, B.** Biomolecular crystallography: principles, practice and applications to structural biology. Abingdom, New York: Garland Science, 2010.

**Sassetti, C. M., Boyd, D. H. & Rubin, E. J.** (2003). Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol. Microbiol.* 48, 77-84.

**Sayahi, H., Zimhony, O., Jacobs, W. R. Jr, Shekhtman, A. & Welch, J. T.** (2011). Pyrazinamide, but not pyrazinoic acid, is a competitive inhibitor of NADPH binding to *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase I. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 21, 4804-4807.

**Schlichting, I. & Miao, J.** (2012). Emerging opportunities in structural biology with X-ray free-electron lasers. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 22, 613-626.

**Schmidt, T. G. & Skerra, A.** (2007). The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat. Protoc.* 2, 1528-1535.

**Schweizer, E. & Hofmann, J.** (2004). Microbial type I fatty acid synthases (FAS): major players in a network of cellular FAS systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 501-517.

**Sharma, R.** (2005). An environmental transmission electron microscope for in situ synthesis and characterization of nanomaterials. *J. Mater. Res.* 20, 1695-1707.

**Sharma, S. K. & Mohan, A.** (2004). Extrapulmonary tuberculosis. *Ind. J. Med. Res.* 120(4), 316-353.

**Sievers, F. & Higgins, D. G.** (2014). Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods Mol. Biol.* 1079, 105-116.

**Singh, N., Wakil, S. J. & Stoops, J. K.** (1985). Yeast fatty acid synthase: structure to function relationship. *Biochemistry* 24, 6598-6602.

**Smith, J. L. & Sherman, D. H.** (2008). An Enzyme Assembly Line. *Science* 321, 1304-1305.

**Smith, S. & Tsai, S. C.** (2007). The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Nat. Prod. Rep.* 24, 1041-1072.

**Smith, S., Witkowski, A. & Joshi, A. K.** (2003). Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Prog. Lipid Res.* 42, 289-317.

**Stackebrandt, E., Rainey, F. A. & Ward-Rainey, N. L.** (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, actinobacteria classis nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 47**,** 479-491.

**Stevenson, H. P., Makhov, A. M., Calero, M., Edwards, A. L., Zeldin, O. B., Mathews, I. I., *et al.*** (2014). Use of transmission electron microscopy to identify nanocrystals of challenging protein targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 8470-8475.

**Stuible, H. P., Wagner, C., Andreou, I., Huter, G., Haselmann, J. & Schweizer, E.** (1996). Identification and functional differentiation of two type I fatty acid synthases in *Brevibacterium ammoniagenes*. *J. Bacteriol.* 178, 4787-4793.

**Stuible, H. P., Meurer, G. & Schweizer E.** (1997-A). Heterologous expression and biochemical characterization of two functionally different type I fatty acid synthases from *Brevibacterium ammoniagenes*. *Eur. J. Biochem.* 247, 268-273.

**Stuible, H. P., Meier, S. & Schweizer E.** (1997-B). Identification, isolation and biochemical characterization of a phosphopantetheine: Protein transferase that activates the two type-I fatty acid synthases of *Brevibacterium ammoniagenes. Eur. J. Biochem.* 248, 481-487.

**Sullivan, T. J., Truglio, J. J., Boyne, M. E., Novichenok, P., Zhang, X., Stratton, C. F., *et al.*** (2006). High affinity InhA inhibitors with activity against drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *A.C.S. Chem Biol* 1, 43-53.

**Sumper, M., Oesterhelt, D., Riepertinger, C. & Lynen, F.** (1969). Synthesis of various carboxylic acids by the fatty acid synthetase multienzyme complex of yeast and the explanation for their structure. *Eur. J. Biochem*. 10, 377-387.

**Szilágyi, A. & Závodszky, P.** (2000). Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. *Structure* 8, 493-504.

**Tauro, P., Holzner, U., Castorph, H., Hill, F. & Schweizer, E.** (1974). Genetic analysis of non-complementing fatty acid synthetase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec. Gen. Genet.* 129, 131-148.

**Trueblood, K. N., Burgi, H. B., Burzlaff, H., Dunitz, J. D., Gramaccioli, C. M., Schulz, H. H., *et al.*** (1996). Atomic displacement parameter nomenclature. *Acta Cryst.* A 52, 770-781.

**Vagin, A. & Teplyakov, A.** (1997). MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr*. 30, 1022-1025.

**Wakil, S. J.** (1961). Mechanism of fatty acid synthesis. *J. Lipid Res.* 2, 1-24

**Wakil, S. J., Stoops, J. K. & JOSHI, V. C.** (1983). Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 537-579.

**Wang, Z., Schwab, U., Rhoades, E., Chess, P. R., Russell, D. G. & Notter, R. H.** (2007). Peripheral cell wall lipids of *Mycobacterium tuberculosis* are inhibitory to surfactant function. *Tuberculosis* 88, 178-186.

**Weissman, K. J.** (2014). Uncovering the structures of modular polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* 1, 1-18.

**Wheeler, P. R.** (1990). Recent research into physiology of *Mycobacterium leprae*. *Adv. Microb. Physiol.* 31, 70-124.

**Whicher, J. R., Dutta, S., Hansen, D. A., Hale, W. A., Chemler, J. A., Dosey, A. M., *et al.*** (2014). Structural rearrangements of a polyketide synthase module during its catalytic cycle. *Nature* 510, 560-564.

**White, S. W., Zheng, J., Zhang, Y.-M. & Rock, C. O.** (2005). The structural biology of type-II fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 791-831.

**World Health Organization.** Global tuberculosis report 2014. 1-171.

**Wilson, R., Kumar, P., Parashar, V., Vilchéze , C., Veyron-Churlet, R., Freundlich, J. S., *et al.*** (2013). Antituberculosis thiophenes define a requirement for Pks13 in mycolic acid biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* 9**,** 499-506.

**Yohannan, S., Yang, D., Faham, S., Boulting, G., Whitelegge, J. & Bowie, J. U.** (2004). Proline substitutions are not easily accommodated in a membrane protein. *J. Mol. Biol.* 341, 1-6.

**Zhou, H. X.** (2002). Toward the physical basis of thermophilic proteins: linking of enriched polar interactions and reduced heat capacity of unfolding. *Biophys. J.* 83, 3126-3133.

**Zimhony, O., Cox, J. S., Welch, J. T., Vilchèze, C. & Jacobs, W. R. Jr.** (2000). Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Med.* 6, 1043-1047.

## 5.3 Alignement Pilz- und bakterieller FAS-I

```
M.tuberculosis/1-3069      ------------------------------------------------------------
M.smegmatis/1-3089         ------------------------------------------------------------
C.ammoniagenes/1-3063      ------------------------------------------------------------
C.efficiens/1-3022         ------------------------------------------------------------
S.cerevisiae/1-3938      1 ---------------MDAYSTRPLTLSHGSLEHVLLVPTASFFIASQLQEQFNKILPEPTEGFAAD  51
T.lanuginosus/1-3958     1 MYGTSTGPQTGINTPRSSQSLRPLVLTHGSLEFSFLVPTSLHFQAAQLKDSFLATLPQPTEELAQD  66

M.tuberculosis/1-3069      ------------------------------------------------------------
M.smegmatis/1-3089         ------------------------------------------------------------
C.ammoniagenes/1-3063      ------------------------------------------------------------
C.efficiens/1-3022         ------------------------------------------------------------
S.cerevisiae/1-3938     52 DEPTTPAELVGKFLGYVSSLVEPSKVGQ---FDQVLNLCLTEFENCYLEGNDIHALAAKLLQENDT 114
T.lanuginosus/1-3958    67 DEPSSVVELVARYIAFVAHEVDEGDEDAHPTNLEVLKLILNEFERAFMRGNDVHAIAANVAGITAK 132

M.tuberculosis/1-3069    1 --------MTIHEHDRVSAD----------RGGDSPHTTHALVDR-LMAGEPYAVAFGGQGSA--W  45
M.smegmatis/1-3089       1 --------MTIYEHDRVPAGWNDESGSDRTADGNAADTAHALVDR-LSAGEPYAVAFGGQGSA--W  55
C.ammoniagenes/1-3063    1 ------------------------------------MSLTPLHTL-SNDSTAPAVLFAGQGSA--W  27
C.efficiens/1-3022       1 ------------------------------MTEPG-SNFGTSRLIN--RFDQEPYAFAFSGQGFN--W  33
S.cerevisiae/1-3938    115 TLVKTKELIKNYITARIMAK--------RPFDKKS---NSALFRAVGEGNAQLVAIFGGQGNTDDY 169
T.lanuginosus/1-3958   133 ----KIGVVRAYYAGRAAAG--------R-APKPY---DSALFRAAAENNVKIYSIFGGQGNIEEY 182

M.tuberculosis/1-3069   46 LETLEELVSATGIETELATLVGEAELLLDP---VTDELIVVRPIGFEPLQWVRALAAE-DPVPSDK 107
M.smegmatis/1-3089      56 LETLEELVSSAGIESELATLAGEAELLLEP---VASELVVVRPIGFEPLQWVRALAAE-EPVPSDK 117
C.ammoniagenes/1-3063   28 QKAIADAAASPHQGAQLRDILKEVRTTTGP---VARIIASSCPGVYERLEELAQTPADQAPVAK-E  89
C.efficiens/1-3022      34 LKTLRAAVA-AGAGTNVQGIVERAQELLAP---VADELAGTFPFGFDPVAWANAVDTP-N-----F  89
S.cerevisiae/1-3938    170 FEELRDLYQTYH--VLVGDLIKFSAETLSELIRTTLDAEKVFTQGLNILEWLENPS----NTPDKD 229
T.lanuginosus/1-3958   183 FDELREIYTTYP--SFVEDLITSIAELLQSLA-REWDAVKQYPKGLDILQWLHNPE----SQPDTD 241

M.tuberculosis/1-3069  108 HLTSAAVSVPGVLLTQIAATRALARQ-GMD--LVATPPVAMAGHSQGVLAVEALKAGGARDVELFA 170
M.smegmatis/1-3089     118 QLTSAAVSVPGVLLTQIAAVRALARQ-GMD--LTATPPVAVAGHSQGVLAVQALAAKGAKDVELLA 180
C.ammoniagenes/1-3063   90 YDAYPAYSIPGIVLGQIGAIEHLAQL-GID--VD---SAQLAGHSQGSLGVAAVKDAR----QALA 145
C.efficiens/1-3022      90 DTAQAAVSVPGIFVSQIATLDSLESQ-RLD--VE--KSVAAIGHSQGVLGVHLLRDL-TRADEYVA 149
S.cerevisiae/1-3938    230 YLLSIPISCPLIGVIQLAHYVVTAKLLGFTPGELRSYLKGATGHSQGLVTAVAIAETDSWESFFVS 295
T.lanuginosus/1-3958   242 YLVSAPVSFPLIGLVQLAHYMITCKTLGREPGELLERFSGTTGHSQGIVVAAAIATARTWDEFATA 307

M.tuberculosis/1-3069  171 ------LAQLIGAAGTLVARR----------RGISVLGDRPPMVSVTNADPERIGRLLDEFAQDVR 220
M.smegmatis/1-3089     181 ------LAQLIGAAGTLVARR----------RGITVLGDRPPMVSVTNADPERIYELLEEFSSDVR 230
C.ammoniagenes/1-3063  146 ------IAVLMGTAAAVTQ---------------GANDSRTHMLSVRGVPREMVEEYLAG------ 184
C.efficiens/1-3022     150 ------LAQLIGAAITRTGRM----------TGLIAQGTRSPMVAVAGVTREQLQAAIDKAAADVP 199
S.cerevisiae/1-3938    296 VRKAITVLFFIGVRCYEAYPNTSLPPSILEDSLENNEGVPSPMLSISNLTQEQVQDYVNKTNSHLP 361
T.lanuginosus/1-3958   308 AKRAVELLFWIGLRSQQAYPRTSLAPSTLQDSVENGEGTPTPMLSIRDLTRSAVQEHIDATNQHLP 373

M.tuberculosis/1-3069  221 TVLPPVLSIRNGRRAVVITGTPEQLSRFELYCRQISEKEEADRKNKV--RGGDVFSPVFEPVQVEV 284
M.smegmatis/1-3089     231 TVLPPVLSIRNGRRSVVITGTPEQLSRFELYCTQIAEKEEAERKNKL--RGGAVFAPVFDPVQVEV 294
C.ammoniagenes/1-3063  185 ---DAAIAVVNGRVHFALSGTPEDLAKTESNLTQAAESYNDALEERR--IGGSEINPVFDVLAVAL 245
C.efficiens/1-3022     200 EEIRPVIGLRNARTTYVLVGRPDDNQRVITALEAMAAADAKAIENKE--RGGQPFAPRITQLDVQA 263
S.cerevisiae/1-3938    362 AGKQVEISLVNGAKNLVVSGPPQSLYGLNLTLRKAKAPSGLDQSRIPFSERKLKFSNRF--LPVAS 425
T.lanuginosus/1-3958   374 EDRHIGISLVNSARNFVVTGPPISLYGLNLRLRKVKAPTGLDQNRIPFTQRKARFVNRF--LPITA 437

M.tuberculosis/1-3069  285 GFHTPRLSDGIDIVAG------------------WAEKAGLD------VALARELADAILIRKVDW 326
M.smegmatis/1-3089     295 GFHTPRLSDGIEIVGR------------------WAETVGLD------VELAKELTESILVRQVDW 336
C.ammoniagenes/1-3063  246 PFHHASLQDAADLTVD------------------YATQCGLD------AELARELADSILVQPHSW 287
C.efficiens/1-3022     264 AFHHPAMSMAVEQTVA------------------WATACGLD------AETSREVAADVLVNPVDW 305
S.cerevisiae/1-3938    426 PFHSHLLVPASDLINKDLVKNNVSFNAKDIQIPVYDTFDGSDLRVLSG-SISERIVDCIIRLPVKW 490
T.lanuginosus/1-3958   438 PFHSPYLAGAHAHILGDVD--DMKIPASSLVIPVYDTKTGQDLRELGDEDIIPELVRMITYDPVNW 501

M.tuberculosis/1-3069  327 VDEITRVHAAGARWILDLGPGD--ILTRLTAPVIRGLGIGIVPAATRGGQ--------RNLFTVGA 382
M.smegmatis/1-3089     337 VDEITELHEAGARWILDLGPGD--ILTRLTAPVIRGLGIGIVPAATRGGQ--------RNLFTVGA 392
C.ammoniagenes/1-3063  288 VETVAGLNS---TYL--LSLDR--GLSSLTTPLIAGTGKVVVPAATPAER--------DNLATPGT 338
C.efficiens/1-3022     306 VAAVTGALDAGARWILDVGPDG--GVVPLTNSILAGRGAASFAVCDTDGQ--------ARVFDAGM 361
S.cerevisiae/1-3938    491 ETTTQ---FK-ATHILDFGPGGASGLGVLTHRNKDGTGVRVIVAGTLDINPDDDYGFKQEIFDVTS 552
T.lanuginosus/1-3958   502 ETATV---FPDATHIVDFGPGGVSGIGVLTNRNKDGTGVRVILAGAIDGT-NTEVGYKPELFDRDD 563

M.tuberculosis/1-3069  383 -TPEVARA-WSSYAPTVVRLPDGRVKLSTKFTRLTGRSPILLAGMTPTTVDAKIVAAAANAGHWAE 446
M.smegmatis/1-3089     393 -VPEVARP-WSSYAPTVVKLPDGSVKLETKFTRLTGRSPILLAGMTPTTVDAKIVAAAANAGHWAE 456
C.ammoniagenes/1-3063  339 -ELPTAVN-YEKFSPKLISLPNGKSYTQTRFSEWTGMSPIILGGMTPTTMDPGIVAAAANGGYWSE 402
C.efficiens/1-3022     362 -APELPRS-YDEFAPRVES-IDGRPRLVTRFTELTGRSPMLLAGMTPTTVDPEIVAAAANGGHWAE 424
S.cerevisiae/1-3938    553 NGLKKNPNWLEEYHPKLIKNKSGKIFVETKFSKLIGRPPLLVPGMTPCTVSPDFVAATTNAGYTIE 618
T.lanuginosus/1-3958   564 NAVQFAVDWVKEHGPRLVKTSVGQTFVDTKMSRLLGVPPVMVAGMTPTTVPWDFVAATMNAGYHIE 629

M.tuberculosis/1-3069  447 LAGGGQVTEEIFGNRIEQMAGLLEPGRTYQFNALFLDPYLWKLQVGGKRLVQKARQSGAAIDGVVI 512
M.smegmatis/1-3089     457 LAGGGQVTEQIFNDRIAELETLLEPGRAIQFNTLFLDPYLWKLQVGGKRLVQRARQSGAPIDGLVV 522
C.ammoniagenes/1-3063  403 MAGGGQYSDEAFTINKDGMMELLEPGRTAAFNTMFFDRYLWNLQFGVTRICSKARANGAAFTGVTI 468
C.efficiens/1-3022     425 LAGGGQVTPEILESNIEKLTGLLEPGVNVQFNSMFLDPYLWKMQIGGKRLVPKARANGAPIDGIVI 490
S.cerevisiae/1-3938    619 LAGGGYFSAAGMTAAIDSVVSQIEKGSTFGINLIYVNPFMLQWGI---PLIKELRSKGYPIQFLTI 681
T.lanuginosus/1-3958   630 LAGGGYYNAQKMSDAISKIEKAIPPGRGITVNLIYVNPRAMGWQI---PLLGRLRADGVPIEGLTI 692
```

```
M.tuberculosis/1-3069     513 SAGIPDLDEAVELIDELGDIGISHVVFKPGTIEQIRSVIRIATEVPTKPVIMHVEGGRAGGHHSWE 578
M.smegmatis/1-3089        523 SAGIPDLEEAVDIIDELNEVGISHVVFKPGTVEQIRSVIRIAAEVPTKPVIVHIEGGRAGGHHSWE 588
C.ammoniagenes/1-3063     469 CAGIPELDEAKELLDQLTSDGFPYISFKPGTTKQIQDCVAIAADNPTHRVIIQIEDAHAGGHHSWV 534
C.efficiens/1-3022        491 TAGMPEKDEAVSLVRELVDGGFPWISFKPGAVKQVHAVLAIARELPDTPIIIHVEGGIAGGHHSWE 556
S.cerevisiae/1-3938       682 GAGVPSLEVASEYIETL---GLKYLGLKPGSIDAISQVINIAKAHPNFPIALQWTGGRGGGHHSFE 744
T.lanuginosus/1-3958      693 GAGVPSIEVANEYIQTL---GIRHISFKPGSVDAIQQVINIAKANPTFPIILQWTGGRGGGHHSFE 755

M.tuberculosis/1-3069     579 DLDDLLLATYSELRSRANITVCVGGGIGTPRRAAEYLSGRWAQAYGFPLMPIDGILVGTAAMATKE 644
M.smegmatis/1-3089        589 DLDDLLLATYSELRSRSNITICVGGGIGTPERSAEYLSGRWAEVHGYPLMPIDGILVGTAAMATLE 654
C.ammoniagenes/1-3063     535 DLDEMLLATYACAREHDNLAITVGGGIHSPDRASEYLTGTWSTKYGLPIMPVDGVFLGTVAMATKE 600
C.efficiens/1-3022        557 NLDDLLIATYADIRALDNVVLCVGGGIGTPERAADYITGSWATAHGLPAMPVDGILIGTAAMAAKE 622
S.cerevisiae/1-3938       745 DAHTPMLQMYSKIRRHPNIMLIFGSGFGSADDTYPYLTGEWSTKFDYPPMPFDGFLFGSRVMIAKE 810
T.lanuginosus/1-3958      756 DFHQPILLMYSRIRKCSNIVLVAGSGFGGSEDTYPYLTGSWSTKFGYPPMPFDGCMFGSRMMTAKE 821

M.tuberculosis/1-3069     645 STTSPSVKRMLVDTQGT-----DQWISAG-KAQGGMASSRSQLGADIHEIDNSASRCGRLLDEVA- 703
M.smegmatis/1-3089        655 ATTSPQVKQLLVETKGT-----EAWVGAG-KAANGMASGRSQLGADIHEIDNAASRCGRLLDEVA- 713
C.ammoniagenes/1-3063     601 ATANDDVKQLLVDTPGISPETNGGWVGRL-DADGGVSSSQSHLLADLHEIDNSFAKASRMITSIP- 664
C.efficiens/1-3022        623 ATTSQSVKELLVATPGT-----TEWVPAG-GAANGMASGRSQLGADIHEIDNSFARAGRLLDEVA- 681
S.cerevisiae/1-3938       811 VKTSPDAKKCIAACTGVPD---DKWEQTYKKPTGGIVTVRSEMGEPIHKIATRGVMLWKEFDETIF 873
T.lanuginosus/1-3958      822 AHTSKQAKQAIVDAPGVDD---DQWENTYKRPTGGVITVLSEMGEPIHKLATRGVLFWKELDDKIF 884

M.tuberculosis/1-3069     704 -----GDAEAVAERRDEIIAAMA-KTAKPYFG--------DVADMTYLQWLRRYVELAIGEGNSTA 755
M.smegmatis/1-3089        714 -----GDADAVAERRDEIIAAMA-QTAKPYFG--------DVAEMTYLQWLRRYVELAIGDGNSTA 765
C.ammoniagenes/1-3063     665 -----I--EEYDERRDEIIAALD-KTSKPYFG--------DLSEMTYEDWVARFAERA-------- 706
C.efficiens/1-3022        682 -----GDEEAVQARREEIIAAIG-KTAKVYFG--------DLGSMTYQQWLNRYLELSG------- 726
S.cerevisiae/1-3938       874 NLPKNKLVPTLEAKRDYIISRLNADFQKPWFATV-NGQARDLATMTYEEVAKRLVELMFI------ 932
T.lanuginosus/1-3958      885 SLDRSKRVAELKKRRDYIIKKLNDDFQKVWFGRNSAGEPVDLEDMTYAEVVHRMVELMYV------ 944

M.tuberculosis/1-3069     756 DTASVGSPWLADTWRDRFEQMLQRAEARLHPQDFGPIQTLFTD----AGLLDNPQQAIAALLARYP 817
M.smegmatis/1-3089        766 DTKRPDSPWLDITWRDRFEQMLKRAEARLHPQDFGPIETLFDADADGERLLEDPEAAITALLQRYP 831
C.ammoniagenes/1-3063     707 ------YPWVDPTWHDRFHDLLQRVEARLNDADHGDIETLFPTLDDS----ENAPEAVAKLLAAYP 762
C.efficiens/1-3022        727 ---PVNGEWIDVSWANRFAQMLERAEARLIDQDHGQFTPSHTLED-----GVEPQQVVDKLVADLP 784
S.cerevisiae/1-3938       933 ---RSTNSWFDVTWRTFTGDFLRRVEERFTKSK-TL------SLIQSYSLLDKPDEAIEKVFNAYP 988
T.lanuginosus/1-3958      945 ---KHEKRWIDPSLKKLTGDFIRRVEERFTSVEGQP------SLLQNYSDLDEPYPAVDRILAAYP 1001

M.tuberculosis/1-3069     818 DAETVQLHPADVPFFVTLCKTL-GKPVNFVPVIDQDVRRWWRSDSLWQAHDAR----YDADAVCII 878
M.smegmatis/1-3089        832 DAETVVLHPADVPFFVELCKTL-GKPVNFVPVIDKDVRRWWRSDSLWQAHDAR----YEADQVCVI 892
C.ammoniagenes/1-3063     763 NAKTTKVNTRDEAWFPTLIRKH-VKPMPWTTAIDGDLKEWFAKDTLWQAQDPR----YDADGVRII 823
C.efficiens/1-3022        785 HAATDLLTPADAAWFLGLCRTP-GKPVCFVPVIDKDVRRWWRSDSLWQSHDER----FDADQVAII 845
S.cerevisiae/1-3938       989 AAREQFLNAQDIDHFLSMCQNPMQKPVPFVPVLDRRFEIFFKKDSLWQSEHLEAVVDQDVQRTCIL 1054
T.lanuginosus/1-3958      1002 EASTQLINAQDVQHFLLLCQRRGQKPVPFVPALDENFEYWFKKDSLWQSEDIEAVYGQDVGRTCIL 1067

M.tuberculosis/1-3069     879 PGTASVAGITRMDEPVGELLDRFEQAAIDEVLGAGVEPK-------DVASRRL-----GRADVAGP 932
M.smegmatis/1-3089        893 PGTAAVAGITRVDEPVGELLDRFEQAAVDEVLGAGAEPV-------EVLSRRQ-----ARRDASGP 946
C.ammoniagenes/1-3063     824 PGPVSVAGITKKNEPVANLLGRFEDATTAALNDAGVAPV-------ELYSRLA-----SAKNA--- 874
C.efficiens/1-3022        846 PGPAAVAGITKANEPVADLLDRFNAASIERITEVHEVER-------------------------DL 886
S.cerevisiae/1-3938       1055 HGPVAAQFTKVIDEPIKSIMDGIHDGHIKKLLHQYYGDDESKIPAVEYFGGESPVDVQSQVDSSS- 1119
T.lanuginosus/1-3958      1068 QGPVAAKYSKVIDEPIKDILDGIHNDHIKFLLRDLYDGKEENVPVIEYFGGRILKATDEEPDIDG- 1132

M.tuberculosis/1-3069     933 LAVVLDAPDVRWAGRTVTNPVHRIADPAEWQVHDGPENPRATHSSTGARLQTHG------------ 986
M.smegmatis/1-3089        947 LAVVLDAPDVLWAGRMSVNPVHRIAAPTEWQVREGSDNRSASHPSTGARLEVAD------------ 1000
C.ammoniagenes/1-3063     875 EEFLRNAPTIMWHGHLIANPAYELPEEAFDIVDDGEG-FAIRINSDSYRDNLPE------------ 927
C.efficiens/1-3022        887 IDELLTAPGTYWAGRNTISMIHRLGDVDAWERD----GETAHHAPTGARLEVED------------ 936
S.cerevisiae/1-3938       1120 --VSEDS---------AVFKATSSTDEESWFKALAGSEINWRHASFLCSFITQDKMFVSNPIRKVF 1174
T.lanuginosus/1-3958      1133 LTASRDANKI--SYRLSNAPSANLPDVDSFMQLIAGNSYSWRHAMFTTEVFVQGHRFQTNPLKRLF 1196

M.tuberculosis/1-3069     987 ----------------D-DVALSVPVSGT------------WVDIRFTLPANTVDGGTPVIATED 1022
M.smegmatis/1-3089        1001 ----------------DQHVVLSVPLSGT------------WIEIRFTLTDVVRSGGAPIVEVDD 1037
C.ammoniagenes/1-3063     928 ----------------EQR----------PF-------YVKHVDIPVALSEAVATGASPVVDDAR 959
C.efficiens/1-3022        937 ----------------TEHVLLTVPLAGSTA-----FGTTTDLVIRFTLPGDTIPGAVPQVTQAD 980
S.cerevisiae/1-3938       1175 KPSQGMVVEISNGNTSSKTVVTLSEPVQG-ELKPTVILKLLKENIIQMEMIENRTMDGKPVSLP-- 1237
T.lanuginosus/1-3958      1197 APTRGMYVEITNPDDPAKTVISVREPSQSAKLVKTVEIKLVGDNEIALTLFEGRTAEGGVVPLT-- 1260

M.tuberculosis/1-3069     1023 ATSAMRTVLAIAAG-------VDSPEFLPAVANGTATL---------TVDWHPER----------- 1061
M.smegmatis/1-3089        1038 AATAMRAVLAIAAG-------VEGPENLPKVVDNTATV---------TVDWDPER----------- 1076
C.ammoniagenes/1-3063     960 LPKAVFDLLAGVAGVGSISETGDKITELPKVIEGSVSEENPYGLVEYSFTLPSTL----------- 1014
C.efficiens/1-3022        981 AEAAMGELTRVAAG-------GT----LATITDGVAEW---------ETTLDASH----------- 1015
S.cerevisiae/1-3938       1238 ----LLYNFNPDNGFAPISEVMEDRNQRIKE----MYWKLWIDEPF-NLDFDPRDVIKGKDFEITA 1294
T.lanuginosus/1-3958      1261 ----FRFTYHPEAGYAPIREVMEGRNDRIKE----FYYRVWFAEKEVPFDTPLTAVFDGGREIVNA 1318

M.tuberculosis/1-3069     1062 --VADHTGVTATFGEPLAP----SLTNVPDALVGPCWPAVFAAIGSAVTD--------TGEPVVEG 1113
M.smegmatis/1-3089        1077 --VADHTGVTATFGAPLAP----TLTVVPDALVGRCWPAVFAAIGSAATE--------AGFPVIEG 1128
C.ammoniagenes/1-3063     1015 --LTAH---TAVTGAALGT----ANAGTPDALVGPCWPAIYTALGTGRLTEEHGEPAGTDFPVIEG 1071
C.efficiens/1-3022        1016 --LADYDNVTAAHLPATVT----PAATAPDVLVGRAWPAVFAAVRSAVIP------GTDSASVVEG 1069
S.cerevisiae/1-3938       1295 KEVYDFTHAVGNNCEDFVSRPDRTMLAPMDFAIVVGWRAIIKAIFPNT--------------VDGD 1346
T.lanuginosus/1-3958      1319 QAVADFVHAVGNTGEAFVDRG-KDFFAPMDFAIVVGWKAITKPIFPRK--------------IDGD 1369
```

```
M.tuberculosis/1-3069     1114 LLSLVHLDHAARVVGQLPTVPA-------QLTVTATAANATDTDMGRVVPVSVVVT-GADGAVIAT 1171
M.smegmatis/1-3089        1129 LLSLVHLDHAARLLAELPKEPA-------EFTVTAKASAATDTEVGRVVPVSVEVRNAADGALLAT 1187
C.ammoniagenes/1-3063     1072 LLNAVHLDHVVDVRVPLHELAKGEKGEGGRIDVTSRCASIAESNSGRIVTVELELWDAATQEVVAT 1137
C.efficiens/1-3022        1070 MLSLVHLEHHIKLTAELPSVADGEV----ALQVTATADEVSDTSMGRVVVVRARIT--AGDQQIAT 1129
S.cerevisiae/1-3938       1347 LLKLVHLSNGYKMIPGAKPLQVGD-----VVSTTAVIESVVNQPTGKIVDVVGTLS--RNGKPVME 1405
T.lanuginosus/1-3958      1370 LLKLVHLSNGYRMVPGAEPLKVGD-----VLDTTAQINAVINQDSGKMVEVCGTLK--RDGKPVMY 1428

M.tuberculosis/1-3069     1172 LEERFAILGRTGSAE------------------------------------------------- 1186
M.smegmatis/1-3089        1188 LEERFAIRGRTGAAE------------------------------------------------- 1202
C.ammoniagenes/1-3063     1138 QMQRFAIRGRATGTS------------------------------------------------- 1152
C.efficiens/1-3022        1130 LSERFAIKGRNGDTV------------------------------------------------- 1144
S.cerevisiae/1-3938       1406 VTSSFFYRGNYTDFENTFQKTVEPVYQMHIKTSKDIAVLRSKEWFQLDDE-DFDLLNKTLTFETET 1470
T.lanuginosus/1-3958      1429 VTSQFLYRGVYTDYENTFQRKDEVPMQLHIATPQDLAVLRSKEWFKLDDQHDIELLGQTLVFRLQS 1494

M.tuberculosis/1-3069     1187 ---------------------------------------------LADPARAGGAVSAN----ATD 1203
M.smegmatis/1-3089        1203 ---------------------------------------------LTDPVRAGGAISDN----ATD 1219
C.ammoniagenes/1-3063     1153 -------------------------------------------VPVSAPSWGGGKSQDK----IET 1171
C.efficiens/1-3022        1145 ---------------------------------------------AR----TNTSTLPT----IID 1157
S.cerevisiae/1-3938       1471 EVTFKNANIFSSVKCFGPIKVELPTKETVEIGIVDYEAGASHGNPVVDFLKRNGSTLEQKVNLENP 1536
T.lanuginosus/1-3958      1495 LVRFKNKNVYSSVQTIGQVLLELPTKEIIQVASVDYEAGESHGNPVIDYLQRHGSSIEQPVNFENP 1560

M.tuberculosis/1-3069     1204 TPRRRRRDVTITAPVDMRPFAVVSGDHNPIHTDRAAALLAGLESPIVHGMWLSAAAQHAVTA---T 1266
M.smegmatis/1-3089        1220 TPRRRRRDVTVGAPVDMRPFAVVSGDHNPIHTDRAAALLAGLEGPIVHGMWLSAAAQHVVTA---T 1282
C.ammoniagenes/1-3063     1172 TPRSFVDRAIVTAPSDMTPFALVSGDYNPIHTSTNAARLVNLDAPLVHGMWLSATAQHLAGN---- 1233
C.efficiens/1-3022        1158 TPRSHRAVAEVVAPESMRPFAVVSGDRNPIHVSDTAAALAGLPGVIVHGMWTSAIGELIAGAEFTD 1223
S.cerevisiae/1-3938       1537 IPIAV---LDSYTPSTNEPYARVSGDLNPIHVSRHFASYANLPGTITHGMFSSASVRALIENW--- 1596
T.lanuginosus/1-3958      1561 IPLSGKTPLELRAPASNENYARVSGDYNPIHVSRVFSSYANLPGTITHGMYTSAAVRSLVETW--- 1623

M.tuberculosis/1-3069     1267 DGQARPPARLVGWTARFLGMVRPGDEVDFRVERVGIDQG---AEIVDVAARVGSDLVMSASARLAA 1329
M.smegmatis/1-3089        1283 DGKPVPPAKLIGWTARFLGMVKPGDQVDFRVDRVGIDVG---AEVLEVSARIGSELVMAATARLAA 1345
C.ammoniagenes/1-3063     1234 ------HGTVVGWTYSMYGMVQLNDEVEITVERVGRKG---IHAAFEVTCRIDGEVVSRGQALMAQ 1290
C.efficiens/1-3022        1224 EQAHTPAARVVEYTATMLAPVMPGETIVFTVERSAVDSRPGHGEVRSVTATVNGNLVLTATAVMAA 1289
S.cerevisiae/1-3938       1597 -AADSVSSRVRGYTCQFVDMVLPNTALKTSIQHVGMINGRKLIK-FETRNED-DVVVLTGEAEIEQ 1659
T.lanuginosus/1-3958      1624 -AAENNIGRVRSYHVNMVGMVLPNDAITVKLEHVGMIAGRKIIK-VDARNKDTDESVLQGEAEVEQ 1687

M.tuberculosis/1-3069     1330 PKTVYAFPGQGIQHKGMGMEVRARSKAARKVWDTADKFTRDTLGFSVLHVVRDNPTSIIAS----- 1390
M.smegmatis/1-3089        1346 PKTVYAFPGQGIQHKGMGMEVRARSKAARKVWDSADKFTRETLGFSVLHVVRDNPTSLIAS----- 1406
C.ammoniagenes/1-3063     1291 PRTAYVYPGQGIQAEGMGRGDRDASAAAREVWRRADRHTRTALGFSIRQIIDDNPTELVVR----- 1351
C.efficiens/1-3022        1290 PTTFYAFPGQGIQSQGMGMESRRNSAAARAIWDRADAHTRAKLGFSILEIVENNPTEVTVG----- 1350
S.cerevisiae/1-3938       1660 PVTTFVFTGQGSQEQGMGMDLYKTSKAAQDVWNRADNHFKDTYGFSILDIVINNPVNLTIHFGGEK 1725
T.lanuginosus/1-3958      1688 PVTAYVFTGQGSQEQGMGMDLYATSPVAKEVWDRADKHFRENYGFSIIDIVKNNPKELTVHFGGPR 1753

M.tuberculosis/1-3069     1391 ------------------------------------GVHYHHPDGVLYLTQFTQVAMATVAAAQVA 1420
M.smegmatis/1-3089        1407 ------------------------------------GVHYHHPDGVLFLTQFTQVAMATVAAAQVA 1436
C.ammoniagenes/1-3063     1352 ------------------------------------GTKFVHPNGVLHLTQFTQVALAVVAYAQTE 1381
C.efficiens/1-3022        1351 ------------------------------------GEKFFHPDGVLFLTQFTQVGMATLGVAQVA 1380
S.cerevisiae/1-3938       1726 GKRIRENYSAMIFETI-VDGKLKTEKIFKEINEHSTSYTFRSEKGLLSATQFTQPALTLMEKAAFE 1790
T.lanuginosus/1-3958      1754 GKIIRQNYMSMTFETVNADGSIKTEKIFKEVDENSTSYTYRSPSGLLSATQFTQPALTLMEKASFE 1819

M.tuberculosis/1-3069     1421 EMREQGAFVEGAIACGHSVGEYTALACVTGIYQLEALLEMVFHRGSKMHDIVPRDELGRSNYRLAA 1486
M.smegmatis/1-3089        1437 EMREQGAFVEGAIACGHSVGEYTALACVSGVYELEALLEVVFHRGSKMHDIVPRDELGRSNYRLAA 1502
C.ammoniagenes/1-3063     1382 RLREADALGTNSMYAGHSLGEYTALASLANIFDLEAVIDIVYSRGSAMGTLVERDENGNSNYGMGA 1447
C.efficiens/1-3022        1381 EIREAHALNQQAFFAGHSVGEYNALAAYAGVLSLESVVEIVYRRGLTMHRLVDRDENGLSNYGLAA 1446
S.cerevisiae/1-3938       1791 DLKSKGLIPADATFAGHSLGEYAALASLADVMSIESLVEVVFYRGMTMQVAVPRDELGRSNYGMIA 1856
T.lanuginosus/1-3958      1820 DMRSKGLVQRDSTFAGHSLGEYSALVALADVMPIESLVSVVFYRGLTMQVAVERDEQGRSNYAMCA 1885

M.tuberculosis/1-3069     1487 IRPSQIDLDD--ADVPAFVAGIAESTGEFLEIVNFNLRGSQYAIAGTVRGLEALEAEVER------ 1544
M.smegmatis/1-3089        1503 IRPSQIDLDD--ADVKDFVAEISERTGEFLEIVNFNLRGSQYAIAGTVAGLEALEEEIER------ 1560
C.ammoniagenes/1-3063     1448 LRPNMIGVPA--DQVEAYIAQTAEETGEFLEIVNYNIAGQQYSIAGTKAGLAALKKKANS------ 1505
C.efficiens/1-3022        1447 LRPNKMGLTA--DDVFDYVAGVAEQSGEFLEIVNYNLAGLQYAVAGTQAGLKALRADVEH------ 1504
S.cerevisiae/1-3938       1857 INPGRVAASFSQEALQYVVERVGKRTGWLVEIVNYNVENQQYVAAGDLRALDTVTNVLNFIKLQKI 1922
T.lanuginosus/1-3958      1886 VNPSRISPTFTEQALQYVVENIAEVTGWLLEIVNYNVANMQYVAAGDLRALDTLANVLNILKMQKI 1951

M.tuberculosis/1-3069     1545 ------------------------------RRELTGGRR--SFILVPGIDVPFHSRVLRVGVAEF 1577
M.smegmatis/1-3089        1561 ------------------------------RRQITGGKR--SFILVPGIDVPFHSSVLRVGVADF 1593
C.ammoniagenes/1-3063     1506 ----------------------------------VKDR--AYVTVPGIDVPFHSQVLRDGVPAF 1533
C.efficiens/1-3022        1505 ------------------------------RA---PGQR--AFIMIPGIDVPFHSSKLRDGVGAF 1534
S.cerevisiae/1-3938       1923 DIIELQKSLSLEEVEGHLFEIIDEASKKSAVKPRPLKLERGFACIPLVGISVPFHSTYLMNGVKPF 1988
T.lanuginosus/1-3958      1952 DIQALMQSMSLEDVRAHLVEIIQECRKQTEAKPQPVQLERGFATIPLRGIDVPFHSTFLRSGVKPF 2017

M.tuberculosis/1-3069     1578 RRSLDR-VMPRDADPDLIIGRYIPNLVPRLFTLDRDFIQEIRDLVPAEPLDEILADYDTWL----R 1638
M.smegmatis/1-3089        1594 RRSLER-VMPRDKDPELIIGRYIPNLVPRPFTLDRDFIQEIRDLVPAEPLDEVLADYDTWR----N 1654
C.ammoniagenes/1-3063     1534 AEKLDE-LLPETLDLDALVGRYVPNLVALPFELTQEFVDKVKPLAPSGKLDNLKVED--------- 1589
C.efficiens/1-3022        1535 REHLDS-LIPAELDLETLVGRYIPNLVARPFELTREFVESMAEVVDSRYVNDILADFEAAA----R 1595
S.cerevisiae/1-3938       1989 KSFLKKNIIKENVKVARLAGKYIPNLTAKPFQVTKEYFQDVYDLTGSEPIKEIIDNWEKYEQSMKP 2054
T.lanuginosus/1-3958      2018 RSFLLKKINKTTIDPSKLIGKYIPNVTAKPFEISKEYFEEVHRLTGSPKIANILANWDKYEERMRP 2083
```

```
M.tuberculosis/1-3069     1639 ERPREMARTVFIELLAWQFASPVRWIETQDLLFIEEAAGGLGVERFVEIGVKSSPTVAGLATNTLK 1704
M.smegmatis/1-3089        1655 EKPKELCRKVVIELLAWQFASPVRWIETQDLLFIEEAAGGLGVERFVEIGVKSAPTVAGLATNTLK 1720
C.ammoniagenes/1-3063     1590 TDEQAPSRLLMIELLSWQFASPVRWIETQQLLFEE-------VDQIIEVGLASSPTLTNLAKRSMD 1648
C.efficiens/1-3022        1596 EE-QKLARTLLIELLAWQFASPVRWIETQDLLIRSREQGGLGVERFVEVGVGSAPTVANMMGQTLN 1660
S.cerevisiae/1-3938       2055 EVEQELAHILLTELLAYQFASPVRWIETQDVFLKDF-----NTERVVEIG--PSPTLAGMAQRTLK 2113
T.lanuginosus/1-3958      2084 EVEQELAYTLLVELLAYQFAMPVRWIETQDVILAEK-----RTERIVEIG--PSDTLGGMARRTLQ 2142

M.tuberculosis/1-3069     1705 LPEYAH-----STVEVLNAERDAAVLFATDTDPEPE---P-EEDEPVAESPAPDVV---------- 1751
M.smegmatis/1-3089        1721 LPEYSH-----STVEVLNSERDAAVLFATDTDPEPE---P-EADEPTADAPAEAAP---------- 1767
C.ammoniagenes/1-3063     1649 IAG--------VDLPVFNVERDQDQVMLQDVQEAPAASFDVEEGEATSSTAASETPGESAAAASDN 1706
C.efficiens/1-3022        1661 LPQYRE-----AEIEVLNIERDRPVVFATDEVVRELASEPADADSSSVDTPATEGT---------- 1711
S.cerevisiae/1-3938       2114 NKYESYDAALSLHREILCYSKDAKEIYYTPD-PSELA----AKEEPAKEEAPAPTP---------- 2164
T.lanuginosus/1-3958      2143 SKYEAYDAATSVQRQILCYCKDAKEIYYDVE-PIEDE----PEPTPAAASSADAAP---------- 2193

M.tuberculosis/1-3069     1752 ----------SEA----APVAPAASSAGPRPDDLVFDAADATLALIALSAKMRIDQIEELDSIESI 1803
M.smegmatis/1-3089        1768 ----------AAAAAPAPVAAPAAPSGGPRPDDITFDAADATVALIALSAKMRIDQIEALDSIESI 1823
C.ammoniagenes/1-3063     1707 TQAIPSAEPQTVAEAPAPSAAPAGGTRAADAPDLPFTAAEAIMVLFAFQNKIRQDQINDSDTVEEL 1772
C.efficiens/1-3022        1712 -QVA---ATAAPEAAPAAVPAAPVATGGPRPEDIEFTPADATEMLIAIWTKVRPDQMGATDSIETL 1773
S.cerevisiae/1-3938       2165 --AASAPAP--AAAAPAPVAAAAPAAAAAEIADEPVKASLLLHVLVAHKLKKSLDSIPMSKTIKDL 2226
T.lanuginosus/1-3958      2194 --AAAPAAP--AAPAAAPAPAPASAGPAAPVQDAPVTATDVIRALVAQKLKKELTEIPPSKAIKDL 2255

M.tuberculosis/1-3069     1804 TDGASSRRNQLLVDLGSELNLGAIDGAAESDLAGLRSQVTKLARTYKPYGPVLSDAINDQLRTVLG 1869
M.smegmatis/1-3089        1824 TDGASSRRNQLLVDLGSELNLGAIDGAAEADLGALKGQVTKLARTYKPFGPVLSDAINDQLRTVLG 1889
C.ammoniagenes/1-3063     1773 TNGVSSRRNQLLMDMSAENRVPAIDGAADADVATLRERVKTAAPGYSPFGTVLSEAITARLRQLTG 1838
C.efficiens/1-3022        1774 VEGVSSRRNQLLLDLGVEFGLGAIDGAADAELGDLKVTVSKMAKGYQAFGPVLSDAAADALRRITG 1839
S.cerevisiae/1-3938       2227 VGGKSTVQNEILGDLGKEFGTTPEKP-EETPLEELAE---TFQDTFSGALGKQSSSLLSRLISSKM 2288
T.lanuginosus/1-3958      2256 VGGKSTLQNEILGDLGKEFGSTPEKP-EDTPLDELGA---SMQATFDGQLGKQSSSLIARFVSSKM 2317

M.tuberculosis/1-3069     1870 PSGKRPGAIAERVKKTWELGEGWAKHVTVEVALGTREGSSVRGGAMGHLHEGALADAASVDKVIDA 1935
M.smegmatis/1-3089        1890 PSGKRPAYITERVTKTWELGPGWAKHVTVEFALGTREGSSVRGGDLGGLHAGALASAADVDKVIDG 1955
C.ammoniagenes/1-3063     1839 AAGVKPAYISERVTGTWGLPMSWAAHVEAEILLGSREEDSVRGGSLSTVPS-AASSKADVDALVDA 1903
C.efficiens/1-3022        1840 PTGKRPAYIAERVTGTWQLGQGWADHVVAEVVIGAREGASLRGGDLATLAPAAPSSAAELDALIDA 1905
S.cerevisiae/1-3938       2289 PGGFTITVARKYLQTRWGLPSGRQDGVLLV--------------ALSNEPAARLGSEADAKAFLDS 2340
T.lanuginosus/1-3958      2318 PGGFNITAVRKYLETRWGLGPGRQDGVLLF--------------AITAEPPSRLGSEADAKAYFDN 2369

M.tuberculosis/1-3069     1936 AVASVAARQGVSVALPSA-G-SGGGA------TIDAAALSEFTDQITGREGVLASAARLVLGQL-- 1991
M.smegmatis/1-3089        1956 AVAAVAARRGISVSLPSA-G-GASGG------VVDSAALGEFAEKVTGPDGVLASAARLVLNQL-- 2011
C.ammoniagenes/1-3063     1904 AVQAVAAAHGTSVSHGAASG-AGGGG------VVDSAALDAYADIVTGENGVLATAARQVLAQL-- 1960
C.efficiens/1-3022        1906 AVAAVAARLGVAVSLPSA-G-GAAGG------VVDSAALGEFAEQVTGKAGVLAATARTILSQL-- 1961
S.cerevisiae/1-3938       2341 MAQKYASIVGVDLSSAASASGAAGAGAAAGAAMIDAGALEEI----TKDHKVLARQQLQVLARYLK 2402
T.lanuginosus/1-3958      2370 LANKYASYAGITLSSPSSG---GDGGAAGGAMLMDPAAIDAL----TKDQRALFKQQLEIIARYLK 2428

M.tuberculosis/1-3069     1992 -GLDDPVNA--LPAA---PDSELIDLVTAELGADWPRLVAPVFDPKKAVVFDDRWASAREDLVKLW 2051
M.smegmatis/1-3089        2012 -GLSDVTT--PEAA---TDAELIDLVTAELGSDWPRLVAPTFDARKAVVFDDRWASAREDLVKLW 2071
C.ammoniagenes/1-3063     1961 -GLVEEAP---ETPE---TDNTLFATVEAELGSGWEKTVTPSFDAKRAVLFDDRWASAREDLARVA 2019
C.efficiens/1-3022        1962 -GLDAPAQAAFEEAE---SDNELYELVSRELGSDWPRQVAPSFDADRVVQIDDRWASAREDLTRVA 2023
S.cerevisiae/1-3938       2403 MDLDNGERKFLKEKDTVAELQAQLDYLNAELGEFFVNGVATSFSRKKARTFDSSWNWAKQSLLSLY 2468
T.lanuginosus/1-3958      2429 MDLRAGDKAFVASQESQKALQAQLDLWQAEHGDIYAAGIEPAFDPLKARVYDSSWNWARQDALSMY 2494

M.tuberculosis/1-3069     2052 LTDEGD----IDAD------------------W---------------PRLAER-----FEGAGHV 2075
M.smegmatis/1-3089        2072 LAEEGD----IDAQ------------------W---------------EQLSQR-----FEGTGHV 2095
C.ammoniagenes/1-3063     2020 LGEIDL----P-----------------------------------------VKR-----FQGTGET 2036
C.efficiens/1-3022        2024 LGELDE----ADI-----------------------------------------D-----VTGAGEV 2040
S.cerevisiae/1-3938       2469 FEIIHGVLKNVDREVVSEAINIMNRSNDALIKFMEYHISNTDETKGENYQLVKTLGEQLIENCKQV 2534
T.lanuginosus/1-3958      2495 YDIIFGRLRVVDREIVSQCIQIMNRSNPLLLEFMQYHIDHCPTERGETYQLAKELGQQLIENCKEV 2560

M.tuberculosis/1-3069     2076 VAT-----------------------------------QATWWQGKSLAAGR------------QI 2094
M.smegmatis/1-3089        2096 VAT-----------------------------------QANWWQGKALAAGR------------NV 2114
C.ammoniagenes/1-3063     2037 IAK-----------------------------------QAEWWAENTAASTGAH--------AKAT 2059
C.efficiens/1-3022        2041 VAV-----------------------------------QAEYLGLDALA----------------- 2054
S.cerevisiae/1-3938       2535 LDVDPVYKDVAKPTGPKTAIDKNGNITYSEEPREKVRKLSQYVQE--MALGGPITKESQP-TIEED 2597
T.lanuginosus/1-3958      2561 LGKPPVYKDVSIPTGPQTTIDARGNIQYQEVPRASARKFEHYVKQ--MAEGGPISQYSNRTKVQND 2624

M.tuberculosis/1-3069     2095 HASLY------------------------------------------------------------ 2099
M.smegmatis/1-3089        2115 HASLF------------------------------------------------------------ 2119
C.ammoniagenes/1-3063     2060 AAETL------------------------------------------------------------ 2064
C.efficiens/1-3022           ------------------------------------------------------------
S.cerevisiae/1-3938       2598 LTRVYKAISAQADKQDISSSTRVEFEKLYSDLMKFLESSKEIDPSQTTQLAGMDVEDALDKDSTKE 2663
T.lanuginosus/1-3958      2625 LRSVYKLIRRQ---HRLSKSSQLQFNALYKDVIRALAMNESQ----IM-------QDGKDRRRGRN 2676

M.tuberculosis/1-3069     2100 ----------------------------------------------GRIAAGAENPEPGRYGGE 2117
M.smegmatis/1-3089        2120 ----------------------------------------------GRIAAGAENPGKGRYSDE 2137
C.ammoniagenes/1-3063     2065 ----------------------------------------------HAIAAAAREELDGEFAGD 2082
C.efficiens/1-3022        2055 ----------------------------------------------EQARDTAALEYADD 2068
S.cerevisiae/1-3938       2664 VASLPNKSTISKTVSSTIPRETIPFLHLRKKTPAGDWKYDRQLSSLFLDGLEKA--AFNGVTFKDK 2727
T.lanuginosus/1-3958      2677 -------GNGNGNHSRPGKVETIPFLHLRKKDEFGNWEYSKKLTGIYLDGLEAA--ARSGLTFQGK 2733
```

```
M.tuberculosis/1-3069     2118 VAVVTGASKGSIAASVVARLLDGGATVIATTSKLDEERLAFYRTLYRDHARYGAALWLVAANMASY 2183
M.smegmatis/1-3089        2138 VAVVTGASKGSIAASVVGQLLDGGATVIATTSRLDDDRLAFYKQLYRDHARFDATLWVVPANMASY 2203
C.ammoniagenes/1-3063     2083 VALVTGAAPGSIATALVERLLEGGATVIMTASRVSQSRKEFARKLYAAHAIPGAALWVVPANLRSY 2148
C.efficiens/1-3022        2069 VAVVTGGSPNSIAAAVVEKLLAGGATVVATTSSLNHDRLEFYKELYARSARGTAALWVVPANLSSY 2134
S.cerevisiae/1-3938       2728 YVLITGAGKGSIGAEVLQGLLQGGAKVVVTTSRFSKQVTDYYQSIYAKYGAKGSTLIVVPFNQGSK 2793
T.lanuginosus/1-3958      2734 HALMTGAGAGSIGAEVLQGLLSGGAKVIVTTSRFSRQVTEYYQGIYARCGARGSQLVVVPFNQGSK 2799

M.tuberculosis/1-3069     2184 SDVDALVEWIGTEQT-ESLGPQSIHIKDAQTPTLLFPFAAPRV-VGDLSEAGSRAEMEMKVLLWAV 2247
M.smegmatis/1-3089        2204 SDIDKLVEWVGTEQT-ESLGPQSIHLKDAQTPTLLFPFAAPRV-AGDMSEVGSRAEMEMKVLLWAV 2267
C.ammoniagenes/1-3063     2149 RDVDALIDWIGNEQR-ASVGNEVKITKPALTPTLAFPFAAPSV-SGSVADAGPQAENQTRLLLWSV 2212
C.efficiens/1-3022        2135 TDIDAIVNWIGTEQT-ATVNGKSKLIKPAMIPTLLFPFAAPRV-SGSMADAGGQTEAQMRLLLWSV 2198
S.cerevisiae/1-3938       2794 QDVEALIEFIYDTEKNGGLGWD---------LDAIIPFAAIPEQGIELEHIDSKSEFAHRIMLTNI 2850
T.lanuginosus/1-3958      2800 QDVEALVNYIYDTK--NGLGWD---------LDYVVPFAAIPENGREIDSIDSKSELAHRIMLTNL 2854

M.tuberculosis/1-3069     2248 QRLIGGLSTIGAERDIASRL-HVVLPGSPNRGMFGGDGAYGEAKSALDAVVSRWHAE-SSWAARVS 2311
M.smegmatis/1-3089        2268 QRLISGLSKIGAERDIASRL-HVVLPGSPNRGMFGGDGAYGEAKSALDALENRWSAE-KSWAERVS 2331
C.ammoniagenes/1-3063     2213 ERTIAGLSNLA-QQGVDTRC-HIVLPGSPNRGMFGGDGAYGEVKAALDAILAKWSAE-AGWPEGVT 2275
C.efficiens/1-3022        2199 ERLIVGLAPLGADTRVGHRL-HVVIPGSPNRGRFGGDGAYGESKAALDAVVTRWNAEQSAWGAHTS 2263
S.cerevisiae/1-3938       2851 LRMMGCVKKQKSARGIETRPAQVILPMSPNHGTFGGDGMYSESKLSLETLFNRWHSE--SWANQLT 2914
T.lanuginosus/1-3958      2855 LRLLGAIKTQKKERGYETRPAQVILPLSPNHGTFGNDGLYSESKLALETLFNRWYSE--SWGNYLT 2918

M.tuberculosis/1-3069     2312 LAHALIGWTRGTGLMGHNDAIVAAVEEAGVTTYSTDEMAALLLDLCDAESKVAAARSPIKADLTGG 2377
M.smegmatis/1-3089        2332 LAHALIGWTKGTGLMGQNDAIVSAVEEAGVTTYTTDEMAAMLLDLCTVETKVAAAGAPVKVDLTGG 2397
C.ammoniagenes/1-3063     2276 LAQAKIGWVSGTSLMGGNDVLIPAAEAAGIHVWDPEEISSQLISLASEESRAKAAEAPLELDLTGG 2341
C.efficiens/1-3022        2264 LVHAHIGWVRGTGLMGGNDPLVAAAEEAGVETYSTGEIAEKLISQVAAEVREEAAQSPITVDFTGG 2329
S.cerevisiae/1-3938       2915 VCGAIIGWTRGTGLMSANNIIAEGIEKMGVRTFSQKEMAFNLLGLLTPEVVELCQKSPVMADLNGG 2980
T.lanuginosus/1-3958      2919 ICGAVIGWTRGTGLMSANNLVAEGVEKLGVRTFSQQEMAFNLLGLMAPAIVNLCQSDPVFADLNGG 2984

M.tuberculosis/1-3069     2378 LAEANLDMAELAAKAREQMSAAAAVDE---------D-----AEAPGAIAALPSPPRGFTPA---- 2425
M.smegmatis/1-3089        2398 LGDIKIDMAELAAKAREEMSGAADESD---------D-----EAPAGTIRALPSPPRGYNPA---- 2445
C.ammoniagenes/1-3063     2342 LGSSNISISELAAQAREDAEAQAASGD---------NADAAAEAPAATIPALPNTRSVELPAAL-- 2396
C.efficiens/1-3022        2330 LGESDINLAEMARALEQA------PAE---------E-----MDKPRTIAALPTPYRPIVQT---- 2371
S.cerevisiae/1-3938       2981 LQFVP-ELKEFTAKLRKELVETSEVRKAVSIETALEHKVVNGNSADAAYAQVEIQPRANIQLDFPE 3045
T.lanuginosus/1-3958      2985 LQFIP-DLKGLMTKLRKEIMETSAIRQAVIKETAIENKVVNGEDHEALYRRVITEPRANLKYPFPE 3049

M.tuberculosis/1-3069     2426 ---------PPPQWDDLDVDPADLVVIVGGAEIGPYGSSRTRFEMEVE------NELSAAGVLELA 2476
M.smegmatis/1-3089        2446 ---------PAPEWDDLDVDPADLVVIVGGAELGPYGSSRTRFEMEVS------GELSAAGVLELA 2496
C.ammoniagenes/1-3063     2397 ---------PEGEVGDVTTDLDDMVVIAGVGEVSSWGSGRTRFEAEYGLQRDGAVDLTAAGVLELA 2453
C.efficiens/1-3022        2372 ---------TPDFDGQVTQSLDGMVVIVGAGELGPVGSARTRFDVEVS------GELSAAGVIELA 2422
S.cerevisiae/1-3938       3046 LKPYKQVKQIAPAELEGLLDLERVIVVTGFAEVGPWGSARTRWEMEAF------GEFSLEGCVEMA 3105
T.lanuginosus/1-3958      3050 LPDWDKDIKPLNDQLRGMVNLDKVVVVTGLAEIGPWGNARTRWEMEAY------GKFSLEGCVEMA 3109

M.tuberculosis/1-3069     2477 WTTGLIRWEDD-----PQPGWYDTESGEMVDESELVQRYHDAVVQRVGIREFVDDGAID-PDHASP 2536
M.smegmatis/1-3089        2497 WTTGMVKWEDD-----PKAGWYDTETGELVPECEIVERYHDAVVERCGIREFVDDGAID-PDHASP 2556
C.ammoniagenes/1-3063     2454 WMTGLISWSND-----PRPAWYDEEGT-EVDEADIYARFRDEVVARSGIRTLTDK--YNMVDQGSI 2511
C.efficiens/1-3022        2423 WTTGLIHWDED-----PTPGWYDANDE-AIAEEDIYERFHDEVLARVGVRRYHDMPAYGMFDNFAP 2482
S.cerevisiae/1-3938       3106 WIMGFISYHNGNLKGRPYTGWVDSKTKEPVDDKDVKAKYETSILEHSGIRLIEPELFNGYNPEKKE 3171
T.lanuginosus/1-3958      3110 WMMGLIKNHNGPLKGKPYSGWVDAKTGEPVDDKDVKAKYEKYILEHSGIRLIEPELFGGYDPNRKQ 3175

M.tuberculosis/1-3069     2537 LLVSVFLEKDFAFVVSSEADARAFVEFDPEHTVIRPVPDSTDWQVIRKAGTEIRVPRKTKLSRVVG 2602
M.smegmatis/1-3089        2557 LLVSVFLDKDFTFVVSSEADARAFVQFDPEHTVARPLPDSSDWEVTRKAGTEIRVPRKTKLSRTVG 2622
C.ammoniagenes/1-3063     2512 DLTSVFLDRDIVFTVPTEQEALDIEEADPSFTKLR--EVDGEWEVTRLKGATARVPRKATLTRTVA 2575
C.efficiens/1-3022        2483 ELTTVYLDHDLTFSVGSREEALTYVESEPELTTASYNEADGEWSVTRKAGSAIRVPRRMAMIRFVG 2548
S.cerevisiae/1-3938       3172 MIQEVIVEEDLEPFEASKETAEQFKHQHGDKVDIFEIPETGEYSVKLLKGATLYIPKALRFDRLVA 3237
T.lanuginosus/1-3958      3176 LLQEVVIEQDLEPFEASKEQAEEFKREHGDKVEIFEIPETGQYTVRLRKGATLLIPKALQFDRLVA 3241

M.tuberculosis/1-3069     2603 GQIPTGFDPTVWGISADMAGSIDRLAVWNMVATVDAFLSSGF-SPAEVMRYVHPSLVANTQGTGMG 2667
M.smegmatis/1-3089        2623 AQIPTGFDPTVWGISPDMASSIDRVALWNIVATVDAFLSSGF-TPTELMRWVHPSQVASTQGTGMG 2687
C.ammoniagenes/1-3063     2576 GQMPDHFDAAKWGIPDHMLDALDRMAVWNLVTAVDAFTQAGF-SPAELLQVIHPAQVATTQGTGIG 2640
C.efficiens/1-3022        2549 GQVPKDFDPAVWGIPADMIDNLDTVALWNIVCTVDAFLSSGF-DPAELLAAIHPARVSSTQGTGMG 2613
S.cerevisiae/1-3938       3238 GQIPTGWNAKTYGISDDIISQVDPITLFVLVSVVEAFIASGITDPYEMYKYVHVSEVGNCSGSGMG 3303
T.lanuginosus/1-3958      3242 GQIPTGWDARRYGVPEDIIQQVDPVTLYVLVSVAEALLSSGITDPYEFYKYVHLSEVGNCIGSGVG 3307

M.tuberculosis/1-3069     2668 GGTSMQTMYHGNLLGRNKPNDIFQEVLPNIIAAHVVQSYVGSYGAMIHPVAACATAAVSVEEGVDK 2733
M.smegmatis/1-3089        2688 GMTSMQTMYHGNLLGRAKPNDILQEVLPNVVAAHVMQSYVGGYGAMVHPVGACATAAVSVEEGVDK 2753
C.ammoniagenes/1-3063     2641 GMESLHKVFVTRLLGEDRPSDILQEALPNVIAAHTMQSLVGGYGSMIHPIGACATAAVSIEEGVDK 2706
C.efficiens/1-3022        2614 GMESLRGIYVDRLLAEPRANDVLQEALPNVVAAHVMQSYVGGYGQMIHPVAACATAAVSVEEGLDK 2679
S.cerevisiae/1-3938       3304 GVSALRGMFKDRFKDEPVQNDILQESFINTMSAWVNMLLISSSGPIKTPVGACATSVESVDIGVET 3369
T.lanuginosus/1-3958      3308 GTSALRGMYKDRYLDKPVQKDILQESFVNTMAAWVNMLLLSSTGPIKTPVGACATAVESLDVGYDT 3373

M.tuberculosis/1-3069     2734 IRLGKAQLVVAGGLDDLTLEGIIGFGDMAATADTSMMCGRGIHDSKFSRPNDRRRLGFVEAQGGGT 2799
M.smegmatis/1-3089        2754 IKLGKADLVIAGGFDDLTLEAIIGFGDMAATADTEMMRAKGISDSKFSRANDRRRLGFLEAQGGGT 2819
C.ammoniagenes/1-3063     2707 IALGKADLVVAGGIDDVQVESLTGFGDMNATAETKKMTDQGIDDRFISRANDRRRGGFLEAEGGGT 2772
C.efficiens/1-3022        2680 IRVGKADFVVTGGFDTLSVEGITGFGDMAATADSAEMERKGIEHRFFSRANDRRRGGFIESEGGGT 2745
S.cerevisiae/1-3938       3370 ILSGKARICIVGGYDDFQEEGSFEFGNMKATSNTLEEFEHGRTPAEMSRPATTTRNGFMEAQGAGI 3435
T.lanuginosus/1-3958      3374 IMQGKARVCLVGGFDDFQEEGSYEFANMGATSNAKEEFARGREPGEMSRPTSTTRNGFMESQGCGV 3439
```

```
M.tuberculosis/1-3069     2800 ILLARGDLALRMGLPVLAVVAFAQSFGDGVHTSIPAPGLGALGAGRGGK---------------- 2848
M.smegmatis/1-3089        2820 ILLARGDLALKMGLPVLAVVGYAQSFADGVHTSIPAPGLGALGAARGGR---------------- 2868
C.ammoniagenes/1-3063     2773 VLLVRGSLAREMGLPVYAVVAHEASY--GAHTSIPAPGLGALGAGRGRK---------------- 2819
C.efficiens/1-3022        2746 ILLARASLAADMGLPVLGVVGFAESFADGAHTSIPAPGLGALSAARDGV---------------- 2794
S.cerevisiae/1-3938       3436 QIIMQADLALKMGVPIYGIVAMAATATDKIGRSVPAPGKGILTTAREHHSSVKYASPNLNMKYRKR 3501
T.lanuginosus/1-3958      3440 QVIMTAQLALEMGVPIYGIVAMTSTATDKIGRSVPAPGQGVLTTAREKS--GNFPSPLLDIKYRRR 3503

M.tuberculosis/1-3069     ------------------------------------------------------------------------
M.smegmatis/1-3089        ------------------------------------------------------------------------
C.ammoniagenes/1-3063     ------------------------------------------------------------------------
C.efficiens/1-3022        ------------------------------------------------------------------------
S.cerevisiae/1-3938       3502 QLVTREAQIKDWVENELEALKLEAEEIP--------SEDQNEFLLERTREIHNEAESQLRAAQQQW 3559
T.lanuginosus/1-3958      3504 QLELRRQQIKQWKESEYLYLQEEVAAIKSQRSEEDGPFDETAYLRERTEHIEREARRQEAEAQTSF 3569

M.tuberculosis/1-3069     2849 ----------DSPLARALAKLGVAADDVAVISKHDTSTLANDPNETELHERLADALGRSEGAPLFV 2904
M.smegmatis/1-3089        2869 ----------ESTLARSLAQLGVGADDIAVISKHDTSTLANDPNETELHERIADSMGRAPGNPLFI 2924
C.ammoniagenes/1-3063     2820 ----------NSRLAKGLAGLGLTPNDVSVLSKHDTSTNANDPNESELHSILWPAIGRDVDQPLFV 2875
C.efficiens/1-3022        2795 ----------ESRLVHALAEVGVTADEISIISKHDTSTNANDPNESDMHERIAAAIGRTPGNPLYV 2850
S.cerevisiae/1-3938       3560 GNDFYKRDPRIAPLRGALATYGLTIDDLGVASFHGTSTKANDKNESATINEMMKHLGRSEGNPVIG 3625
T.lanuginosus/1-3958      3570 GNEFWRRDSRIAPLRGALATWGLTIDDLGVASFHGTSTVANDKNESDVICQQLKHLGRTKGNAVLG 3635

M.tuberculosis/1-3069     2905 VSQKSLTGHAKGGAAVFQMMGLCQILRDGVIPPNRSLDCVDDELAG-SAHFVWVRDTLRLGG-KFP 2968
M.smegmatis/1-3089        2925 VSQKTLTGHAKGGAAVFQMMGLCQILRDGVIPPNRSLDCVDDELAT-SGHFVWVREPLDLRG-KFP 2988
C.ammoniagenes/1-3063     2876 ISQKSLTGHSKAGAALFQTGGLIDVFRTGRIPANLSLDCVDPLIEPKATNLVWLRSPLDVEAANRP 2941
C.efficiens/1-3022        2851 VSQKSLTGHAKGGAAAFQLIGLTQVLRSGIVPANRALDCVDPVLAR-HQHLVWLRKPLDLSS-KAP 2914
S.cerevisiae/1-3938       3626 VFQKFLTGHPKGAAGAWMMNGALQILNSGIIPGNRNADNVDKILEQ-FEYVLYPSKTLKTDG---- 3686
T.lanuginosus/1-3958      3636 IFQKYLTGHPKGAAGAWMLNGCLQVLNTGIVPGNRNADNVDKVMEQ-FDYIVYPSRSIKTDG---- 3696

M.tuberculosis/1-3069     2969 LKAGMLTSLGFGHVSGLVALVHPQAFIASLDPAQR----ADYQRRADARLLAGQRRLASAIAGGAP 3030
M.smegmatis/1-3089        2989 LKAGLVTSLGFGHVSGLVALVHPEAFIAALDPSER----EDYRTRAEQRMLAGQRRLVSAIAGGRP 3050
C.ammoniagenes/1-3063     2942 VKAAALTSLGFGHVGALIVYAHPGVFEAAVAQQVSAEAAAEWREKANARLAAGAARFEAGMIGKET 3007
C.efficiens/1-3022        2915 -KAGLVTSLGFGHVSALVAVVHPDAFHEAVRVERGDDAAEQWRAAATAREDAGLRRIVAGMHGG-V 2978
S.cerevisiae/1-3938       3687 VRAVSITSFGFGQKGGQAIVVHPDYLYGAITEDRY----NEYVAKVSAREKSAYKFFHNGMIYNKL 3748
T.lanuginosus/1-3958      3697 IKAFSVTSFGFGQKGAQAIGVHPKYLFATLDKAQY----EAYCVKVQARQKKAYRFFHNGLINNKL 3758

M.tuberculosis/1-3069     3031 MYQRPGDRRFDHHAPE-RPQEASML-LNPAARLGD----G-EAYI----G---------------- 3069
M.smegmatis/1-3089        3051 MYEKPADRRFDHDVPE-KRQEAAML-LSTDARLGE----N-DQYV----L---------------- 3089
C.ammoniagenes/1-3063     3008 LFEVIDGRRLPDAAGTVEIENYGPVAADKAAELRSCLTTTSVLPPKALSL-RRSRTK--------- 3063
C.efficiens/1-3022        2979 LYERPVERNLGVQAGAAREIEAAVL-LDSRARLVD----G-VLKPTGYEG---------------- 3022
S.cerevisiae/1-3938       3749 FVSKE-------HAPYTDELEEDV-YLDPLARVSKDKKSGSLTFNSKNIQSKDSYIN--------- 3797
T.lanuginosus/1-3958      3759 FVAKD-------KAPYEDRIQSKV-FLNPQSRVTQES-NGELKFPAEPVTPTGDKKQSGTQTPSES 3815

M.tuberculosis/1-3069     ------------------------------------------------------------------------
M.smegmatis/1-3089        ------------------------------------------------------------------------
C.ammoniagenes/1-3063     ------------------------------------------------------------------------
C.efficiens/1-3022        ------------------------------------------------------------------------
S.cerevisiae/1-3938       3798 --ANTIETAKMIENM-TKEKVSNGGVGVDVELITSINVENDTFIERNFTPQEIEYCSAQPSVQSSF 3860
T.lanuginosus/1-3958      3816 DAASAEQTQRTLEALAATAASPASRVGVDVESVDSINIDNEEFISRNFTEREQAYCRRAPNPRASF 3881

M.tuberculosis/1-3069     ------------------------------------------------------------------------
M.smegmatis/1-3089        ------------------------------------------------------------------------
C.ammoniagenes/1-3063     ------------------------------------------------------------------------
C.efficiens/1-3022        ------------------------------------------------------------------------
S.cerevisiae/1-3938       3861 AGTWSAKEAVFKSLGVKSLGGGAALKDIEIVRVNKNAPAVELHGNAKKAAEEAGVTDVKVSISHDD 3926
T.lanuginosus/1-3958      3882 AGRWTAKEAIFKSLGVASKGAGAAMREIEVINDANGAPEVHLHGAAAEAAKQAGVKTVNVSISHGD 3947

M.tuberculosis/1-3069     ------------
M.smegmatis/1-3089        ------------
C.ammoniagenes/1-3063     ------------
C.efficiens/1-3022        ------------
S.cerevisiae/1-3938       3927 LQAVAVAVSTKK                                                       3938
T.lanuginosus/1-3958      3948 LQAVAVAVSRT-                                                       3958
```

**Abbildung 5.1: Alignement strukturell bekannter bakteriell und Pilz-FAS-I-Systeme.**
Zeigen deutlich die Unterschiede und Verkürzungen zwischen den beiden Systemen. Das Alignement wurde erstellt mit dem Programm Jalview unter der Verwendung der Proteinsequenzen, in Klammern sind die zugehörigen Uniprot-Nummern. MtFAS (P95029); MsFAS (A0R1H7); CaFAS (Q59497); CeFAS (Q8FMV7); ScFAS (*α* P19097; *β* P07149) und TlFAS (*α* A4VCJ6; *β* A4VCJ7).

## 5.4 Sequenzen

### 5.4.1 MtFAS Sequenzen

**DNA-Sequenz der SI-MtFAS im pET22b(+)-Expressionsvektor**

```
ATGTCAGCGT GGAGCCACCC GCAGTTCGAA AAAGGCGCCG GATCCACGAT CCACGAGCAC      60
GACCGGGTGT CCGCTGATCG CGGCGGGGAC AGCCCGCATA CCACCCACGC TCTGGTCGAT     120
CGCCTCATGG CTGGTGAGCC CTACGCTGTC GCATTCGGTG GCCAGGGCAG CGCCTGGCTG     180
GAAACCCTCG AAGAGCTGGT GTCGGCCACC GGGATAGAAA CCGAGTTGGC GACGTTGGTC     240
GGTGAGGCAG AGCTGTTGCT CGATCCGGTC ACCGACGAGC TGATTGTGGT GCGCCCGATC     300
GGTTTCGAGC CGCTGCAATG GGTACGCGCA CTGGCGGCCG AGGACCCGGT TCCGTCCGAC     360
AAGCACCTGA CGTCGGCCGC CGTGTCGGTG CCCGGCGTGT TGCTTACCCA GATCGCGGCG     420
ACCCGGGCGC TGGCCCGTCA AGGCATGGAC CTCGTGGCCA CCCCGCCGGT CGCCATGGCG     480
GGGCATTCGC AAGGTGTGCT GGCGGTGGAA GCCCTCAAGG CTGGTGGGGC ACGCGACGTC     540
GAGCTGTTTG CCTTGGCCCA GTTGATCGGT GCCGCCGGAA CGCTGGTGGC CCGCCGGCGC     600
GGAATTTCCG TCCTGGGCGA TCGCCcGCCG ATGGTATCGG TCACCAACGC CGACCCCGAG     660
CGCATCGGCC GGTTGCTCGA CGAGTTCGCC CAGGACGTGC GCACGGTGCT GCCACCGGTG     720
TTGTCCATCC GCAACGGCCG GCGTGCCGTC GTCATCACCG GCACCCCCGA GCAGCTGTCG     780
CGTTTCGAGC TTTATTGCCG CCAGATCTCC GAGAAGGAAG AAGCCGACCG CAAGAACAAG     840
GTCCGCGGCG GCGACGTCTT CTCGCCGGTC TTCGAGCCGG TGCAGGTGGA GGTGGGCTTT     900
CACACCCCGC GGCTATCCGA CGGGATCGAC ATCGTCGCGG GCTGGGCCGA GAAGGCGGGC     960
CTCGATGTCG CCTTGGCTCG GGAGCTGGCC GATGCCATCT TGATCAGAAA GGTCGACTGG    1020
GTCGACGAGA TCACCCGTGT CCACGCGGCC GGCGCCCGCT GGATCCTCGA CCTGGGGCCG    1080
GGCGACATCC TGACCCGACT GACCGCACCG GTGATCCGCG GCCTGGGCAT CGGCATCGTG    1140
CCGGCGGCTA CCCGCGGTGG CCAGCGCAAC CTGTTCACCG TCGGCGCCAC CCCCGAGGTT    1200
GCCCGGGCCT GGTCGAGCTA CGCACCGACC GTGGTTCGCC TCCCCGACGG CAGGGTCAAG    1260
CTCTCGACGA AGTTCACCCG GCTGACCGGC CGCTCGCCGA TCCTGCTCGC GGGCATGACC    1320
CCGACCACCG TGGACGCCAA GATCGTCGCC GCGGCGGCCA ACGCCGGGCA CTGGGCCGAG    1380
CTGGCCGGCG GCGGGCAGGT CACCGAAGAG ATCTTCGGTA ACCGCATCGA ACAAATGGCC    1440
GGCCTGCTCG AGCCGGGCCG CACCTATCAG TTCAACGCGC TGTTCCTCGA TCCCTACCTG    1500
TGGAAGCTTC AGGTGGGCGG CAAGCGGTTG GTGCAGAAGG CCCGCCAGTC CGGCGCCGCG    1560
ATCGACGGCG TGGTGATCAG CGCCGGCATC CCAGACCTCG ACGAGGCCGT CGAGCTGATC    1620
GACGAACTGG GCGACATCGG CATCAGCCAC GTCGTGTTCA AACCCGGGAC CATCGAGCAG    1680
ATCCGCTCGG TGATTCGCAT CGCCACCGAG GTGCCCACCA AGCCGGTGAT CATGCACGTC    1740
GAGGGCGGGC GCGCCGGCGG GCACCATTCC TGGGAGGATC TCGACGACCT GCTGCTGGCT    1800
ACCTACTCGG AGTTGCGCTC ACGCGCCAAC ATCACGGTGT GCGTCGGCGG CGGCATTGGC    1860
ACCCCGAGAA GGGCTGCGGA ATATTTGTCC GGGCGCTGGG CGCAGGCCTA CGGCTTCCCA    1920
TTGATGCCGA TCGACGGCAT CCTGGTCGGC ACCGCGGCGA TGGCCACCAA GGAATCCACC    1980
ACGTCGCCAT CGGTCAAGCG GATGCTCGTC GACACTCAGG GCACCGACCA ATGGATCAGC    2040
GCCGGAAAAG CGCAGGGCGG CATGGCCTCC AGCCGCAGTC AGCTCGGTGC CGATATCCAC    2100
GAGATCGACA ACAGCGCATC CCGGTGCGGG CGGCTGCTCG ACGAGGTGGC CGGTGACGCG    2160
GAGGCGGTCG CGGAGCGTCG CGACGAGATC ATCGCGGCGA TGGCCAAGAC CGCCAAGCCC    2220
TACTTCGGCG ACGTCGCCGA CATGACCTAC CTGCAGTGGC TGCGGCGCTA CGTCGAACTG    2280
GCCATCGGGG AAGGCAACTC GACCGCCGAC ACCGCCTCGG TGGGCAGCCC GTGGCTGGCC    2340
GACACCTGGC GGGACCGCTT CGAGCAGATG CTGCAGCGTG CCGAAGCCCG GTTGCACCCA    2400
CAGGATTTCG GCCCGATCCA GACGCTATTC ACCGATGCTG GCCTGCTGGA CAATCCGCAG    2460
CAGGCGATCG CCGCCCTGCT GGCGCGCTAC CCCGACGCCG AGACCGTGCA GTTGCATCCC    2520
GCGGATGTGC CCTTTTTCGT GACGTTGTGC AAGACGCTGG GCAAGCCGGT CAACTTCGTG    2580
CCGGTGATCG ACCAGGACGT GCGGCGCTGG TGGCGCAGCG ACTCGCTGTG GCAGGCCCAC    2640
GACGCCCGCT ACGACGCCGA TGCGGTGTGC ATCATTCCGG GCACCGCGTC GGTAGCCGGC    2700
ATCACCCGGA TGGATGAACC CGTCGGTGAG TTGCTGGACC GTTTCGAGCA AGCCGCAATC    2760
GATGAAGTGC TCGGCGCCGG TGTCGAGCCG AAGGATGTCG CGTCGCGCCG GCTGGGCCGC    2820
GCCGACGTGG CCGGACCGTT GGCTGTCGTC CTCGACGCAC CCGATGTGCG CTGGGCCGGT    2880
CGCACCGTGA CCAACCCGGT GCATCGGATC GCCGACCCGG CCGAATGGCA GGTGCACGAT    2940
GGACCCGAAA ACCCGCGCGC CACACACTCA TCCACCGGCG CCCGGCTGCA GACGCACGGC    3000
GACGACGTCG CCTTGAGCGT GCCCGTCTCG GGCACCTGGG TCGACATCCG ATTCACGTTG    3060
CCGGCCAACA CCGTCGATGG CGGCACCCCG GTGATCGCCA CCGAGGACGC CACCAGCGCC    3120
ATGCGCACGG TGCTGGCGAT CGCCGCCGGT GTCGACAGCC CGGAGTTCTT GCCTGCGGTG    3180
GCCAACGGGA CGGCCACTTT GACGGTGGAC TGGCACCCCG AGCGTGTTGC CGACCACACC    3240
GGCGTCACCG CCACGTTCGG TGAGCCGCTG GCACCCAGCC TCACCAACGT GCCCGACGCG    3300
```

```
CTCGTCGGCC CTTGTTGGCC AGCGGTTTTC GCGGCCATCG GATCGGCGGT CACCGACACC      3360
GGTGAGCCGG TGGTGGAAGG CCTGCTGAGC CTGGTGCATC TGGACCACGC CGCCCGCGTG      3420
GTCGGTCAGC TGCCCACGGT CCCGGCCCAA TTGACCGTCA CCGCAACGGC TGCCAACGCA      3480
ACCGATACGG ACATGGGCCG CGTCGTGCCG GTCTCGGTCG TCGTTACCGG CGCCGATGGC      3540
GCCGTGATCG CCACTCTCGA GGAGCGATTC GCGATCCTGG GTCGCACCGG TTCCGCCGAG      3600
CTCGCCGACC CGGCGCGAGC CGGTGGCGCG GTGTCGGCGA ACGCCACCGA CACCCCGCGC      3660
CGTCGCCGCC GCGACGTCAC GATCACCGCG CCGGTCGACA TGCGCCCGTT CGCGGTGGTG      3720
TCCGGCGACC ACAACCCCAT TCACACCGAC CGGGCCGCCG CGCTGCTTGC CGGCCTGGAG      3780
TCGCCGATCG TGCACGGCAT GTGGCTGTCG GCCGCGGCGC AACACGCGGT GACCGCCACC      3840
GACGGGCAGG CCCGGCCACC GGCCCGGCTG GTCGGCTGGA CCGCGCGGTT TTTGGGCATG      3900
GTGCGCCCCG GCGACGAGGT GGACTTCCGC GTCGAGCGCG TCGGAATCGA CCAGGGCGCA      3960
GAGATTGTGG ACGTGGCCGC GCGCGTCGGG TCGGATCTAG TGATGTCGGC CTCCGCGCGA      4020
CTGGCCGCAC CCAAGACGGT CTACGCATTC CCCGGCCAGG GCATCCAACA CAAGGGCATG      4080
GGCATGGAGG TGCGCGCCCG CTCCAAGGCG GCCCGCAAGG TGTGGGACAC CGCGGACAAG      4140
TTCACCCGCG ACACCCTGGG CTTCTCGGTA CTGCACGTGG TCCGCGACAA CCCGACCAGC      4200
ATCATCGCCA GCGGTGTGCA CTACCACCAC CCCGACGGGG TGCTCTACCT GACGCAGTTC      4260
ACCCAGGTCG CGATGGCGAC GGTGGCGGCC GCGCAGGTCG CCGAGATGCG TGAACAGGGA      4320
GCCTTCGTCG AAGGCGCCAT CGCGTGCGGC CACTCGGTCG GCGAGTACAC CGCGCTGGCC      4380
TGCGTGACCG GCATCTACCA ACTGGAAGCC TTGCTGGAGA TGGTGTTTCA CCGCGGGTCG      4440
AAGATGCACG ACATCGTTCC GCGCGACGAG CTCGGCCGCT CCAACTATCG GCTGGCGGCC      4500
ATCCGGCCGT CCCAGATCGA CCTCGACGAC GCCGACGTGC CCGCGTTCGT CGCCGGGATC      4560
GCGGAGAGCA CCGGTGAATT CCTGGAGATC GTGAATTTCA ACCTGCGTGG CTCGCAATAC      4620
GCGATCGCGG GCACGGTACG CGGCCTCGAG GCGCTCGAGG CCGAGGTGGA GCGGCGCCGC      4680
GAGCTCACCG GCGGCCGACG GTCGTTCATT TTGGTGCCCG GCATCGATGT TCCGTTCCAC      4740
TCGCGAGTGC TGCGGGTCGG GGTGGCCGAA TTCCGGCGCT CGCTGGACCG GGTCATGCCG      4800
CGCGACGCGG ACCCCGACCT GATCATCGGG CGCTACATTC CCAACCTGGT GCCGCGGTTG      4860
TTCACCCTGG ACCGCGACTT CATCCAGGAA ATCCGGGATT TGGTGCCCGC CGAGCCGCTC      4920
GACGAGATCC TCGCCGACTA CGACACCTGG CTTCGCGAGC GTCCGCGCGA GATGGCGCGC      4980
ACGGTGTTCA TCGAGCTGCT GGCATGGCAA TTCGCCAGCC CGGTGCGCTG GATCGAGACG      5040
CAGGATCTGC TGTTCATCGA GGAGGCCGCC GGCGGGCTGG GTGTGGAGCG ATTCGTCGAG      5100
ATCGGTGTGA AGAGCTCACC GACGGTGGCG GGTCTTGCCA CCAACACCCT CAAACTGCCC      5160
GAATACGCCC ACAGCACAGT GGAAGTGCTC AACGCCGAGC GTGATGCCGC GGTGCTGTTC      5220
GCCACCGACA CCGACCCGGA GCCGGAGCCG GAGGAAGACG AGCCGGTCGC GGAATCGCCC      5280
GCGCCGGACG TCGTCTCGGA AGCCGCCCCC GTCGCGCCGG CCGCTTCGTC GGCGGGCCCG      5340
CGTCCCGACG ATCTGGTTTT CGACGCCGCC GATGCCACGC TGGCGCTGAT CGCGCTCTCG      5400
GCCAAGATGC GCATCGACCA GATCGAAGAA CTCGACTCCA TCGAGTCCAT CACCGACGGT      5460
GCGTCGTCGC GGCGCAACCA GCTGCTGGTG GACCTGGGCT CCGAGCTGAA CCTCGGTGCC      5520
ATTGACGGCG CCGCCGAATC GGACCTGGCC GGTCTGCGCT CACAGGTGAC CAAACTGGCG      5580
CGCACCTACA AGCCTTACGG CCCAGTGCTT TCCGACGCCA TCAACGACCA GCTTCGCACC      5640
GTCCTCGGAC CGTCGGGCAA GCGGCCCGGC GCCATCGCCG AGCGGGTGAA GAAGACCTGG      5700
GAGCTCGGTG AGGGCTGGGC CAAGCATGTC ACCGTCGAGG TCGCGCTGGG CACCCGCGAG      5760
GGCAGCAGCG TTCGCGGCGG CGCCATGGGC CACCTGCACG AGGGCGCGCT GGCCGATGCC      5820
GCCTCCGTCG ACAAGGTCAT CGACGCGGCG GTCGCATCGG TGGCCGCGCG CCAGGGCGTT      5880
TCGGTAGCGC TGCCGTCGGC CGGTAGTGGT GGCGGCGCCA CCATCGACGC GGCCGCGCTC      5940
AGCGAGTTCA CCGACCAAAT CACCGGCCGT GAGGGCGTGC TGGCCTCCGC GGCCCGCCTG      6000
GTGCTGGGGC AGCTGGGACT GGACGACCCC GTCAACGCCT TGCCGGCCGC CCCCGATTCC      6060
GAGCTGATCG ACTTGGTCAC CGCCGAACTG GGAGCGGACT GGCCGCGGTT GGTGGCACCG      6120
GTGTTCGACC CCAAGAAGGC CGTCGTATTC GACGACCGCT GGGCCAGCGC CCGCGAGGAC      6180
CTGGTGAAGC TGTGGCTGAC CGACGAGGGC GACATCGACG CCGACTGGCC GCGCCTGGCG      6240
GAGCGCTTCG AGGGTGCCGG CCACGTCGTG GCGACCCAGG CTACCTGGTG GCAAGGTAAG      6300
TCGCTGGCCG CGGGCCGGCA GATCCATGCA TCGCTGTACG GCCGCATCGC CGCCGGCGCC      6360
GAGAACCCCG AACCCGGCCG CTACGGCGGC GAAGTTGCCG TGGTGACCGG CGCTTCGAAG      6420
GGTTCGATCG CCGCGTCGGT GGTGGCTCGG CTGCTCGACG GCGGAGCCAC CGTCATCGCG      6480
ACCACCTCCA AGCTCGACGA GGAGCGGCTG GCGTTCTACC GCACGCTGTA TCGCGACCAC      6540
GCCCGTTACG GCGCGGCGCT GTGGCTGGTC GCGGCGAACA TGGCGTCCTA CTCCGACGTC      6600
GACGCCCTGG TCGAATGGAT CGGCACCGAA CAGACCGAAA GCCTTGGGCC GCAGTCGATT      6660
CACATCAAAG ACGCGCAGAC CCCGACGCTG CTGTTCCCGT TCGCGGCGCC ACGCGTGGTC      6720
GGGGACCTGT CGGAGGCCGG TTCGCGCGCC GAGATGGAGA TGAAAGTGCT GCTGTGGGCC      6780
GTGCAACGGC TGATCGGCGG CCTGTCGACG ATCGGCGCCG AACGCGACAT CGCGTCGCGG      6840
CTGCACGTGG TGCTGCCCGG CTCGCCCAAC CGTGGCATGT TCGGCGGCGA CGGCGCCTAC      6900
GGCGAAGCCA AGTCCGCGCT GGATGCCGTG GTGAGCCGCT GGCACGCCGA GTCGTCCTGG      6960
GCGGCACGGG TCAGCCTGGC GCACGCGCTC ATCGGCTGGA CCCGCGGCAC CGGGCTGATG      7020
GGCCACAACG ATGCCATCGT GGCCGCCGTC GAAGAGGCCG GGGTCACCAC CTACTCGACC      7080
```

```
GACGAGATGG CGGCGCTGCT GCTCGACCTG TGTGATGCGG AATCCAAGGT GGCTGCGGCG      7140
CGTTCGCCGA TCAAGGCCGA CCTGACCGGG GGCCTGGCCG AGGCCAACCT CGACATGGCC      7200
GAGCTGGCGG CCAAGGCGCG CGAGCAGATG TCGGCAGCGG CGGCCGTCGA CGAGGACGCC      7260
GAGGCCCCTG GCGCCATCGC CGCGCTGCCG TCGCCGCCCC GGGGTTTCAC CCCCGCACCG      7320
CCGCCGCAAT GGGACGACCT CGATGTCGAC CCGGCCGACC TGGTGGTGAT CGTCGGCGGC      7380
GCCGAAATCG GCCCGTACGG CTCGTCACGC ACCCGGTTCG AGATGGAGGT CGAAAACGAG      7440
CTGTCGGCGG CCGGCGTGCT GGAGCTGGCC TGGACCACTG GGTTGATCCG CTGGGAGGAC      7500
GACCCGCAAC CCGGTTGGTA CGACACCGAA TCCGGCGAAA TGGTCGACGA ATCCGAGTTG      7560
GTGCAGCGCT ACCACGACGC CGTGGTGCAG CGCGTCGGCA TTCGCGAATT CGTTGATGAC      7620
GGCGCGATCG ACCCCGACCA CGCCTCGCCG CTGCTGGTGT CGGTGTTCCT GGAGAAGGAC      7680
TTCGCGTTCG TGGTGTCCTC GGAGGCCGAT GCGCGCGCCT TCGTCGAGTT CGATCCCGAG      7740
CACACGGTCA TCCGGCCGGT GCCCGACTCC ACCGACTGGC AGGTCATCCG CAAGGCCGGC      7800
ACCGAGATCC GGGTGCCGCG AAAGACCAAG CTGTCCCGCG TCGTCGGCGG CCAGATCCCG      7860
ACCGGGTTCG ACCCGACGGT GTGGGGCATC AGCGCAGACA TGGCCGGTTC CATCGACCGG      7920
TTGGCGGTAT GGAACATGGT GGCGACCGTC GACGCGTTCC TGTCGTCCGG TTTCAGCCCG      7980
GCCGAGGTGA TGCGTTACGT GCACCCGAGT TTGGTGGCCA ACACCCAGGG CACCGGCATG      8040
GGCGGCGGCA CGTCGATGCA GACGATGTAC CACGGCAATC TGTTGGGCCG CAACAAGCCG      8100
AACGACATCT TCCAGGAAGT CTTGCCGAAT ATCATTGCCG CGCACGTGGT TCAGTCCTAC      8160
GTCGGTAGCT ACGGTGCGAT GATCCACCCG GTAGCCGCGT GCGCCACCGC CGCGGTGTCG      8220
GTCGAGGAAG GTGTCGACAA GATCCGGTTG GGCAAGGCTC AACTGGTGGT GGCCGGCGGC      8280
CTGGATGACC TGACGCTGGA GGGCATCATC GGATTCGGTG ACATGGCCGC CACCGCCGAC      8340
ACGTCCATGA TGTGCGGCCG CGGCATCCAC GACTCGAAGT TTTCCCGGCC CAACGACCGC      8400
CGCCGTCTGG GCTTCGTCGA AGCCCAAGGC GGCGGGACGA TCCTGTTGGC CCGCGGGGAC      8460
CTGGCGCTGC GGATGGGGCT GCCGGTGCTG GCGGTGGTGG CGTTCGCGCA GTCGTTCGGC      8520
GACGGCGTGC ACACCTCGAT CCCGGCCCCG GGCCTGGGCG CGCTGGGGGC GGGCCGCGGC      8580
GGCAAGGATT CACCGCTGGC GCGGGCGCTG GCCAAGCTGG GCGTGGCCGC CGACGACGTG      8640
GCGGTCATCT CCAAGCACGA CACCTCGACG CTGGCCAACG ATCCCAACGA GACCGAGTTG      8700
CATGAACGGC TCGCCGACGC CCTGGGCCGT TCCGAGGGCG CCCCGCTGTT CGTGGTGTCG      8760
CAGAAGAGCC TGACCGGCCA CGCCAAGGGC GGCGCGGCGG TCTTCCAGAT GATGGGGCTC      8820
TGCCAGATAT TGCGGGATGG GGTGATCCCA CCCAACCGCA GCCTCGACTG CGTCGACGAC      8880
GAGCTGGCCG GCTCCGCGCA TTTCGTGTGG GTGCGTGACA CGTTGCGGCT CGGCGGCAAG      8940
TTCCCACTCA AGGCCGGCAT GCTGACCAGC CTCGGGTTCG GCCATGTGTC GGGCCTGGTC      9000
GCGTTGGTGC ATCCGCAGGC GTTCATCGCC TCGCTGGATC CCGCACAGCG CGCGGACTAC      9060
CAGCGGCGTG CCGACGCCCG CCTGCTGGCC GGTCAGCGCC GGCTGGCCTC GGCGATTGCC      9120
GGTGGTGCGC CGATGTACCA GCGGCCCGGT GACCGTCGCT TCGACCACCA CGCGCCCGAG      9180
CGGCCGCAGG AGGCGTCGAT GCTGCTGAAT CCGGCGGCCC GGCTGGGTGA CGGCGAGGCG      9240
TATATCGGCT GACTCGAGCA TCATCACCAC CACCACCACC ACATT                      9285
```

## Aminosäure-Sequenz der SI-MtFAS im pET22b(+)-Expressionsvektor

```
MSAWSHPQFE KGAGSTIHEH DRVSADRGGD SPHTTHALVD RLMAGEPYAV AFGGQGSAWL      60
ETLEELVSAT GIETELATLV GEAELLLDPV TDELIVVRPI GFEPLQWVRA LAAEDPVPSD     120
KHLTSAAVSV PGVLLTQIAA TRALARQGMD LVATPPVAMA GHSQGVLAVE ALKAGGARDV     180
ELFALAQLIG AAGTLVARRR GISVLGDRPP MVSVTNADPE RIGRLLDEFA QDVRTVLPPV     240
LSIRNGRRAV VITGTPEQLS RFELYCRQIS EKEEADRKNK VRGGDVFSPV FEPVQVEVGF     300
HTPRLSDGID IVAGWAEKAG LDVALARELA DAILIRKVDW VDEITRVHAA GARWILDLGP     360
GDILTRLTAP VIRGLGIGIV PAATRGGQRN LFTVGATPEV ARAWSSYAPT VVRLPDGRVK     420
LSTKFTRLTG RSPILLAGMT PTTVDAKIVA AAANAGHWAE LAGGGQVTEE IFGNRIEQMA     480
GLLEPGRTYQ FNALFLDPYL WKLQVGGKRL VQKARQSGAA IDGVVISAGI PDLDEAVELI     540
DELGDIGISH VVFKPGTIEQ IRSVIRIATE VPTKPVIMHV EGGRAGGHHS WEDLDDLLLA     600
TYSELRSRAN ITVCVGGGIG TPRRAAEYLS GRWAQAYGFP LMPIDGILVG TAAMATKEST     660
TSPSVKRMLV DTQGTDQWIS AGKAQGGMAS SRSQLGADIH EIDNSASRCG RLLDEVAGDA     720
EAVAERRDEI IAAMAKTAKP YFGDVADMTY LQWLRRYVEL AIGEGNSTAD TASVGSPWLA     780
DTWRDRFEQM LQRAEARLHP QDFGPIQTLF TDAGLLDNPQ QAIAALLARY PDAETVQLHP     840
ADVPFFVTLC KTLGKPVNFV PVIDQDVRRW WRSDSLWQAH DARYDADAVC IIPGTASVAG     900
ITRMDEPVGE LLDRFEQAAI DEVLGAGVEP KDVASRRLGR ADVAGPLAVV LDAPDVRWAG     960
RTVTNPVHRI ADPAEWQVHD GPENPRATHS STGARLQTHG DDVALSVPVS GTWVDIRFTL    1020
PANTVDGGTP VIATEDATSA MRTVLAIAAG VDSPEFLPAV ANGTATLTVD WHPERVADHT    1080
GVTATFGEPL APSLTNVPDA LVGPCWPAVF AAIGSAVTDT GEPVVEGLLS LVHLDHAARV    1140
VGQLPTVPAQ LTVTATAANA TDTDMGRVVP VSVVVTGADG AVIATLEERF AILGRTGSAE    1200
LADPARAGGA VSANATDTPR RRRRDVTITA PVDMRPFAVV SGDHNPIHTD RAAALLAGLE    1260
SPIVHGMWLS AAAQHAVTAT DGQARPPARL VGWTARFLGM VRPGDEVDFR VERVGIDQGA    1320
EIVDVAARVG SDLVMSASAR LAAPKTVYAF PGQGIQHKGM GMEVRARSKA ARKVWDTADK    1380
FTRDTLGFSV LHVVRDNPTS IIASGVHYHH PDGVLYLTQF TQVAMATVAA AQVAEMREQG    1440
AFVEGAIACG HSVGEYTALA CVTGIYQLEA LLEMVFHRGS KMHDIVPRDE LGRSNYRLAA    1500
IRPSQIDLDD ADVPAFVAGI AESTGEFLEI VNFNLRGSQY AIAGTVRGLE ALEAEVERRR    1560
ELTGGRRSFI LVPGIDVPFH SRVLRVGVAE FRRSLDRVMP RDADPDLIIG RYIPNLVPRL    1620
FTLDRDFIQE IRDLVPAEPL DEILADYDTW LRERPREMAR TVFIELLAWQ FASPVRWIET    1680
QDLLFIEEAA GGLGVERFVE IGVKSSPTVA GLATNTLKLP EYAHSTVEVL NAERDAAVLF    1740
ATDTDPEPEP EEDEPVAESP APDVVSEAAP VAPAASSAGP RPDDLVFDAA DATLALIALS    1800
AKMRIDQIEE LDSIESITDG ASSRRNQLLV DLGSELNLGA IDGAAESDLA GLRSQVTKLA    1860
RTYKPYGPVL SDAINDQLRT VLGPSGKRPG AIAERVKKTW ELGEGWAKHV TVEVALGTRE    1920
GSSVRGGAMG HLHEGALADA ASVDKVIDAA VASVAARQGV SVALPSAGSG GGATIDAAAL    1980
SEFTDQITGR EGVLASAARL VLGQLGLDDP VNALPAAPDS ELIDLVTAEL GADWPRLVAP    2040
VFDPKKAVVF DDRWASARED LVKLWLTDEG DIDADWPRLA ERFEGAGHVV ATQATWWQGK    2100
SLAAGRQIHA SLYGRIAAGA ENPEPGRYGG EVAVVTGASK GSIAASVVAR LLDGGATVIA    2160
TTSKLDEERL AFYRTLYRDH ARYGAALWLV AANMASYSDV DALVEWIGTE QTESLGPQSI    2220
HIKDAQTPTL LFPFAAPRVV GDLSEAGSRA EMEMKVLLWA VQRLIGGLST IGAERDIASR    2280
LHVVLPGSPN RGMFGGDGAY GEAKSALDAV VSRWHAESSW AARVSLAHAL IGWTRGTGLM    2340
GHNDAIVAAV EEAGVTTYST DEMAALLLDL CDAESKVAAA RSPIKADLTG GLAEANLDMA    2400
ELAAKAREQM SAAAAVDEDA EAPGAIAALP SPPRGFTPAP PPQWDDLDVD PADLVVIVGG    2460
AEIGPYGSSR TRFEMEVENE LSAAGVLELA WTTGLIRWED DPQPGWYDTE SGEMVDESEL    2520
VQRYHDAVVQ RVGIREFVDD GAIDPDHASP LLVSVFLEKD FAFVVSSEAD ARAFVEFDPE    2580
HTVIRPVPDS TDWQVIRKAG TEIRVPRKTK LSRVVGGQIP TGFDPTVWGI SADMAGSIDR    2640
LAVWNMVATV DAFLSSGFSP AEVMRYVHPS LVANTQGTGM GGGTSMQTMY HGNLLGRNKP    2700
NDIFQEVLPN IIAAHVVQSY VGSYGAMIHP VAACATAAVS VEEGVDKIRL GKAQLVVAGG    2760
LDDLTLEGII GFGDMAATAD TSMMCGRGIH DSKFSRPNDR RRLGFVEAQG GGTILLARGD    2820
LALRMGLPVL AVVAFAQSFG DGVHTSIPAP GLGALGAGRG GKDSPLARAL AKLGVAADDV    2880
AVISKHDTST LANDPNETEL HERLADALGR SEGAPLFVVS QKSLTGHAKG GAAVFQMMGL    2940
CQILRDGVIP PNRSLDCVDD ELAGSAHFVW VRDTLRLGGK FPLKAGMLTS LGFGHVSGLV    3000
ALVHPQAFIA SLDPAQRADY QRRADARLLA GQRRLASAIA GGAPMYQRPG DRRFDHHAPE    3060
RPQEASMLLN PAARLGDGEA YIG                                            3083
```

### 5.4.2 CaFAS Sequenzen

**DNA-Sequenz der SII-CaFAS im pET22b(+)-Expressionsvektor**

```
ATGGCTAGCT GGAGCCACCC GCAGTTCGAA AAAGGCGTCG ACGTGACTAT TGGCATCTCT      60
AACCACCGCC TGGTGAACCG ACTCGAGTCT GAAAAATTTG CTCTCAGCTT TTCCGGACAA     120
GGTTTTAGCT GGTTGCCCAC CTTGCGCACG GTAATTGCCG GTGGCAATGG CGCGCAGGTA     180
GCCGGAGCAG TCGATGCAGC GGGCAAGTTG CTGGAGCCAG TAGCAGATGA GCTCGTTGCT     240
GCACTGCCAC ACGGCTTCGA TCCGGTGGAG TGGGCTGGCA ACGCCGAGGA CCCAGCGTGG     300
GATTTGTCAG ATTCGTCGAT TTCTACCCCG GGCATCGTGG TCGCCCAGTA CGGCCTGATT     360
GAGTCATTGA AAGCCCAGGG ATTAGATCCT GCGGATGCAG TCGCACACAT TGGCCATTCC     420
CAAGGCGCGC TTGCTACTTA TATCTCCTCC GGGCGCGCGC AGGCAGCAGA GGTTATTGCG     480
CTGGCGCAGC TCATCGGCGT CGCTATTTCT AAGACCGCAC GCGCCACGGG ACTCATCCGT     540
ATCGCTGCGG GTTCACCGAT GGTCTCCATC GCCGGCATTT CCCGCGAGCA GCTGGCCAAG     600
GTGCTGGCTA AAACCGGTGT CGATAGCGTT ATTGGCCTGC AAAATAACCA CAACACTTTC     660
GTTGTTACCG GCAGCCCGGA AGATAATAAT AAGGTCATTG AGGCGATTGA AAAATTAGCC     720
GCCAAAGACG CGAAAGCGAT TGAAAATAAA GAACGCGGCG GCAACCCCTT TGCCCCGCGT     780
ATTAATGCTT TGCCGGTGCA ATCTGGCTAC CACCACCCAA AGATGTCCGC GGCAGTAGAG     840
ATGGTCACCA GCTGGGCAGA GCGCATCGGG CTGGATAAAG ACTTGGCTCA CGATGGCGCA     900
GAGGCAGTCT TGACGGAGAT CGTGAACTGG CCTGCCACGG TGCAGTCCGC TGTCGATGCG     960
GGCGTGACGT GGATTTTGGA ATGCGGTCCG GAAAAGGGCA TGGCTGCCTT GACCAAGGCG    1020
GTCGTCGCCG GTCAAGGCAT TGGGGTGCAG GTTGTCTCCA CGGACGAAGG CCAAGCAGCG    1080
CTTTTCGATG TCGGCCAGGC CCCAGAACTT CCCGTCAACT TCGCCCAGTT CGCGCCGAAG    1140
GTTTTTGACG ATAAGGGCAA GACACGTTTG TCCACGCGGT TTACCGAATT AACCGGGTAT    1200
TCCCCAGTGG TACTTGCCGG TATGACTCCG TCGACGGTGG ATCCCGCGAT TGTTGCCGCA    1260
GCTGCCAATG CTGGATTCTG GGCAGAGCTT GCTGGTGGCG GTCAGGTCAC GGACGCGATT    1320
TTGAATGACT CGCTGGAACG ACTCGAGGAC ATGCTGAACC CGGGCATTAA CGCTCAGTTC    1380
AACGCCATGT ACCTGTCCCC GAAGCAGTGG CGTGCCCAAA TTGAGGGCCG TCGTTTGATT    1440
CCGCGTGCGC GTGCCAATGG TGCGTCCATC AATGGCGTGA TCTGCTCGGC CGGTATTCCA    1500
CCGCACGAGG AAGCAATCGC GCTGGTGCGC CAACTCCAGG AAGACAATAT CCCCTGGGTA    1560
GCGTTTAAGC CCGGCGCGGT TCGCCACGTC CACCAAGTAT TAGCAATTGC TGATGACCTG    1620
CCGGATACCA CGGTCATCAT GCAGGTTGAA GGCGGCAAGG CTGGCGGTCA CCACTCGTGG    1680
GAAGACCTCG ATGATCTGCT GACGGAAACG TATGCCGATA TCCGCGAGCG CGACAATGTC    1740
GTGCTCATGG CCGCCGGCGG TATTGGCGCC CCAGAACGCG GTGCGCAGTA TCTTACCGGT    1800
GAATGGTCGA AGGTCTATGG ACTGCCGGCA ATGCCTGTCG ATGCCATCAT GATCGGCACC    1860
GCTGCGATGG CCACGAAGGA GTCCACGGCC TCGGAATCAG TCAAGCAGGC ACTGGTAGCA    1920
ACCCAAGGTC TGGAAGATAT CCCAGGCGGC GGCTGGGTTC CAGCCGGCGG TGCCCGCGAC    1980
GGTATTGCCT CCGGCCGCTC CCAACTAGGC GCCGATATCC ACGAAATTGA TAACACCTTC    2040
GCCAAGGCCG GACGGTTGTT GGACGAGGTT GCCGGAGACG CCGACGCAGT AGCCGCGCGC    2100
CGCGAAGAAA TCATCGCCGT GATTGCTGGC ACCGCCAAGC CGTATTTCGG TGATATCAAC    2160
GCCATGACCT ACGCCGAGTG GCTGGCCCGT TATGTCGAAG TCTCGTACAT GGGCTCGTGG    2220
GTCGATTTTT CCTGGGCACG TCGTTTCGAG CAGATGATTG CCCGCGCCGA AGCCCGCCTT    2280
ACGGAAGCGG ACCACGGCGA ATTCACACCA CTAGTCACCG TTGATGCTGA ACACCCAGAA    2340
CGCGCTATCG CCGATGTGGT AGCTGCGTAT CCGGCAGCGG AGAAGCACAC CGTTATTGCT    2400
TCCGATGAAG CTTGGTTTGT GGACTTGCTA CGCGGCAACG GCAAACCACC AGCTTTCGTA    2460
CCCGTCATTG ATTCCGATGT GCGTCGTTGG TGGCGCCAAG ACTCCCTGTG GCAGGCACAC    2520
GATGAGCGCT ACACCGCAGA ACAAGTGGGC ATCATCCCAG GCACCACCGC TGTTGCCGGT    2580
ATTACCAAGG CCAATGAGCC AGTAGCGGAA CTACTCGCGC GCTTTGAAGC AGCCGCAGTA    2640
GAACAAGCCC TGCAATCAGA AGATACCGAG AAGGCAGAGC TTGCGAACTC GGCACTCGAG    2700
CGCGTCCTCG CCGCACCCTC TGTGGAATGG GCAGGGCGCC AACGCCCGAA TCCAGTTGCT    2760
CAGGTTTCTG AGTCCTGGAC CGTAGATTCC CAGGCGAAAA CCGCATCGAC TGAGGGCGCA    2820
GAACTCGTCA CCATCGACGA GCACACCGTC GAGCTATCGG TTGCGCTGAC CGGCTCGGTA    2880
CCTGGTGCCA CGCTGCAGCT GCAGATTACC GTGCCAGCAG ATGCACCACT TTCGGCAACC    2940
CCGATTATCA CCGCACAGGC AGCAGAAGAG TCCATGGCAG CATTAGCCGC CGTGGCAGCA    3000
GGCGGCACCT TGCCCGAGGT CACCGACGGC ACCGCCGTCT GGAAGACCAC CTTGGATTCC    3060
GCTGCATTGT CAGACTACGC AGGGGTTACC AGCGGCTATC TCGCCAGCGC AGATACCAAT    3120
TCGGCTATCG CACCTGATGT CATCGTCGGC CGCGCGTGGC CAGCGGTCTT CGCGGTGATC    3180
GCCAACTCTG TCATCCCGGG CTCTGATTCC GCGCTCGTGG TGGAAGGACT GTTGAACCTC    3240
GTCCACCTCG AACACGATGT ACGCCTGCAC CAAGCACTGC CCACCGAGGC CGTGGACCTG    3300
ACCGTGACCG CACGCGGGGG AGAAGTCCGC GATACTGCAC TTGGTCGCGT CGTCGAAGTC    3360
GCCGTCGACA TCGCCATCGC CGAGGCAGAA GACACCGTGC TGGCGACGTT GAAGGAACGC    3420
```

```
TTTGCCATCG TCGGTCGCAC CGGCGAGCAG GAACTTGAAC CTGCTACCTC GACCGCAGAG      3480
ATCACCAACA CCCCAGCGTC GTTTCGTCAT CAGCTTCGCG TGACCGCACC AGCGTCGATG      3540
CATCCTTTCG CCGTCGTGAC CGGCGACCGC AACCCCATCC ACGTCTCCGC TGCTGCCGCA      3600
CGGTTAGCTG GATTGGAAAA CGGCGTTATT GTCCACGGCA TGTGGACCTC AGCCATCGGC      3660
CAGCTCGCAG CAGGATTTGA TGGACTTGAG CTCGCCGAGT GGTCCGCGAA TATGCTCAGC      3720
CCCGTGCTAC CCGGCGCAGA AGTCACCTTC ATCGTCGAGC GCACTGGCGT GGACTCTCGC      3780
CCAGGACGCG GTGAAGTGCG TACTGTGACA GCCAGCGTCG GCGATGATGT GGTCTTACAA      3840
GCCACGGCCA CCATGGCCGC ACCGCGAACT TTCTACGGTT TCCCCGGCCA GGGCATTCAG      3900
TCCCAGGGCA TGGGCATGGA ATCTTATGCT TCCTCGAGCG CAGCTCGTGA GGTCTGGGAG      3960
CGCGCCGATG CCCACACCCG AGAAAAGCTC GGCTTTTCCA TTTTGGAAAT TGTACGCAAC      4020
AACCCACCGC TGGTCGTTGT CGACGGCGAA GAGTTCACCC ACCCAGATGG CACTCTATTC      4080
TTAACCCAGT TCACGCAGGT CGCGATGGCG ACATTGGGCT GCGCCCAAAT CGCGGAGCTG      4140
GCAGAAGCCG GCGTGAAATC CCAGGACACT TACTTCGCCG GACACTCCGT GGGCGAATAC      4200
AACGCCCTAG CTGCCTACGC ACAGGTGCTG TCTTTGGAAG CCGTTGTAGA AATCGTCTAC      4260
GCCCGCGGTT TGACCATGCA CCGCCTGGTC GACCGTGACG CAGAAGGCAA CTCCAACTAC      4320
GGCCTGGCAG CGCTGCGCCC GAATAAGATT GGCATCCGCG CCGAGGACGT CTTTGACTAC      4380
GTCGCGCAGG TCTCGCAGAC CCGCGGCGAA TTCCTAGAAA TCGTCAACTA CAACATCGCC      4440
GGTGTGCAGT ACGCCGTCGC CGGCACGCGA GCAGGGTTGG CAGCATTGGC TGCCGATGCC      4500
GAGTCGCGCG CGCCGGGCAT GCGCTCATTT ATCATGATCC CGGGCATCGA CGTGCCATTT      4560
CACTCTTCGC ACCTGTTGGG CGGCGTCGAT AACTTCCGCA CGCACCTGGA CATGCTCATT      4620
CCAGACGACG TGGATTTGGA TATTCTGCGC GGTCGCTACA TCCCTAACCT GGTGGCTCGC      4680
CCGTTTGAGC TCACCCGCGA ATTCGTCGAA GCCATGGCCG ATGTCGTCGA TTCGACGTAC      4740
GTCAACGACA TCCTCGCCGA CTTCGATAAG GCCACGGACG ACCCGGCCAA GATGGGCCGC      4800
ACCCTGCTCA TTGAGCTCTT AGCGTGGCAA TTTGCCTCAC CTGTGCGCTG GATCGAAACC      4860
CAAGACTTGC TGCTGTCTGC CCCAAGCGTC AGCGCCGGAG CCGGCACCGC AGGTCTAGGC      4920
GTGGAGCGCT TTGTAGAAAT CGGCGTGGGT TCTTCCCCGA CGCTTGCGAA TATGCTCGGC      4980
CAAACCCTGC GCTTGCCGCA ATACGCCGGC AATCCCATTG AGGTTCTCAA CGTGGAACGC      5040
GACCGCGCCA CCGTCTTCGC CGAAGACGCC CTAGAGCGCC CGGTTGAAGA CTCTTCGGAG      5100
TCTTCAACCG GTGTAGCAGA GGCCGCAACA GCAACCGCCG AAGAAGTATC GCAGGCCAAT      5160
GCTGCTCCAG CAGCGGCGCC AGAGCCCGTG GTCGCCCAAC CAGCGACACC AGCACCGGCC      5220
GCTGGCGGCA CGACCCCGGA TGACAAAGCC TTTAGCGCCG CCGATGCCAC CGAGATGCTC      5280
ATTGCTATTT GGACCAAGGT CCGCCCCGAC CAAATGGGCG CTGCCGATAC CATTGAGCTT      5340
TTGGTCGAAG GCGTCTCCTC GCGTCGTAAC CAGCTCTTGC TGGACTTGGG CGTGGAATTC      5400
GGCCTCGGTG CCATCGAAGG CGCAGCCGAT GCCGAGATTT CCGCTCTCAA AGAGCAGGTC      5460
TCCGGCATGG CCAAGGGCTA CAAGGCCTTC GGTCCCGTGC TTTCGGCACA GGTGGCAGAA      5520
TCCCTGCGCC GTTTGACCGG ACCAGCTGGT AAAAAGCCGG CATATATTGC CCAGCGCGTC      5580
GCGGACACCT GGGGCCTGGG CGCCGGATGG GTCGATCGCG TCACCGCAGA GCTCGTGCTG      5640
GGAGCGCGCG AGGGGGCATC GCTACGCGGC GGTGACCTGG CATTGCTTGC ACCGGCGAAC      5700
CCGGCAACAA CCGCAGAGCT TGATGCGCTT ATCGATGCCG CCGTCGACGC CGCCGGTGCC      5760
AAGGTCGGCA TCGTCATCTC GAAGCCTTCC GCTAGCGGTG CAGCGCAAGG CGGAGTTGTG      5820
GACTCGGCCG CACTGGATGC GTATTCCGAG AAGATGAACT CCGCTTTGGC TAATACCGCG      5880
CGGACCTTGC TCTCACAGCT GGGACAGCAG GCACCAACCA CGGAGTTTTC CGAAGCAGAT      5940
GACAACGCGG CCGTCGTCGA CTTGGTCACC TCGGAACTCG GTGCGGACTG GCCACGACTG      6000
GTAAGCCCAA GCTTCGATGC AGACAAGACC GTCCAACTCG ATGACCGCTG GGCCTCGGCG      6060
CGTGAAGACC TCGTGCGTTT GTCGTTGGGC GAAATCGAGG ACCTTGATAT CACCGGCGCG      6120
GGCGAAGAAG CCGCAGCGAT GGCAACCTAC CTGGGTCTAG ATGAACAGGC TGCGCAAGCA      6180
CGAGTGGCGG CTTCGACCTT GGACCATGAT GGCGAGGTTG CTGTTGTCAC CGGTGGTTCG      6240
CCTGGCTCTA TTGCCTCGGA AATTGTGGCT AACTTGCTGC GCGAGGGCGC CACGGTCATT      6300
GCCACGACGT CTCGTTTGGG ACATGACCGC CTCGAGTTTT ATAAAAACCT CTACCGCACC      6360
TCCGCGCGTG GCAACGCGCA ATTGTGGATT GTGCCCGCGA ATCTCAACTC TTTCGCCGAC      6420
CTAGATGCGC TGATTGACTG GATTGGCACG GAGCAGACGG TCACTGTGGG CGGTTCCTCG      6480
AAGCTGGTTA AACCAGCCTT GGTGCCGACC TTGCTCTTCC CGTTTGCAGC ACCGCGCGTG      6540
CAGGGCACCT TGGCTGATGC CGGGGCCCCT GCCGAAGCAC AGATGCGCCT GTTGCTGTGG      6600
AGTGTGGAAA AGCTCATCGC TGGGCTCAGC CAGCTGGGCA CCGGAACACA TGTGGGCCAG      6660
CGCCTGCACA TCGTGTTGCC GGGCAGCCCC AACCGGGGAC GCTTCGGCGG CGACGGTGCC      6720
TATGGTGAGT CCAAGGCTGC CTTGGATGCG CTGGTGACCC GCTGGCATGC AGAACCCGTA      6780
TGGGGTGCGC GCACCTCCAT TGTTCACGCC CACATTGGCT GGGTCCGTGG CACCGGTTTG      6840
ATGGGCGGCA ATGACCCGCT AGTCGATGCC GTCGAAGCCA AGGGCGTGCG CACTTTCTCC      6900
ACGGAGGAAA TGGCGAGTCA ATTGGTGGGC GAGGGGGCAT CGACAAGCAA GCGCGACGCT      6960
GCTGCCCACG CACCTGTCAC CTTGGATCTC ACCGGTGGCT TAGGCGAGGC TGATATCAAC      7020
CTGCCGGAAT TGGCGCGTTC GGTATCTGTC CAGCCTGTTG CCGAGGACGT AGAAGAAGTG      7080
GCGAGTTTGC GGGCATTGCC AAATATCCGC GAGCGCATTG AGTGGACCAC GCCTGATTTT      7140
GCGGGTGTGA ACCAAAAACT CGATGACATG GTGGTTATCG TCGGTGCCGG CGAAATTGGG      7200
```

```
CCGGTGGGAT CGTCTCGGAC CCGTTTCGAG GTGGAGATGA CCGGTGACCT TACCGCCGCT      7260
GGTGTTGTCG AATTGGCGTG GACTACTGGC CTGATTGCCT GGGATGATGC CTCGGGTGCG      7320
TGGTTTGATG CCGAGGGCGA GGAAATCGCC GAGGAAGATA TCTACGACCG CTTCCACGAT      7380
GAAGTCCTAG CCAACGTCGG CGTACGCAAG TACCACGATG ACTACGGCCC GAAGATGCCG      7440
ATGGTGGATA ACTTGGCTCC GGAGCTGACC ACCATCTACC TCGAACGCGA TATGACCTTT      7500
GCTGTTGCGG ATGAAGAAAC CGCGCGCACG TTTGTTGCCG ACGTGGAAGG TGCCACCGCG      7560
CACTTTGACG GCGAGGAATG GCAAGTCACC CGCCCAGCTG GGGCCGAGGT GCGCGTGCCG      7620
CGGCGCGTGG CGATGACGCG CTTTGTCGGC GGGCAGATTC CGCAAGGGTT TGACCCCGGT      7680
GTCTACGGTA TTCCGGCCGA TATGATTGAC AACCTCGACC GGGTGGCCTT GTGGAACCTG      7740
GTGTGCACGG TGGATGCTTT CTTGGCGGCT GGGTTTAGCC CCGCGGAATT GCTGGCGCAT      7800
GTGCACCCGG CGCGCGTGAG CTCGACCCAG GGCACGGGTA TGGGCGGCAT GCAGTCGATG      7860
CGCTCGCTGT ACCTGGACAA GCTGCTGGCG CAGCCGCGCC CGAATGACAT CTTGCAGGAA      7920
GCACTGCCGA ATGTCGTGGC AGCGCACGTC ATGCAGTCTT ATGTCGGCGG TTATGGCCAG      7980
ATGGTTCACC CGGTTGCCGC GTGTGCGACC GCGGCTGTCT CTGTCGAAGA GGGCATGGAT      8040
AAACTGCGTT TGCGCAAGGC TGATTTCGTG GTCGCCGGCG GTATTGATGA CCTGTCGATT      8100
GAAGGCATTA CGGGCTTCGG CGATATGGCG GCCACGGCGG ATTCCGGCGA GATGGAAGCC      8160
AAGGGCATTG ACCACAAGTA CTTCTCGCGT GCCAATGACC GTCGTCGTGG CGGGTTCATT      8220
GAGTCGGAAG GCGGCGGCAC CATCTTGCTG GCGCGCGGTA GCTTGGCTGC GGAATTGGGC      8280
CTGCCAGTCT TGGGCGTAGT TGGCTTCGCG GAGTCTTTCG CCGACGGTGC GCACACCTCC      8340
ATTCCAGCGC CTGGTCTGGG TGCGCTTTCT GCCGCGCGTG GTGGGGCAGA TTCCCGTCTA      8400
GCGCAGGGAT TGGCCGAGCT TGGGGTGTCT GCGAATGAAA TCGCGGTCAT TTCCAAGCAC      8460
GACACGTCTA CGAATGCCAA TGACCCGAAT GAGTCTGACC TGCATGAGCG AATCGCAGCG      8520
TCAATGGGCC GCGATGCGGG CAACCCGTTG TTTATCATCT CGCAAAAGAC CCTGACCGGT      8580
CACGCCAAGG GCGGTGCCGC AGCCTTCCAG CTGGTTGGTC TCACCCAGGT TCTGCGCAAC      8640
GGTGTATTGC CACCGAACCG CTCGTTGGAC TGTGTGGATC CGGCGTTGCG CCAGCACACT      8700
CATTTGACCT GGCTGCGCGA GCAGCTGGAT TTGCGTGCAA CCCCACCAAA GGCCGGGCTG      8760
GTTACATCCT TGGGCTTTGG TCACGTCTCC GCGCTGGTTG CTGTGGTTCA CCCTGGCGCA      8820
TTCGTGGAAG CTCTGCGCGC TGAGCGTGGC GCCGAGGCAG CCGCGCAGTG GCAGCAGTCG      8880
GCCAATGCCC GCGAGGCAGC TGGTCTGCAG CGACTAACCT CGGCTATCTC CGGTGGCCCG      8940
GCGTTGTATG AGCGCCCCGT GGACCGCAAC CTGGGTGGAA CCGGTGACGT AGTCAAGGAA      9000
CGCGAAGCAG CAGTATTGCT TGACGATGCC GCGCGGCTGC GCGGAGCCGT CCTCGAGCCG      9060
AGCACTTCCG CAGAATCAGG AAAGCAGCAG TAGTGCTCGA CAACCGTGAA GCGATGACCG      9120
TGGGTGTGGA CTTGGTCCAC ATCCCCGGCT TTGCCGAGCA ATTGTCGCGC CCTGGTTCGA      9180
CTTTTGAGCA AGTGTTTTCG CCGTTGGAAC GTCGTCATGC TCAAACGCGC CGTGACGCTG      9240
CAGCGGATGC TACGAATTCG AGCCTTGCGG GTTCACGGAC TGAGCACCTG GCTGGGCGGT      9300
GGGCGGCAAA AGAAGCGTTC ATCAAGGCGT GGTCGCAAGC GATCTACGGC AAGCCACCAG      9360
```

## Aminosäure-Sequenz der SII-CaFAS im pET22b(+)-Expressionsvektor

```
MASWSHPQFE KGVDTIGISN HRLVNRLESE KFALSFSGQG FSWLPTLRTV IAGGNGAQVA      60
GAVDAAGKLL EPVADELVAA LPHGFDPVEW AGNAEDPAWD LSDSSISTPG IVVAQYGLIE     120
SLKAQGLDPA DAVAHIGHSQ GALATYISSG RAQAAEVIAL AQLIGVAISK TARATGLIRI     180
AAGSPMVSIA GISREQLAKV LAKTGVDSVI GLQNNHNTFV VTGSPEDNNK VIEAIEKLAA     240
KDAKAIENKE RGGNPFAPRI NALPVQSGYH HPKMSAAVEM VTSWAERIGL DKDLAHDGAE     300
AVLTEIVNWP ATVQSAVDAG VTWILECGPE KGMAALTKAV VAGQGIGVQV VSTDEGQAAL     360
FDVGQAPELP VNFAQFAPKV FDDKGKTRLS TRFTELTGYS PVVLAGMTPS TVDPAIVAAA     420
ANAGFWAELA GGGQVTDAIL NDSLERLEDM LNPGINAQFN AMYLSPKQWR AQIEGRRLIP     480
RARANGASIN GVICSAGIPP HEEAIALVRQ LQEDNIPWVA FKPGAVRHVH QVLAIADDLP     540
DTTVIMQVEG GKAGGHHSWE DLDDLLTETY ADIRERDNVV LMAAGGIGAP ERGAQYLTGE     600
WSKVYGLPAM PVDAIMIGTA AMATKESTAS ESVKQALVAT QGLEDIPGGG WVPAGGARDG     660
IASGRSQLGA DIHEIDNTFA KAGRLLDEVA GDADAVAARR EEIIAVIAGT AKPYFGDINA     720
MTYAEWLARY VEVSYMGSWV DFSWARRFEQ MIARAEARLT EADHGEFTPL VTVDAEHPER     780
AIADVVAAYP AAEKHTVIAS DEAWFVDLLR GNGKPPAFVP VIDSDVRRWW RQDSLWQAHD     840
ERYTAEQVGI IPGTTAVAGI TKANEPVAEL LARFEAAAVE QALQSEDTEK AELANSALER     900
VLAAPSVEWA GRQRPNPVAQ VSESWTVDSQ AKTASTEGAE LVTIDEHTVE LSVALTGSVP     960
GATLQLQITV PADAPLSATP IITAQAAEES MAALAAVAAG GTLPEVTDGT AVWKTTLDSA    1020
ALSDYAGVTS GYLASADTNS AIAPDVIVGR AWPAVFAVIA NSVIPGSDSA LVVEGLLNLV    1080
HLEHDVRLHQ ALPTEAVDLT VTARGGEVRD TALGRVVEVA VDIAIAEAED TVLATLKERF    1140
AIVGRTGEQE LEPATSTAEI TNTPASFRHQ LRVTAPASMH PFAVVTGDRN PIHVSAAAAR    1200
LAGLENGVIV HGMWTSAIGQ LAAGFDGLEL AEWSANMLSP VLPGAEVTFI VERTGVDSRP    1260
GRGEVRTVTA SVGDDVVLQA TATMAAPRTF YGFPGQGIQS QGMGMESYAS SSAAREVWER    1320
ADAHTREKLG FSILEIVRNN PPLVVVDGEE FTHPDGTLFL TQFTQVAMAT LGCAQIAELA    1380
EAGVKSQDTY FAGHSVGEYN ALAAYAQVLS LEAVVEIVYA RGLTMHRLVD RDAEGNSNYG    1440
LAALRPNKIG IRAEDVFDYV AQVSQTRGEF LEIVNYNIAG VQYAVAGTRA GLAALAADAE    1500
SRAPGMRSFI MIPGIDVPFH SSHLLGGVDN FRTHLDMLIP DDVDLDILRG RYIPNLVARP    1560
FELTREFVEA MADVVDSTYV NDILADFDKA TDDPAKMGRT LLIELLAWQF ASPVRWIETQ    1620
DLLLSAPSVS AGAGTAGLGV ERFVEIGVGS SPTLANMLGQ TLRLPQYAGN PIEVLNVERD    1680
RATVFAEDAL ERPVEDSSES STGVAEAATA TAEEVSQANA APAAAPEPVV AQPATPAPAA    1740
GGTTPDDKAF SAADATEMLI AIWTKVRPDQ MGAADTIELL VEGVSSRRNQ LLLDLGVEFG    1800
LGAIEGAADA EISALKEQVS GMAKGYKAFG PVLSAQVAES LRRLTGPAGK KPAYIAQRVA    1860
DTWGLGAGWV DRVTAELVLG AREGASLRGG DLALLAPANP ATTAELDALI DAAVDAAGAK    1920
VGIVISKPSA SGAAQGGVVD SAALDAYSEK MNSALANTAR TLLSQLGQQA PTTEFSEADD    1980
NAAVVDLVTS ELGADWPRLV SPSFDADKTV QLDDRWASAR EDLVRLSLGE IEDLDITGAG    2040
EEAAAMATYL GLDEQAAQAR VAASTLDHDG EVAVVTGGSP GSIASEIVAN LLREGATVIA    2100
TTSRLGHDRL EFYKNLYRTS ARGNAQLWIV PANLNSFADL DALIDWIGTE QTVTVGGSSK    2160
LVKPALVPTL LFPFAAPRVQ GTLADAGAPA EAQMRLLLWS VEKLIAGLSQ LGTGTHVGQR    2220
LHIVLPGSPN RGRFGGDGAY GESKAALDAL VTRWHAEPVW GARTSIVHAH IGWVRGTGLM    2280
GGNDPLVDAV EAKGVRTFST EEMASQLVGE GASTSKRDAA AHAPVTLDLT GGLGEADINL    2340
PELARSVSVQ PVAEDVEEVA SLRALPNIRE RIEWTTPDFA GVNQKLDDMV VIVGAGEIGP    2400
VGSSRTRFEV EMTGDLTAAG VVELAWTTGL IAWDDASGAW FDAEGEEIAE EDIYDRFHDE    2460
VLANVGVRKY HDDYGPKMPM VDNLAPELTT IYLERDMTFA VADEETARTF VADVEGATAH    2520
FDGEEWQVTR PAGAEVRVPR RVAMTRFVGG QIPQGFDPGV YGIPADMIDN LDRVALWNLV    2580
CTVDAFLAAG FSPAELLAHV HPARVSSTQG TGMGGMQSMR SLYLDKLLAQ PRPNDILQEA    2640
LPNVVAAHVM QSYVGGYGQM VHPVAACATA AVSVEEGMDK LRLRKADFVV AGGIDDLSIE    2700
GITGFGDMAA TADSGEMEAK GIDHKYFSRA NDRRRGGFIE SEGGGTILLA RGSLAAELGL    2760
PVLGVVGFAE SFADGAHTSI PAPGLGALSA ARGGADSRLA QGLAELGVSA NEIAVISKHD    2820
TSTNANDPNE SDLHERIAAS MGRDAGNPLF IISQKTLTGH AKGGAAAFQL VGLTQVLRNG    2880
VLPPNRSLDC VDPALRQHTH LTWLREQLDL RATPPKAGLV TSLGFGHVSA LVAVVHPGAF    2940
VEALRAERGA EAAAQWQQSA NAREAAGLQR LTSAISGGPA LYERPVDRNL GGTGDVVKER    3000
EAAVLLDDAA RLRGAVLEPS TSAESGKQQ                                      3030
```

### 5.4.3 CeFAS Sequenzen

**DNA-Sequenz der SII-CeFAS im pET22b(+)-Expressionsvektor**

```
ATGGCTAGCT GGAGCCACCC GCAGTTCGAA AAAGGCGTCG ACGTGACCGA ACCAGGCAGC      60
AACTTCGGGA CCAGCCGACT GATCAACCGC TTCGATCAGG AACCCTATGC CTTCGCCTTC     120
TCAGGCCAGG GCTTCAACTG GTTGAAGACC CTCCGCGCCG CGGTCGCCGC AGGCGCCGGC     180
ACCAATGTCC AGGGAATCGT CGAGCGCGCG CAGGAGCTGC TGGCTCCCGT CGCTGATGAA     240
CTTGCAGGTA CCTTCCCCTT CGGTTTCGAC CCGGTTGCCT GGGCCAACGC CGTGGACACC     300
CCTAACTTTG ATACCGCCCA GGCCGCCGTG AGTGTGCCCG GCATCTTCGT CTCCCAGATC     360
GCCACCCTGG ATTCCCTGGA GTCCCAGCGC CTGGATGTGG AGAAGTCCGT GGCAGCCATC     420
GGCCACTCGC AGGGTGTGCT CGGTGTGCAC CTGCTGAGGG ACCTGACCCG TGCTGATGAG     480
TATGTGGCAC TGGCGCAGCT CATCGGAGCC GCCATCACCC GCACCGGCCG CATGACCGGA     540
CTTATCGCCC AGGGCACCCG GTCCCCGATG GTCGCCGTCG CCGGGGTCAC CCGTGAGCAG     600
CTGCAGGCCG CCATAGATAA GGCCGCCGCC GATGTGCCCG AGGAGATCCG CCCCGTCATC     660
GGTCTGCGCA ATGCCCGCAC CACCTATGTC CTGGTCGGTC GCCCCGATGA CAACCAGCGT     720
GTGATCACCG CGCTGGAGGC CATGGCCGCC GCTGATGCCA AGGCGATTGA GAACAAGGAG     780
CGCGGCGGTC AGCCGTTCGC CCCGCGCATC ACCCAGCTGG ATGTCCAGGC CGCCTTCCAC     840
CACCCGGCGA TGTCCATGGC GGTTGAGCAG ACCGTCGCCT GGGCGACGGC CTGTGGCCTG     900
GACGCGGAGA CCTCCCGTGA GGTCGCCGCC GACGTGCTGG TCAACCCCGT CGACTGGGTG     960
GCTGCCGTCA CCGGTGCGCT GGATGCCGGC GCCCGGTGGA TCCTCGATGT CGGTCCCGAC    1020
GGTGGCGTGG TGCCCCTGAC CAACTCCATC CTCGCCGGCC GCGGTGCCGC CTCCTTCGCC    1080
GTGTGCGACA CCGACGGTCA GGCCCGGGTC TTCGATGCCG GCATGGCACC GGAGCTGCCC    1140
CGCTCCTATG ACGAGTTCGC CCCTCGGGTG GAATCCATCG ATGGTCGTCC CCGCCTGGTC    1200
ACGCGCTTCA CCGAACTGAC CGGCCGCAGC CCCATGCTGC TCGCCGGCAT GACCCCCACC    1260
ACCGTCGACC CCGAGATCGT CGCAGCCGCC GCCAACGGTG GACACTGGGC CGAGCTCGCC    1320
GGTGGTGGCC AGGTCACCCC GGAGATCCTC GAATCCAATA TCGAGAAGCT CACCGGGCTG    1380
CTCGAACCGG GCGTCAATGT CCAGTTCAAC TCGATGTTCC TCGATCCCTA CCTGTGGAAG    1440
ATGCAGATCG GTGGCAAGCG CCTGGTGCCC AAGGCACGCG CCAACGGTGC CCCCATCGAC    1500
GGCATCGTCA TCACCGCCGG CATGCCGGAG AAGGACGAGG CCGTCAGCCT CGTGCGCGAG    1560
CTTGTCGACG GCGGATTCCC CTGGATCTCC TTCAAGCCGG GCGCCGTCAA ACAGGTCCAC    1620
GCCGTCCTCG CGATCGCCCG TGAACTGCCC GACACCCCGA TCATCATCCA TGTGGAGGGC    1680
GGGATCGCCG GTGGTCACCA CTCCTGGGAG AACCTCGACG ATCTCCTGAT CGCCACCTAC    1740
GCCGACATCC GCGCCCTGGA CAACGTCGTG CTCTGCGTCG GCGGTGGCAT CGGCACCCCG    1800
GAACGCGCCG CTGACTACAT CACCGGTTCC TGGGCGACCG CCCACGGCCT GCCCGCCATG    1860
CCTGTCGACG GCATCCTCAT CGGCACCGCC GCCATGGCCG CCAAGGAGGC CACCACCTCC    1920
CAGTCCGTTA AGGAACTGCT GGTGGCCACC CCGGGCACCA CCGAATGGGT CCCCGCCGGT    1980
GGCGCCGCCA ACGGTATGGC CTCCGGACGC TCCCAGCTGG GTGCGGACAT CCATGAGATC    2040
GACAACTCCT TCGCCCGCGC CGGACGTCTC CTCGATGAGG TCGCCGGTGA TGAGGAAGCC    2100
GTCCAGGCCC GTCGTGAGGA GATCATCGCC GCCATCGGCA AGACCGCCAA GGTCTACTTC    2160
GGTGACCTCG GTTCCATGAC GTACCAGCAG TGGCTCAACC GCTACCTGGA ACTGTCCGGA    2220
CCGGTCAACG GTGAGTGGAT CGACGTCTCC TGGGCGAACC GTTTCGCCCA GATGCTCGAA    2280
CGCGCCGAGG CCCGCCTCAT CGACCAGGAC CACGGACAGT TCACCCCGTC GCACACCCTG    2340
GAAGACGGAG TGGAGCCCCA GCAGGTCGTC GACAAGCTCG TCGCCGACCT CCCGCACGCC    2400
GCCACCGACC TGCTCACCCC GGCTGATGCG GCGTGGTTCC TCGGACTGTG CCGCACCCCG    2460
GGCAAGCCGG TGTGCTTCGT GCCGGTCATC GACAAGGACG TGCGCCGCTG GTGGCGTTCG    2520
GATTCCCTGT GGCAGTCCCA CGACGAGCGT TTCGACGCCG ACCAGGTCGC CATCATCCCC    2580
GGCCCGGCCG CGGTCGCCGG CATCACGAAA GCCAATGAGC CGGTCGCTGA CCTGCTCGAC    2640
CGGTTCAACG CCGCCTCCAT CGAGCGCATC ACCGAGGTGC ACGAGGTCGA GCGCGACCTC    2700
ATCGACGAGC TGCTCACCGC GCCGGGCACC TACTGGGCCG GCCGCAACAC CATCTCCATG    2760
ATCCACCGCC TCGGTGACGT GGACGCCTGG GAGCGCGACG GTGAGACCGC CCACCACGCC    2820
CCGACCGGTG CCCGCCTCGA GGTCGAGGAC ACCGAGCATG TCCTGCTCAC CGTGCCGCTG    2880
GCCGGATCCA CCGCGTTCGG CACCACCACC GATCTGGTCA TCCGTTTCAC CCTGCCCGGG    2940
GACACCATCC CCGGTGCCGT CCCACAGGTC ACCCAGGCTG ACGCCGAGGC CGCCATGGGT    3000
GAGCTCACCC GTGTCGCCGC CGGTGGCACC CTGGCCACCA TCACCGATGG TGTCGCCGAG    3060
TGGGAGACCA CCCTGGACGC CAGTCACCTG GCCGACTATG ACAATGTCAC CGCCGCGCAC    3120
CTCCCGGCCA CCGTGACCCC GGCCGCCACC GCACCCGATG TGCTCGTCGG TCGCGCCTGG    3180
CCCGCCGTGT TCGCCGCGGT CCGTTCCGCC GTGATCCCGG GTACCGATTC CGCGTCCGTG    3240
GTTGAGGGCA TGCTCTCCCT GGTCCACCTC GAGCACCACA TCAAGCTCAC CGCCGAGCTG    3300
CCCTCCGTGG CCGACGGTGA GGTAGCGCTG CAGGTCACCG CCACCGCCGA TGAGGTCTCC    3360
GATACCTCCA TGGGCCGTGT CGTGGTGGTC CGCGCCCGCA TCACCGCCGG TGATCAGCAG    3420
```

```
ATCGCCACCC TGTCCGAGCG TTTCGCCATC AAGGGCCGCA ACGGTGACAC CGTCGCACGC      3480
ACCAACACCT CCACCCTGCC CACCATCATC GACACCCCAC GCTCCCACCG GGCCGTGGCC      3540
GAGGTGGTCG CACCGGAATC CATGCGCCCC TTCGCCGTGG TCTCCGGGGA CCGCAACCCG      3600
ATCCACGTCT CCGACACCGC AGCAGCCCTT GCCGGCCTGC CCGGCGTGAT CGTCCACGGC      3660
ATGTGGACCT CCGCCATCGG CGAACTGATC GCCGGTGCCG AGTTCACCGA TGAGCAGGCC      3720
CACACCCCGG CCGCCCGCGT CGTGGAGTAC ACCGCCACCA TGCTGGCCCC GGTCATGCCG      3780
GGGGAGACCA TCGTGTTCAC CGTGGAACGC TCCGCCGTGG ATTCCCGCCC CGGCCACGGC      3840
GAGGTCCGCT CCGTCACCGC CACCGTCAAC GGCAACCTGG TGCTCACCGC CACCGCCGTG      3900
ATGGCCGCGC CGACCACCTT CTACGCCTTC CCCGGCCAGG GCATCCAGTC CCAGGGCATG      3960
GGCATGGAAT CCCGCCGCAA CTCCGCGGCC GCCCGCGCCA TCTGGGACCG CGCCGACGCA      4020
CACACCCGCG CCAAGCTGGG CTTCTCCATC CTCGAGATCG TGGAGAACAA CCCCACCGAG      4080
GTCACCGTGG GCGGGGAGAA GTTCTTCCAC CCCGACGGCG TGCTCTTCCT CACCCAGTTC      4140
ACCCAGGTCG GCATGGCCAC CCTCGGTGTG GCCCAGGTCG CCGAGATACG CGAGGCCCAC      4200
GCCCTGAACC AGCAGGCGTT CTTCGCCGGT CACTCCGTCG GTGAGTACAA CGCCCTGGCC      4260
GCCTACGCCG GTGTGCTCTC CCTGGAGTCC GTGGTGGAGA TCGTCTACCG CCGCGGCCTG      4320
ACCATGCACC GTCTGGTCGA CCGCGATGAG AACGGCCTGT CCAACTACGG CCTGGCCGCC      4380
CTGCGTCCCA ACAAGATGGG CCTGACCGCC GATGATGTCT TCGACTATGT CGCAGGTGTC      4440
GCTGAGCAAT CCGGGGAGTT CCTCGAGATC GTCAACTACA ACCTGGCCGG TCTGCAGTAC      4500
GCGGTCGCCG GAACCCAGGC GGGCCTGAAG GCCCTGCGTG CCGACGTGGA GCACCGCGCA      4560
CCGGGCCAGC GTGCCTTCAT CATGATCCCG GGCATCGACG TGCCCTTCCA CTCATCCAAG      4620
CTGCGTGACG GCGTGGGTGC CTTCCGCGAG CACCTGGATT CCCTCATCCC GGCCGAACTG      4680
GATCTGGAGA CCCTCGTCGG TCGTTACATC CCGAACCTGG TGGCCCGTCC CTTCGAACTC      4740
ACCCGTGAGT TTGTCGAGTC CATGGCCGAG GTCGTCGACT CCCGGTACGT CAACGACATC      4800
CTCGCCGACT TCGAGGCCGC CGCACGCGAG GAGCAAAAGC TCGCCCGCAC CCTGCTCATC      4860
GAGCTGCTGG CCTGGCAGTT CGCCTCCCCG GTCCGCTGGA TCGAAACCCA GGACCTGCTC      4920
ATCCGTTCCC GCGAACAGGG CGGTCTGGGT GTTGAGCGTT TCGTGGAGGT CGGTGTCGGT      4980
TCCGCCCCGA CCGTGGCCAA CATGATGGGC CAGACCCTCA ACCTGCCGCA GTACCGCGAG      5040
GCCGAGATCG AGGTCCTCAA CATCGAACGC GACCGCCCGG TGGTCTTCGC CACCGATGAG      5100
GTGGTCCGCG AACTGGCCTC CGAGCCTGCC GACGCTGACT CCTCATCCGT CGACACGCCT      5160
GCGACGGAAG GTACCCAGGT TGCCGCCACC GCAGCGCCCG AGGCCGCACC GGCCGCTGTG      5220
CCCGCCGCAC CCGTGGCCAC CGGTGGCCCC CGCCCAGAGG ACATCGAGTT CACCCCGGCG      5280
GATGCCACCG AGATGCTCAT CGCCATCTGG ACCAAGGTCC GCCCGGATCA GATGGGTGCC      5340
ACCGACTCCA TCGAGACACT CGTGGAGGGT GTCTCCTCAC GCCGCAACCA GCTGCTGCTG      5400
GACCTCGGCG TGGAATTCGG CCTGGGTGCC ATCGACGGTG CCGCCGACGC GGAACTCGGT      5460
GACCTCAAGG TGACCGTGTC CAAGATGGCC AAGGGCTACC AAGCCTTCGG GCCGGTGCTC      5520
TCCGATGCCG CAGCCGATGC GCTGCGCCGT ATCACCGGCC CCACCGGCAA GCGCCCGGCG      5580
TACATCGCCG AGCGTGTCAC CGGCACCTGG CAGCTCGGCC AGGGCTGGGC CGATCATGTC      5640
GTCGCCGAGG TGGTCATCGG TGCCCGCGAG GGAGCCTCCC TGCGCGGTGG TGACCTGGCC      5700
ACCCTGGCTC CCGCCGCACC GTCGAGCGCC GCCGAGCTTG ATGCGCTTAT CGACGCCGCC      5760
GTGGCCGCCG TCGCCGCCCG CCTCGGCGTT GCCGTCTCCC TGCCGTCCGC AGGTGGCGCA      5820
GCCGGTGGAG TTGTCGACTC CGCAGCACTC GGCGAATTCG CCGAGCAGGT CACCGGTAAG      5880
GCCGGTGTCC TGGCCGCGAC CGCACGCACC ATCCTCTCCC AGCTGGGTCT GGATGCCCCC      5940
GCACAGGCCG CCTTTGAGGA GGCTGAGTCC GACAACGAGC TCTATGAGCT GGTCTCCCGT      6000
GAGCTCGGTT CCGACTGGCC ACGCCAGGTC GCACCCAGTT TCGATGCCGA CCGCGTGGTG      6060
CAGATCGACG ACCGCTGGGC CTCCGCCCGC GAGGACCTCA CCCGTGTCGC CCTGGGCGAA      6120
CTGGATGAAG CCGACATCGA TGTCACCGGC GCCGGCGAGG TCGTGGCCGT CCAGGCCGAG      6180
TACCTCGGTC TGGACGCGCT GGCCGAGCAG GCCCGCGACA CCGCCGCTCT GGAGTACGCC      6240
GATGATGTCG CCGTGGTCAC CGGTGGGTCG CCGAACTCGA TCGCGGCGGC GGTCGTCGAG      6300
AAGCTCCTGG CCGGTGGTGC CACCGTGGTG GCCACCACCT CCAGCCTCAA CCACGACCGC      6360
CTGGAGTTCT ACAAGGAGCT CTACGCCCGT TCCGCCCGTG GCACAGCCGC CCTGTGGGTG      6420
GTCCCGGCGA ACCTGAGCTC GTACACGGAC ATCGACGCGA TCGTGAACTG GATCGGCACC      6480
GAACAGACCG CGACCGTCAA CGGCAAGTCC AAGCTGATCA AGCCGGCGAT GATCCCGACC      6540
CTGCTGTTCC CGTTCGCCGC ACCGCGTGTG TCCGGGTCCA TGGCGGATGC CGGTGGTCAG      6600
ACCGAGGCCC AGATGCGCCT GTTGCTGTGG TCGGTGGAAC GCCTCATCGT GGGACTGGCA      6660
CCGCTGGGGG CTGACACCCG CGTCGGCCAC CGCCTGCACG TGGTCATCCC GGGTTCACCC      6720
AACCGTGGCC GCTTCGGTGG CGACGGTGCC TACGGTGAGT CCAAGGCCGC CCTCGATGCC      6780
GTGGTCACCC GCTGGAATGC CGAGCAGAGC GCCTGGGGTG CACACACCTC GCTGGTCCAC      6840
GCCCACATCG GTTGGGTCCG TGGCACCGGC CTCATGGGTG GCAACGACCC GCTCGTGGCC      6900
GCCGCCGAGG AAGCCGGCGT GGAGACCTAC TCCACCGGGG AGATCGCCGA GAAGCTTATC      6960
TCCCAGGTTG CTGCTGAGGT CCGTGAGGAG GCCGCGCAGT CCCCGATCAC CGTTGACTTC      7020
ACCGGTGGCC TGGGGGAGTC CGACATCAAC CTCGCGGAGA TGGCCCGTGC ACTGGAACAG      7080
GCACCGGCCG AGGAGATGGA CAAGCCCCGC ACCATCGCGG CACTGCCCAC CCCGTACCGC      7140
CCGATTGTGC AGACCACCCC GGACTTCGAC GGTCAGGTCA CCCAGTCGCT GGACGGCATG      7200
```

```
GTGGTCATCG TCGGTGCCGG CGAGCTCGGA CCGGTCGGTT CCGCCCGTAC GCGTTTCGAC      7260
GTCGAGGTCT CCGGCGAGCT GTCCGCCGCC GGTGTCATCG AACTGGCCTG GACCACGGGA      7320
CTGATCCACT GGGATGAGGA CCCGACACCT GGCTGGTACG ACGCCAATGA CGAGGCCATC      7380
GCCGAGGAGG ACATCTACGA GCGCTTCCAC GACGAGGTCC TGGCACGTGT GGGTGTGCGC      7440
CGCTACCACG ACATGCCCGC CTACGGCATG TTCGACAACT TCGCCCCCGA GCTGACCACC      7500
GTCTACCTCG ACCACGACCT GACCTTCTCG GTCGGGTCCC GCGAGGAGGC ACTGACCTAT      7560
GTGGAGTCCG AACCGGAGCT GACCACCGCC TCCTACAACG AGGCCGATGG TGAGTGGTCG      7620
GTCACCCGCA AGGCCGGTTC CGCCATCCGC GTGCCACGCC GCATGGCCAT GACCCGCTTC      7680
GTCGGTGGCC AGGTGCCCAA GGACTTCGAC CCTGCCGTCT GGGGTATCCC GGCCGACATG      7740
ATCGACAACC TCGACACCGT GGCACTGTGG AACATCGTCT GCACCGTGGA TGCGTTCCTA      7800
TCCTCCGGTT TCGACCCGGC GGAGCTGCTC GCAGCCATCC ACCCGGCACG CGTGTCCTCC      7860
ACCCAGGGCA CCGGCATGGG TGGCATGGAA TCCCTGCGCG GTATCTACGT CGACCGTCTG      7920
CTGGCCGAGC CGCGCGCCAA CGATGTTCTG CAGGAGGCCC TGCCGAACGT GGTGGCCGCG      7980
CACGTCATGC AGTCCTACGT CGGTGGCTAC GGCCAGATGA TCCACCCGGT GGCCGCGTGC      8040
GCCACCGCGG CTGTGTCCGT GGAGGAGGGT CTGGACAAGA TCCGTGTGGG CAAGGCCGAC      8100
TTCGTGGTCA CCGGTGGTTT CGATACACTG TCCGTGGAGG GTATCACCGG CTTCGGTGAC      8160
ATGGCGGCCA CCGCCGATTC CGCGGAGATG GAACGCAAGG GCATCGAGCA CCGCTTCTTC      8220
TCCCGCGCCA ACGACCGCCG CCGTGGTGGG TTCATCGAGT CCGAGGGTGG TGGCACCATC      8280
CTGCTGGCGC GTGCCTCCCT CGCCGCCGAC ATGGGACTGC CGGTCCTCGG TGTCGTCGGT      8340
TTCGCGGAGT CCTTTGCCGA CGGTGCGCAC ACCTCCATCC CGGCCCCCGG CCTGGGTGCG      8400
CTCAGTGCCG CCCGTGACGG TGTGGAATCG CGCCTGGTCC ACGCACTGGC CGAGGTGGGT      8460
GTGACCGCTG ATGAGATCTC GATCATCTCC AAGCACGACA CCTCCACCAA CGCCAATGAC      8520
CCGAACGAAT CCGACATGCA CGAGCGCATC GCCGCCGCGA TCGGCCGGAC CCCGGGCAAC      8580
CCGCTGTATG TGGTGTCCCA GAAGTCCCTG ACCGGCCACG CCAAGGGTGG TGCCGCAGCC      8640
TTCCAGCTCA TCGGCCTCAC CCAGGTGCTG CGCTCCGGCA TCGTCCCGGC CAACCGTGCA      8700
CTGGACTGCG TCGACCCGGT TCTGGCCCGC CACCAGCACC TGGTGTGGCT GCGCAAGCCG      8760
CTGGACCTCT CGTCCAAGGC GCCGAAGGCC GGTCTGGTGA CCTCGCTTGG TTTCGGTCAC      8820
GTCTCCGCGC TGGTCGCGGT CGTGCACCCG GATGCCTTCC ACGAGGCGGT CCGCGTCGAG      8880
CGTGGCGACG ACGCCGCCGA GCAGTGGCGC GCCGCCGCCA CCGCCCGCGA GGATGCAGGT      8940
CTGCGCCGCA TCGTCGCCGG CATGCACGGT GGTGTGCTCT ATGAGCGCCC CGTCGAGCGC      9000
AACCTCGGCG TCCAGGCCGG TGCGGCCCGT GAGATCGAGG CGGCCGTGCT GCTCGACTCC      9060
CGCGCCCGGC TTGTCGACGG TGTCCTCAAG CCGACCGGTT ACGAAGGCTA A               9111
```

Die entsprechenden Basen für die Punktmutation an Position S1778A und S1779A sind farblich unterlegt. Es erfolgte eine Mutation von TCC TCA zu GCG GCG.

## Aminosäure-Sequenz der SII-CeFAS im pET22b(+)-Expressionsvektor

```
MASWSHPQFE KGVDVTEPGS NFGTSRLINR FDQEPYAFAF SGQGFNWLKT LRAAVAAGAG      60
TNVQGIVERA QELLAPVADE LAGTFPFGFD PVAWANAVDT PNFDTAQAAV SVPGIFVSQI     120
ATLDSLESQR LDVEKSVAAI GHSQGVLGVH LLRDLTRADE YVALAQLIGA AITRTGRMTG     180
LIAQGTRSPM VAVAGVTREQ LQAAIDKAAA DVPEEIRPVI GLRNARTTYV LVGRPDDNQR     240
VITALEAMAA ADAKAIENKE RGGQPFAPRI TQLDVQAAFH HPAMSMAVEQ TVAWATACGL     300
DAETSREVAA DVLVNPVDWV AAVTGALDAG ARWILDVGPD GGVVPLTNSI LAGRGAASFA     360
VCDTDGQARV FDAGMAPELP RSYDEFAPRV ESIDGRPRLV TRFTELTGRS PMLLAGMTPT     420
TVDPEIVAAA ANGGHWAELA GGGQVTPEIL ESNIEKLTGL LEPGVNVQFN SMFLDPYLWK     480
MQIGGKRLVP KARANGAPID GIVITAGMPE KDEAVSLVRE LVDGGFPWIS FKPGAVKQVH     540
AVLAIARELP DTPIIIHVEG GIAGGHHSWE NLDDLLIATY ADIRALDNVV LCVGGGIGTP     600
ERAADYITGS WATAHGLPAM PVDGILIGTA AMAAKEATTS QSVKELLVAT PGTTEWVPAG     660
GAANGMASGR SQLGADIHEI DNSFARAGRL LDEVAGDEEA VQARREEIIA AIGKTAKVYF     720
GDLGSMTYQQ WLNRYLELSG PVNGEWIDVS WANRFAQMLE RAEARLIDQD HGQFTPSHTL     780
EDGVEPQQVV DKLVADLPHA ATDLLTPADA AWFLGLCRTP GKPVCFVPVI DKDVRRWWRS     840
DSLWQSHDER FDADQVAIIP GPAAVAGITK ANEPVADLLD RFNAASIERI TEVHEVERDL     900
IDELLTAPGT YWAGRNTISM IHRLGDVDAW ERDGETAHHA PTGARLEVED TEHVLLTVPL     960
AGSTAFGTTT DLVIRFTLPG DTIPGAVPQV TQADAEAAMG ELTRVAAGGT LATITDGVAE    1020
WETTLDASHL ADYDNVTAAH LPATVTPAAT APDVLVGRAW PAVFAAVRSA VIPGTDSASV    1080
VEGMLSLVHL EHHIKLTAEL PSVADGEVAL QVTATADEVS DTSMGRVVVV RARITAGDQQ    1140
IATLSERFAI KGRNGDTVAR TNTSTLPTII DTPRSHRAVA EVVAPESMRP FAVVSGDRNP    1200
IHVSDTAAAL AGLPGVIVHG MWTSAIGELI AGAEFTDEQA HTPAARVVEY TATMLAPVMP    1260
GETIVFTVER SAVDSRPGHG EVRSVTATVN GNLVLTATAV MAAPTTFYAF PGQGIQSQGM    1320
GMESRRNSAA ARAIWDRADA HTRAKLGFSI LEIVENNPTE VTVGGEKFFH PDGVLFLTQF    1380
TQVGMATLGV AQVAEIREAH ALNQQAFFAG HSVGEYNALA AYAGVLSLES VVEIVYRRGL    1440
TMHRLVDRDE NGLSNYGLAA LRPNKMGLTA DDVFDYVAGV AEQSGEFLEI VNYNLAGLQY    1500
AVAGTQAGLK ALRADVEHRA PGQRAFIMIP GIDVPFHSSK LRDGVGAFRE HLDSLIPAEL    1560
DLETLVGRYI PNLVARPFEL TREFVESMAE VVDSRYVNDI LADFEAAARE EQKLARTLLI    1620
ELLAWQFASP VRWIETQDLL IRSREQGGLG VERFVEVGVG SAPTVANMMG QTLNLPQYRE    1680
AEIEVLNIER DRPVVFATDE VVRELASEPA DADSSSVDTP ATEGTQVAAT AAPEAAPAAV    1740
PAAPVATGGP RPEDIEFTPA DATEMLIAIW TKVRPDQMGA TDSIETLVEG VSSRRNQLLL    1800
DLGVEFGLGA IDGAADAELG DLKVTVSKMA KGYQAFGPVL SDAAADALRR ITGPTGKRPA    1860
YIAERVTGTW QLGQGWADHV VAEVVIGARE GASLRGGDLA TLAPAAPSSA AELDALIDAA    1920
VAAVAARLGV AVSLPSAGGA AGGVVDSAAL GEFAEQVTGK AGVLAATART ILSQLGLDAP    1980
AQAAFEEAES DNELYELVSR ELGSDWPRQV APSFDADRVV QIDDRWASAR EDLTRVALGE    2040
LDEADIDVTG AGEVVAVQAE YLGLDALAEQ ARDTAALEYA DDVAVVTGGS PNSIAAAVVE    2100
KLLAGGATVV ATTSSLNHDR LEFYKELYAR SARGTAALWV VPANLSSYTD IDAIVNWIGT    2160
EQTATVNGKS KLIKPAMIPT LLFPFAAPRV SGSMADAGGQ TEAQMRLLLW SVERLIVGLA    2220
PLGADTRVGH RLHVVIPGSP NRGRFGGDGA YGESKAALDA VVTRWNAEQS AWGAHTSLVH    2280
AHIGWVRGTG LMGGNDPLVA AAEEAGVETY STGEIAEKLI SQVAAEVREE AAQSPITVDF    2340
TGGLGESDIN LAEMARALEQ APAEEMDKPR TIAALPTPYR PIVQTTPDFD GQVTQSLDGM    2400
VVIVGAGELG PVGSARTRFD VEVSGELSAA GVIELAWTTG LIHWDEDPTP GWYDANDEAI    2460
AEEDIYERFH DEVLARVGVR RYHDMPAYGM FDNFAPELTT VYLDHDLTFS VGSREEALTY    2520
VESEPELTTA SYNEADGEWS VTRKAGSAIR VPRRMAMTRF VGGQVPKDFD PAVWGIPADM    2580
IDNLDTVALW NIVCTVDAFL SSGFDPAELL AAIHPARVSS TQGTGMGGME SLRGIYVDRL    2640
LAEPRANDVL QEALPNVVAA HVMQSYVGGY GQMIHPVAAC ATAAVSVEEG LDKIRVGKAD    2700
FVVTGGFDTL SVEGITGFGD MAATADSAEM ERKGIEHRFF SRANDRRRGG FIESEGGGTI    2760
LLARASLAAD MGLPVLGVVG FAESFADGAH TSIPAPGLGA LSAARDGVES RLVHALAEVG    2820
VTADEISIIS KHDTSTNAND PNESDMHERI AAAIGRTPGN PLYVVSQKSL TGHAKGGAAA    2880
FQLIGLTQVL RSGIVPANRA LDCVDPVLAR HQHLVWLRKP LDLSSKAPKA GLVTSLGFGH    2940
VSALVAVVHP DAFHEAVRVE RGDDAAEQWR AAATAREDAG LRRIVAGMHG GVLYERPVER    3000
NLGVQAGAAR EIEAAVLLDS RARLVDGVLK PTGYEG                              3036
```

Die beiden Serine sind hier markiert sie wurden beim Kristallisationskonstrukt zu Alanin mutiert, S1778A S1779A.

### 5.4.4 AcpS Sequenzen

**DNA-Sequenz der *M. tuberculosis* AcpS im pETCocol(+)-Vektor**

```
ATGGGCATCG TCGGTGTGGG GATCGACCTG GTCTCCATTC CCGATTTCGC CGAGCAGGTC     60
GACCAGCCCG GAACGGTGTT CGCCGAGACC TTCACCCCGG GTGAGCGCCG GGACGCCTCG    120
GACAAGAGTT CGTCGGCGGC CCGGCACCTG GCGGCCCGCT GGGCCGCGAA GGAGGCGGTG    180
ATCAAGGCCT GGTCCGGATC GCGGTTCGCG CAGCGGCCGG TGTTGCCGGA GGACATCCAC    240
CGCGATATCG AGGTGGTCAC CGATATGTGG GGCAGGCCGC GGGTCAGGCT GACCGGGGCC    300
ATCGCTGAGT ATTTGGCCGA CGTGACGATC CATGTGTCGC TGACCCACGA AGGGGATACC    360
GCGGCCGCGG TCGCCATCCT GGAGGCCCCG TGA                                 398
```

**Aminosäure-Sequenz der *M. tuberculosis* AcpS im pETCocol(+)-Vektor**

```
MGIVGVGIDL VSIPDFAEQV DQPGTVFAET FTPGERRDAS DKSSSAARHL AARWAAKEAV     60
IKAWSGSRFA QRPVLPEDIH RDIEVVTDMW GRPRVRLTGA IAEYLADVTI HVSLTHEGDT    120
AAAVAILEAP                                                           132
```

**DNA-Sequenz der *C. ammoniagenes* AcpS im pETCocol(+)-Vektor**

```
ATGCTCGACA ACCGTGAAGC GATGACCGTG GGTGTGGACT TGGTCCACAT CCCCGGCTTT     60
GCCGAGCAAT TGTCGCGCCC TGGTTCGACT TTTGAGCAAG TGTTTTCGCC GTTGGAACGT    120
CGTCATGCTC AAACGCGCCG TGACGCTGCA GCGGATGCTA CGAATTCGAG CCTTGCGGGT    180
TCACGGACTG AGCACCTGGC TGGGCGGTGG GCGGCAAAAG AAGCGTTCAT CAAGGCGTGG    240
TCGCAAGCGA TCTACGGCAA GCCACCAGTG ATTGAACCAG ACCTGGTGAA CTTCGCAGAG    300
ATCGAAGTCT TGCCCGACCG CTGGGGCAGG GTAGCGCTGC AGCTTAAAGG TGAAGTTGCT    360
GCAAAACTTC AGGAATCAAT AGGCGACGTG GAGCTGGCGC TGAGCATCAG CCATGATGGC    420
GATTACGCCA CCGCGCAGTG CCTGCTGCGG TACCAGCGGT AA                       462
```

**Aminosäure-Sequenz der *C. ammoniagenes* AcpS im pETCocol(+)-Vektor**

```
MLDNREAMTV GVDLVHIPGF AEQLSRPGST FEQVFSPLER RHAQTRRDAA ADATNSSLAG     60
SRTEHLAGRW AAKEAFIKAW SQAIYGKPPV IEPDLVNFAE IEVLPDRWGR VALQLKGEVA    120
AKLQESIGDV ELALSISHDG DYATAQCLLR YQR                                 153
```

**DNA-Sequenz der *C. efficiens* AcpS im pETCocol(+)-Vektor**

```
ATGATCTCGA TTGGAACCGA TCTCGTCCAT ATCCCGGCCT TCGCGGACCA ACTCGCCCAG     60
CCGGGCAGTT CCTTCATGGA TGTGTTCGGG GCGGGGGAGC GTCGTCTGGC GTCGAGACGC    120
GCCGGCAACC GCAACGCCGA ACACCTGGCC GGCCGCTGGG CGGCGAAGGA GGCCTTCATC    180
AAGGCCTGGT CGCAGGCGAT CTACGGGCAG CCCCCGGTGA TACCTGAGGA GGATGTGCAG    240
TGGGCGCTGA TCGAGGTGCG CGCCGACCGC TGGGGGCGGG TGGCCCTGGA CATCGCACCG    300
TCGCTGGACA CCCAGGTCCG GGAGAGCATC GGTGATTACA CCACCAGCCT GAGCATCAGC    360
CACGACGGCG ACTACGCCAC CGCGGTGTGC GTGCTGAGCT ACGCCGTGGC CACCGAGAAC    420
AGGTAG                                                               426
```

**Aminosäure-Sequenz der *C. efficiens* AcpS im pETCocol(+)-Vektor**

```
MISIGTDLVH IPAFADQLAQ PGSSFMDVFG AGERRLASRR AGNRNAEHLA GRWAAKEAFI     60
KAWSQAIYGQ PPVIPEEDVQ WALIEVRADR WGRVALDIAP SLDTQVRESI GDYTTSLSIS    120
HDGDYATAVC VLSYAVATEN R                                              141
```

## 5.5 Vektorkarten

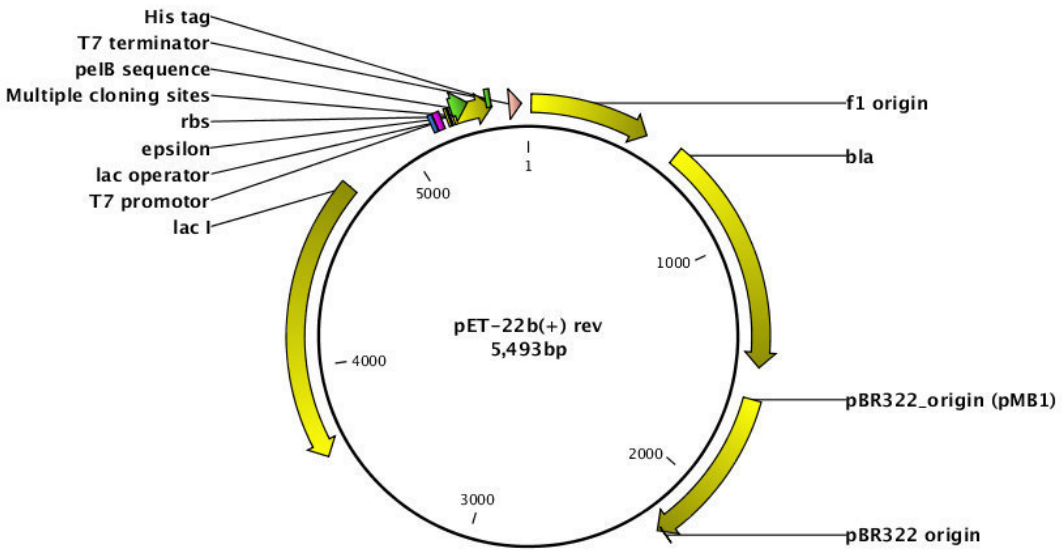



**Abbildung 5.2: *pET22b* (+) Vektor.**

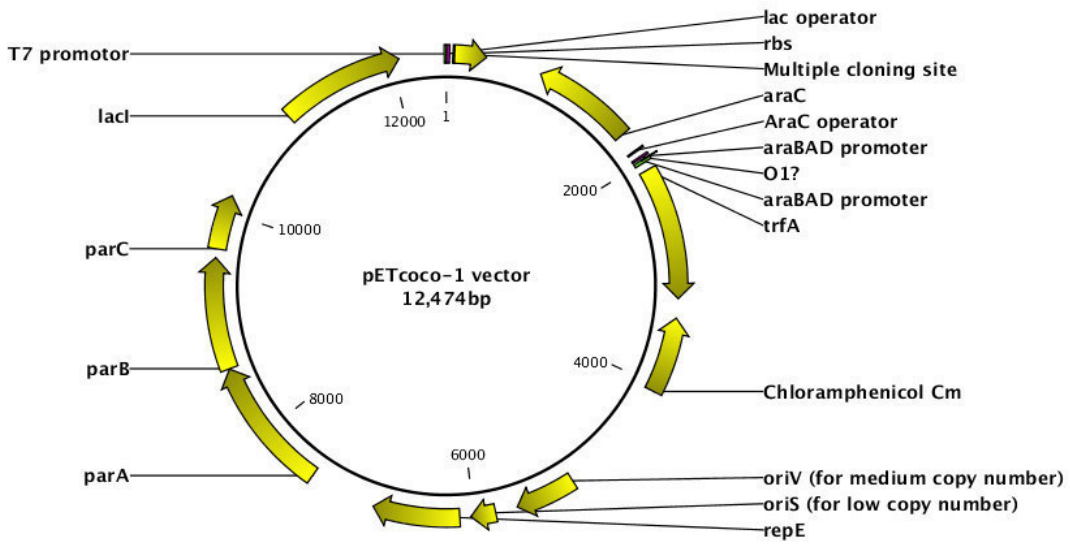



**Abbildung 5.3: *pETcoco-I* (+) Vektor.**

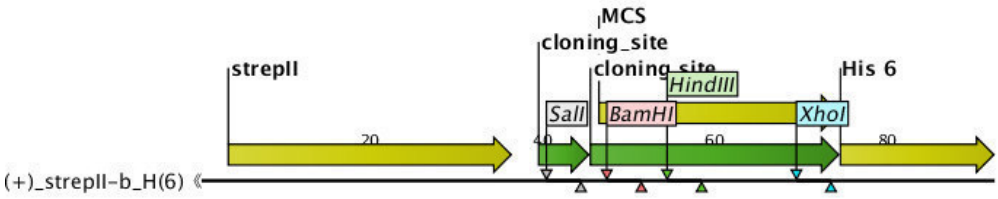



**Abbildung 5.4: Multiple-Cloning-Site mit flankierenden Tags des Klonierungsvektors *pME*strepII-164-I.**

# 6. Danksagung

Am Ende wohl jeden Promotionsprojekts steht neben der Freude über den Abschluss der Arbeit ein tiefes Gefühl von Dankbarkeit gegenüber all denen, die über lange und zuweilen schwierige Jahre hinweg mit Rat und Tat zur Stelle waren. Auch ich habe so vielen aus meinem wissenschaftlichen Umfeld zu danken, die meine Arbeit begleitet haben.

Dank gebührt natürlich in erster Linie meinem Doktorvater Professor Martin Grininger. Er hat mich über ein Schlupfloch mit großem Einsatz in die Wissenschaft geführt und mit seinem souveränen Wissen eine lange und lehrreiche Zeit durch das Projekt hindurch begleitet. Immer habe ich mich auf seine Unterstützung und auf die familienfreundliche Gestaltung meiner Pendelei zwischen München und Frankfurt verlassen können. Seine Anregungen in schwierigen Situationen im Arbeitsverlauf und sein loyales Verständnis für Freud und Leid seines Doktoranden in allen Lebenslagen waren mir immer eine große Hilfe.

Sehr herzlich möchte ich mich an dieser Stelle zudem bei Professor Volker Dötsch für die Übernahme der Erstbegutachtung meiner Arbeit bedanken.

Auch bei Herrn Professor Dieter Oesterhelt möchte ich mich sehr für das entgegengebrachte Vertrauen und für die großzügige Bereitstellung der finanziellen Mittel in der Anfangsphase der Arbeit bedanken.

For a lot of friendly support and for many funny moments I would like to thank my dear friend and colleague Karthik Paithankar It was always a great time to travel to ESRF or Berlin and share a tiny office with you.

Ebenso möchte ich mich sehr herzlich bei Julio Ortiz für all die vielen Stunden bedanken, die er trotz seines voll gepackten Forschungsalltags in unser Randprojekt gesteckt hat.

Dank gebührt Andreas Hoffman für die gemeinsame Zeit im Schreibraum D4. Ebenfalls Dank sage ich Alex Rittner für viele hilfreiche Ideen und viele witzige

Abende im Labor, Jan Gajewski für seine Unterstützung bei den Aktivitätsmessungen und für die unzähligen Files, die nach München geschickt wurden, wie auch Manuel Fischer für die spannende Zeit an der gemeinsamen Bench. Allen hier genannten Personen möchte ich auch für die zahlreichen wertvollen Anmerkungen bei der Durchsicht meiner Arbeit danken.

Emanuel danke ich für seinen großen Einsatz bei einem nicht gerade trivialen Thema, Ines Gößner und Nina Cortina danke ich für die schöne Zeit und ihre freundschaftliche Unterstützung während meiner Aufenthalte in Frankfurt. Mein Dank schließt auch Kosta Kostantinidis für die Betreuung meiner Diplomarbeit und David Wirthenson für viele gemeinsame Stunden im Labor und im Kühlraum ein. Schließlich bedanke ich mich bei Sabine Liebscher und Benjamin Küttner für das finale Korrekturlesen meiner Arbeit sowie bei Christian Benda und Andreas Bracher für all ihre Hilfen und Unterstützungen in zahlreichen Problemlagen sowie für die großartige Organisation etlicher Messzeiten am ESRF.

Von ganzem Herzen danken möchte ich aber auch meiner Familie, ohne deren treue Unterstützung meine Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Hier bedanke ich mich vor allem bei meinen Eltern, die all die Jahre hindurch meine berufliche Entwicklung und mein Studium mit großer Anteilnahme unterstützt haben. Sie haben mich über alle Höhen und Tiefen hinweg aufgemuntert und stets an mich geglaubt. Leider kann ich diesen Dank nur noch an meine Mutter persönlich aussprechen.

In diesen Dank schließe ich natürlich auch meinen Bruder Holger mit Heike und Lucas, sowie Heidi und Gerd Mielke ein, sie alle waren mir stets eine verlässliche große Hilfe.

Zuletzt, aber in Wirklichkeit doch zu allererst danke ich Dorothee und unserem Sohn Max. Sie haben in den zurückliegenden Jahren die vielen Reisetage und alle meine Stimmungslagen – die guten und euphorischen wie auch die miesen und betrübten - mit fröhlicher Gelassenheit und herzlicher Tatkraft ertragen, und sie haben mir immer liebevoll und lachend gezeigt, wie schön das Leben auch jenseits des Labors und der Pipette sein kann.

**Publikationen**

**Ciccarelli, L., Connell, S. R., Enderle, M., Mills, D. J., Vonck, J. and Grininger, M.** (2013). Structure and conformational variability of the *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase multienzyme complex. *Structure* 21, 1251-1257.
Pdb-code: 4V8V, 4V8W.

**Enderle, M., McCarthy, A., Paithankar, K. and Grininger, M.** (2015). Crystallization and X-ray diffraction studies of a complete bacterial fatty acid synthase type I. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 71**,** 1401-1407.

**Konferenz - Workshopteilnahme**

1st European Conference on natural Products: Research and Application. Frankfurt (D), (September 2013).

22nd Annual Meeting of the German Crystallographic Society. Berlin (D), (March 2014).

EMBO Practical Course – Exploiting Anomalous Scattering in Macromolecular Structure Determination. Grenoble (F), (Juni 2011).

EMBO Practical Course – Computational Structural Biology: From Data to Structure to Function. Hamburg (D), (Mai 2013).

## Vorträge, Posterpräsentationen

### Vorträge

11th Graduate Retreat Schloss Ringerberg, Kreuth (D), (März 2011).
Structure of the bacterial fatty acid synthase from *Corynebacterium ammoniagenes*.

BMLS Frankfurt D, (Februar 2014).
Studies on the structure and dynamics of bacterial fatty acid synthase type-I.

### Posterpräsentationen

Grenoble (F), (Juni 2011)
Structural work on the bacterial fatty acid synthase.

Hamburg (D), (Juni 2013)
Recombinant expression and purification of the bacterial type-I fatty acid synthase.

Berlin (D), (April 2014)
Snapshots of crystal nucleation of *C. ammoniagens* type-I FAS.