

Kurze Zusammenfassung der Dissertation
„Towards the Conformational Dynamics of Multidomain Proteins“
von Christina Sabine Heil

Multidomänen-Enzyme, wie z. B. Fettsäuresynthasen (FASs) oder Polyketidsynthasen (PKSs), spielen eine bedeutende Rolle in der Biosynthese wichtiger Naturstoffe. Sie sind von großer Bedeutung für die Entwicklung neuer Pharmazeutika und viele Forschungsansätze konzentrieren sich auf das Engineering dieser Proteine. Die beiden Klassen von Multidomänen-Enzymen, FASs und PKSs, sind sich strukturell wie auch funktional sehr ähnlich. Die FAS des Typs I aus Säugern wird als evolutionärer Vorläufer der Familie der PKSs angesehen. Da sie bereits sehr gut untersucht und charakterisiert wurde, eignet sie sich besonders gut als Modellprotein für die Masse an strukturell wenig aufgeklärten PKSs.

Darüber hinaus gelten Fettsäuren als strategisch wichtige Plattformchemikalien, deren Verfügbarkeit über nachhaltige mikrobielle Methoden sichergestellt ist. Beispielsweise gelangte Protein-Engineering an FASs mit Hinsicht auf Kettenlängenkontrolle in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus der Biotreibstoff-Herstellung.

In dieser These liegt der primäre Fokus auf der Säuger-FAS des Typs I. Vorausgegangene Studien an diesem Enzym bestätigten eine außerordentlich hohe konformationelle Vielfalt. Die Vermutung liegt nahe, dass diese konformationellen Dynamiken einen entscheidenden Beitrag zum reibungslosen Ablauf des katalytischen Zyklus der Fettsäurebiosynthese leisten und das Zustandekommen von effektiven Protein-Protein-Interaktionen des ACPs mit anderen katalytischen Domänen unterstützen. Der Transport von Substraten und Intermediaten der Fettsäurekette, der über das ACP sichergestellt ist, spielt eine zentrale Rolle im Katalysezyklus der Fettsäurebiosynthese.

Um ein besseres Verständnis der grundlegenden Prozesse des ACP-vermittelten Transports von Substraten und Intermediaten der Fettsäurekette innerhalb des Katalysezyklus der Fettsäurebiosynthese zu erlangen, bedarf es geeigneter Methoden, die in der Lage sind Protein-Dynamiken zu untersuchen. Allen voran stehen spektroskopische Methoden wie Förster Resonanz Energie Transfer (FRET)- oder Elektronen Spin Resonanz (EPR)-Spektroskopie, mit denen Ensembles konformationeller Zustände selbst großer Proteine in nativem Zustand untersucht werden können. Vor allem Einzelmolekülspektroskopie ist eine wertvolle Methode, um der konformationellen Dynamik und dem Katalysezyklus eines einzelnen Enzyms in Echtzeit zu folgen und so die bisher statischen Bilder der konformationellen Dynamik der Säuger-FAS des Typs I mit zeitaufgelösten Daten zu untermauern.

Spektroskopische Untersuchungen wie EPR und FRET erfordern biophysikalische Proben, die mit Fluorophoren oder Spins markiert sind. Um die Säuger-FAS des Typs I mit solchen Markierungen zu versehen, muss auf eine positionsspezifische, bioorthogonale Strategie zurückgegriffen werden. Eine geeignete Markierungsstrategie für solch große Multidomänen-Enzyme

stellt die Methode der Amber Codon-Suppression dar. Eine Vielzahl an nicht-natürlicher Aminosäuren (ncAAs) mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen können über diese Methode in Proteine eingebaut werden, darunter auch funktionelle Gruppen, die in chemoselektiven Reaktionen verwendet werden können. Über solche Reaktionen können Fluorophor- oder Spin-Markierungen positionsspezifisch in Proteine eingeführt werden.

Die vorliegende These beschäftigt sich grundlegend mit der Anwendung der Amber Codon-Suppressions-Technologie an FASs des Typs I aus Säugern, mit der Absicht diese Multidomänen-Enzyme für spektroskopische Methoden bereitzustellen. Ziel ist es, komplexe biologische Fragestellungen in Bezug auf die konformationelle Dynamik dieser Enzyme - besonders die Prinzipien des ACP-vermittelten Transports der Substrate und Acyl-Ketten der Fettsäurebiosynthese - aufzuklären.

Einen großen Teil dieser Arbeit stellt der Aufbau eines vielfältigen Werkzeugkastens, basierend auf der Amber Codon-Suppressions-Technologie und dessen Etablierung an Säuger-FASs des Typs I dar. Dies beinhaltet umfassende Klonierungen von Amber Codon-Suppressions-Plasmiden, pAC-Plasmide.

Als Schlüsselmethode, wurde ein Reporter Assay für die Etablierung der Amber Codon Suppressions-Technologie in dieser Arbeit entwickelt. Mit Hilfe des Reporter Assays wurden die Effizienz und Zuverlässigkeit des Einbaus unterschiedlicher ncAAs bestimmt, um eine Auswahl effektiver ncAAs und pAC-Plasmide für unsere Zwecke zu treffen.

Der Einbau von ncAAs in Proteine der Größe von Säuger-FASs des Typs I wurde nach meinem besten Wissen zuvor noch nirgends bewerkstelligt und stellt somit eine große Errungenschaft dieser These dar. Über die gewählte Markierungsstrategie konnten Fluoreszenz- und Spin-markierte FASs für FRET- und EPR-Spektroskopie erzeugt werden, die in ersten spektroskopischen Experimenten Anwendung fanden.

Ein tiefgehendes Verständnis des katalytischen Zyklus der Fettsäurebiosynthese - vor allem des ACP-vermittelten Substrat-Shuttles und des Einflusses der konformationellen Dynamik des Enzyms - ermöglichen gezieltes Protein-Engineering mit therapeutischer und biotechnologischer Relevanz - besonders im Hinblick auf Kettenlängenkontrolle. Die hohe strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit sowie der evolutionäre Zusammenhang zwischen FASs und PKSs lassen darauf schließen, dass sich die hier entwickelten Methoden leicht auf PKSs und andere Multidomänen-Enzyme übertragen lassen. Diese Annahme wurde anhand des Einbaus von ncAAs in Module zweier unterschiedlicher PKSs und anschließende Fluoreszenzmarkierung dieser Proteine in dieser These sogar bewiesen.