

**Substratspezifität und Thermostabilität der
D-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase aus *Lactobacillus casei*
sowie strukturelle Untersuchungen von Phytochrom A aus Hafer**

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Andrea Eifert
aus Köln

Köln 2001

Berichtersteller:

Prof. Dr. D. Schomburg

Prof. Dr. R. Krämer

Tag der mündlichen Prüfung:

2. Juli 2001

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. D. Schomburg betreut worden.

Andrea Eifert

1. Referent: Prof. Dr. D. Schomburg

2. Referent: Prof. Dr. R. Krämer

Eingereicht: 8. Mai 2001

Disputation: 2. Juli 2001

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Schomburg für die interessanten Themenstellungen und die ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn PD Dr. Gärtner und allen Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe am Max-Planck-Institut für Strahlenchemie in Mülheim an der Ruhr danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und die wertvollen Tips rund um das Phytochrom. Frau Helene Steffen und Frau Michaela Rajek danke ich für die Fermentation von Phytochrom, Frau Gül Koc und Herrn Ingo Lindner für die Bereitstellung des Chromophors Phycocyanobilin.

Mein besonderer Dank gilt den Mitgliedern des GLB, Herrn Jan Abendroth, Herrn Peter Krämer und Herrn Markus Schröder, für ihre ständige Hilfestellung in Computerfragen, die Striezelrunden zur Glukoseaufnahme und manchen Exkurs in ferne Welten.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Karsten Niefind für seine Hilfe bei allen kristallographischen Themen, Frau Dr. Shivani Chatterjee für die Einführung in die Mutagenese, Frau Dr. Susanne Morbach für die Unterstützung bei der DNA-Sequenzierung, Herrn Daniel Schlieper für Interpretationen aus Sicht eines Biologen, Frau Barbara Beuth und Herrn Guido Sonsmann für einen abwechslungsreichen Laboralltag.

Herrn Dr. Oliver Leven danke ich für die Berechnung thermostabilerer Aminosäureaustausche bei der D-HicDH. Darüber hinaus danke ich Herrn Dr. Gerd Wohlfahrt und Herrn Christian Hoppe für ihre Unterstützung bei Fragen zur Bioinformatik und Thermostabilität von Proteinen.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Sabine Lohmer und Herrn Lejon Martens für die Aufnahme der Massenspektren und die Messung zahlreicher enzymatischer Aktivitäten der D-HicDH-Mutanten von Frau Sabine Lohmer.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit und viele gemeinsame außeruniversitäre Aktivitäten.

Ein besonderer Dank gilt meinem Freund, meinen Eltern und Großeltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und mir in allen Lebenslagen zur Seite standen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	
Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VI
Aminosäuren	VI
Nukleinbasen	VI
PDB-Kürzel	VII
Allgemeine Abkürzungen	VIII
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	5
2.1 Faltung von Proteinen	5
2.2 Thermostabilität von Proteinen	7
2.3 Die D-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase (D-HicDH)	9
2.3.1 Das aktive Zentrum der D-HicDH	14
2.3.1.1 Die D-2-Hydroxy- bzw. 2-Ketocarbonsäure-Bindungstasche	14
2.3.1.2 Die Substratrest-Bindungstasche	15
2.3.2 Domänenbewegung	16
2.3.3 Anwendung der D-HicDH	17
2.4 Der pflanzliche Photorezeptor Phytochrom	17
2.4.1 Struktur und Funktion einzelner Phytochromabschnitte	21
2.5 Aufgabenstellung	23
2.5.1 D-HicDH	23
2.5.2 Phytochrom	24
3 Material und Methoden	27
3.1 Verwendete Materialien	27
3.1.1 Chemikalien	27
3.1.2 Geräte	30
3.1.3 Auswertungsprogramme	32
3.2 Methoden	33
3.2.1 <i>Site Directed Mutagenesis</i> der D-HicDH	33
3.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR-Reaktion a und b)	34
3.2.1.2 Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel	34

3.2.1.3	Aufreinigung der DNA-Probe aus Agarosegelen	35
3.2.1.4	PCR-Reaktion c	36
3.2.1.5	Ethanol-fällung der PCR-Reaktion c	36
3.2.1.6	DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen	36
3.2.1.7	Ligation der mutierten DNA-Fragmente mit Restplasmid	37
3.2.1.7.1	Herstellung kompetenter Zellen	37
3.2.1.8	Transformation	38
3.2.2	Nachweis der korrekten Mutation	38
3.2.2.1	Anzucht von Bakterienkulturen	38
3.2.2.2	Plasmidisolation	39
3.2.2.2.1	Minipräparation von Plasmid-DNA nach der Methode der alkalischen Lyse	39
3.2.2.2.1.1	Restriktionsanalyse der Minipröp-Plasmid-DNA	39
3.2.2.2.2	Midipräparation von Plasmid-DNA	40
3.2.2.3	Konzentrationsbestimmung und Reinheit von DNA	40
3.2.2.4	DNA-Sequenzierung	41
3.2.3	Proteinaufreinigung	42
3.2.3.1	Proteinexpression und Reinigung der D-HicDH	42
3.2.3.1.1	Expression	42
3.2.3.1.2	Zellyse und Reinigung der <i>Inclusion Bodies</i>	42
3.2.3.2	Reinigung von Phytochrom	43
3.2.3.2.1	Zellyse	43
3.2.3.2.2	Rekonstitution Apophytochrom und Chromophor	43
3.2.3.2.3	Affinitätschromatographie	43
3.2.3.2.4	Ionenaustauschchromatographie	44
3.2.4	Charakterisierung/Reinheit von Proteinen	44
3.2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	44
3.2.4.2	Gelelektrophorese	45
3.2.4.2.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
3.2.4.2.2	Natives Gel	46
3.2.4.2.3	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	46
3.2.4.2.4	Titrationsskurve	47
3.2.4.2.5	Entwicklung von PHAST-gelen	47
3.2.4.3	Größenbestimmung von Proteinen	49
3.2.4.3.1	Massenspektren	49
3.2.4.3.2	Gelfiltration	50

3.2.4.3.3	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	50
3.2.4.4	Bestimmung von Proteinaktivitäten	51
3.2.4.4.1	Bestimmung der Enzymaktivität von D-HicDH und deren Mutanten	51
3.2.4.4.2	Bestimmung kinetischer Parameter	52
3.2.4.4.3	Differenzspektren von Phytochrom	53
3.2.4.5	Schmelzpunktbestimmung	54
3.2.4.5.1	<i>Differential Scanning Microcalorimetry</i> (DSC)	54
3.2.4.5.2	Schmelzpunktbestimmung mit Circular-Dichroismus (CD)	55
3.2.4.6	Sekundärstrukturanalyse	56
3.2.4.6.1	Sekundärstrukturvorhersage	56
3.2.4.6.2	Circular-Dichroismus (CD)	56
3.2.4.6.2.1	UV-Bereich	57
3.2.4.6.2.2	VIS-Bereich	57
3.2.5	Röntgenstrukturanalyse von Proteinen	58
3.2.5.1	Kristallisation von Proteinen	58
3.2.5.2	Montieren von Kristallen für Tieftemperaturmessungen	60
3.2.5.3	Röntgendiffraktionsmessung	60
3.2.5.4	Auswertung von Beugungsdaten	61
3.2.5.5	Verfeinerung der Struktur	62
4	Ergebnisse	65
4.1	D-HicDH und ihre Mutanten	65
4.1.1	Sequenzierung des Plasmids	65
4.1.2	Auswahl von Punktmutanten	66
4.1.2.1	Punktmutationen im aktiven Zentrum	66
4.1.2.2	Auswahl der Thermostabilitätsmutanten	67
4.1.2.3	Basenaustausche der Punktmutanten	69
4.1.3	Aufreinigung der D-HicDH	70
4.1.4	Charakterisierung der D-HicDH Wildtyp und ihrer Mutanten	74
4.1.4.1	Gelelektrophorese	74
4.1.4.2	Massenspektrometrie	76
4.1.4.3	Gelfiltration	77
4.1.4.4	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	77

4.1.4.5	Schmelzpunktbestimmung, Thermostabilität und Sekundärstrukturanalyse	78
4.1.4.5.1	<i>Differential Scanning Microcalorimetry</i> (DSC)	78
4.1.4.5.2	Circular-Dichroismus (CD)	81
4.1.4.5.3	Abhängigkeit der Sekundärstrukturzusammensetzung von der Temperatur	82
4.1.4.6	Aktivitätsbestimmung	85
4.1.5	Kristallisation	96
4.1.6	Röntgendiffraktionsmessung	97
4.1.7	Strukturvergleiche	102
4.1.7.1	Die Strukturen der D-HicDH	102
4.1.7.1.1	Vergleich der Gesamtstrukturen	102
4.1.7.1.2	Öffnungswinkel zwischen den Domänen	104
4.1.7.1.3	Das aktive Zentrum	105
4.1.7.2	Die Strukturen der D-Hydroxycarboxylat-Dehydrogenase Familie	110
4.2	Phytochrom	113
4.2.1	Aufreinigung	113
4.2.2	Charakterisierung von Phytochrom	116
4.2.2.1	Absorptionsspektren	116
4.2.2.2	Gelelektrophorese	116
4.2.2.3	Massenspektrometrie	120
4.2.2.4	Gelfiltration	123
4.2.2.5	Dynamische Lichtstreuung (DLS)	124
4.2.3	Sekundärstrukturanalyse	125
4.2.3.1	Sekundärstrukturvorhersage	125
4.2.3.2	CD	127
4.2.3.2.1	UV-Bereich	127
4.2.3.2.2	VIS-Bereich	130
4.2.4	Schmelzpunktbestimmung mit CD	130
4.2.5	Kristallisation von Phytochrom	133

5	Diskussion	137
5.1	D-HicDH	137
5.1.1	Proteinaufreinigung	137
5.1.2	Änderungen der Substratspezifität	137
5.1.3	Schmelzvorgang und Entfaltung der D-HicDH	141
5.1.4	Thermostabilität der D-HicDH-Mutanten	143
5.1.5	Die Struktur der D-HicDH	146
5.1.5.1	Das aktive Zentrum	147
5.1.5.2	Domänenbewegung	152
5.2	Phytochrom	153
5.2.1	Aufreinigung	153
5.2.2	Charakterisierung	153
5.2.3	Die Sekundärstruktur	154
5.2.4	Kristallisation	155
5.3	Ausblick	156
6	Literaturverzeichnis	159
	Anhang	173
	Tabellenverzeichnis	173
	Abbildungsverzeichnis	176
	Basensequenz Plasmids pHL4	182
	Strukturvergleiche der D-HDH-Familie mit STAMP	186
	Sekundärstrukturanalyse von Phytochrom A (phy) aus Hafer	188
	Kurzzusammenfassung	193
	Abstract	194
	Lebenslauf	195

Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren

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

Nukleinbasen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

PDB-Kürzel (Berman *et al.*, 2000)

1dlb	D-Lactat-Dehydrogenase aus <i>Lactobacillus bulgaricus</i> (Modell, Yinals <i>et al.</i> , 1993)
2dlb	D-Lactat-Dehydrogenase aus <i>Lactobacillus helveticus</i> (PDB, 1995)
1dxy	D-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase aus <i>Lactobacillus casei</i> (Dengler <i>et al.</i> , 1997)
1gdh	D-Glycerat-Dehydrogenase aus <i>Hyphomicrobium methylovum</i> (Goldberg <i>et al.</i> , 1994)
1hyh	L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase aus <i>weissella confusa</i> (früher: <i>Lactobacillus confusus</i>)
2nac	Format-Dehydrogenase aus <i>Pseudomonas</i> sp. 101 (Apoprotein, Lamzin <i>et al.</i> , 1994)
2nad	Format-Dehydrogenase aus <i>Pseudomonas</i> sp. 101 (Holoprotein, Lamzin <i>et al.</i> , 1994)
1psd	D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase aus <i>E. coli</i> (Schuller <i>et al.</i> , 1995)
1PY	Phenylpyruvat
COI	2-Ketocaproat
GOL	Glycerol
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
OIC	2-Oxoisocaproat (2-Ketoisocaproat)
SO4	Sulfat

Allgemeine Abkürzungen

Å	Ångström (1 Å = 100 pm)
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
Amp	Ampicillin
ASE	asymmetrische Einheit der Elementarzelle eines Kristalls
AU	<i>Absorption units</i> (Absorptionseinheiten)
B	Temperaturfaktor
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BSE	<i>bovine spongiform encephalopathia</i>
CCP4	<i>Collaborative Computing Project Number 4</i>
CD	Circular-Dichroismus
CNS	<i>Crystallography and NMR Systems</i>
Da	Dalton (1 Da = 1 g/mol)
<i>dhd</i>	Gen der D-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase
DLS	<i>Dynamic light scattering</i> (Dynamische Lichtstreuung)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat (Adenin, Cytidin, Guanosin, Thymidin)
DSC	<i>Differential Scanning Microcalorimetry</i>
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ε	molarer Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-di-Natriumsalz
ESI	<i>Electron Spray Ionisation</i>
FDH	Format-Dehydrogenase
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung (9.81 m/s ²)
GDH	D-Glycerat-Dehydrogenase
h	Stunde
ΔH	Reaktionsenthalpie
HDH	2-Hydroxycarboxylat-Dehydrogenase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure

HicDH	2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEX	<i>Ion exchange chromatography</i> (Ionenaustauschchromatographie)
k_{cat}	katalytische Konstante (<i>Turnover number</i>)
K_{M}	Michaelis-Menten-Konstante
kb	Kilobasenpaare
λ	Wellenlänge
LB	Luria-Bertani (Medium)
<i>L. casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
LDH	Lactat-Dehydrogenase
M	Molar (mol/l)
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption and ionisation</i>
min	Minute
mol	Teilchenzahl ($6.023 \cdot 10^{23}$ Teilchen pro Mol)
MR	<i>Molecular Replacement</i> (molekularer Ersatz)
M_w	Molekulargewicht
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
NAD^+	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
NEB	<i>New England Biolabs</i> (Firma)
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonanz</i>
Nup	Nukleotidposition
OD_x	optische Dichte, Extinktion bei der Wellenlänge x Nanometer
OGP	Oktyl- β -D-glukopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCB	Phycocyanobilin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
P Φ B	Phytochromobilin
PEG	Polyethylenglycol
PGDH	D-3-Phosphoglycerat Dehydrogenase
Ph	Phenyl-
phy	Phytochrom
Pipes	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
$\text{p}_{\text{R}}\text{p}_{\text{L}}$	Promotor

P_r	Phytochrom: <i>red-light-absorbing form</i>
P_{fr}	Phytochrom: <i>far-red-light-absorbing form</i>
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
R	Substratrest
R_{frei}	freier R-Wert
R_H	hydrodynamischer Radius
R_{sym}	linearer R-Wert
R_{work}	R-Wert des Arbeitsdatensatzes
RMS	Standardabweichung (<i>root mean square</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Θ	Elliptizität
$[\Theta]$	spezifische Elliptizität [$\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}_{aa}^{-1}$]
TAE	Tris/Acetat, EDTA
TE	Tris/HCl, EDTA
T_M	Schmelztemperatur
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TSR	<i>Template Suppression Reagent</i>
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
VIS	sichtbar (visible)
V_M	Matthews-Koeffizient
v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
wt	Wildtyp

1 Zusammenfassung

Zur Untersuchung der Substratspezifität und zur Erhöhung der Thermostabilität von **D-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase** (D-HicDH) aus *Lactobacillus casei* wurden anhand ihrer Struktur 14 Aminosäureaustausche geplant, hergestellt und analysiert. Die Vorhersage thermostabilerer D-HicDH-Mutanten erfolgte mit Hilfe des von Leven (1999) erstellten Thermostabilitätsprogramms. Die vom Programm vorgeschlagenen Austausche wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf die Proteinstruktur bewertet und danach selektiert.

Die hergestellten Mutanten ließen sich analog zum Wildtyp exprimieren und aufreinigen. Lediglich die Mutanten E12I und G78A wurden nur sehr schwach exprimiert. Die Mutanten D112I, D202F und D202I lagen nach der Renaturierung in verschiedenen Isoformen mit unterschiedlichen Eigenschaften vor.

Die Mutante L51F zeigte eine signifikante Änderung der Substratspezifität zu kleineren Substraten. Der Austausch einer kleinen Aminosäure am Eingang zum aktiven Spalt gegen eine sperrige Aminosäure (G136W) stellte keine Barriere für große Substrate dar. Durch Austausch von Tyr298 gegen Alanin bzw. Arginin wurde die Reaktivität um das 50-500fache herabgesetzt. Der Austausch von Met307 in der hydrophoben Bindungstasche gegen Valin oder Glutamin führte zu einer Abnahme des Reaktionsumsatzes um das 5-100fache. Gly78 und Tyr100 stellen notwendige Bindungsstellen für Substrate dar. Die katalytische Aktivität sank nach kleinen Aminosäureänderungen bereits um das 20fache. Für den katalytischen Mechanismus ist das Schließen des Interdomänenpaltes nicht nötig.

Für die D-HicDH wurden in dieser Arbeit zwei Schmelzpunkte bestimmt. Beim ersten Schmelzpunkt (T_{m1} : 56°C) ging ein Teil der α -Helixstruktur irreversibel verloren. Das Enzym war bei diesen Temperaturen nicht mehr aktiv (Hummel *et al.*, 1985). Weitere Sekundärstrukturelemente lösten sich erst beim zweiten Schmelzpunkt (T_{m2} : 98°C). Von den vorhergesagten potentiellen thermostabileren Mutanten zeigte eine Mutante (D112I) eine Thermostabilisierung von 1.5°C beim ersten Schmelzpunkt und war ähnlich aktiv wie der Wildtyp. Bei zwei weiteren Mutanten (D202I und D202F) wurde der zweite Schmelzpunkt um 20°C erhöht, der erste jedoch um 10°C erniedrigt. Die drei Austausche (D112I, D202I, D202F) wurden mit der Methode der Aminosäure-Atom-Potentiale vorhergesagt. Die Mutanten L51F und T113M verhielten sich thermisch wie der Wildtyp. Die Sekundärstruktur der Mutante S293H wurde stark destabilisiert.

Zwei D-HicDH-Wildtyp Kristallformen wurden röntgendiffraktometrisch unter Cryobedingungen (100 K) untersucht. Ein Kristall gehörte zur kubischen Raumgruppe $P4_332$ mit den Zellkonstanten $a = b = c = 149.33 \text{ \AA}$ und beugte bis 2.0 \AA Auflösung (R: 21.7 %, R_{frei} : 24.3 %). Die Struktur enthielt im aktives Zentrum das Substrat Phenylpyruvat und den Cofaktor NAD^+ . Der zweite Kristall war ein perfekter Zwillings in der hexagonalen Raumgruppe $P6_3$ mit den Zellparametern $a = b = 131.33 \text{ \AA}$ und $c = 125.55 \text{ \AA}$ bei einer Auflösung von 1.87 \AA (R: 20.4 %, R_{frei} : 25.5 %). Sein aktives Zentrum enthielt einerseits NAD^+ , andererseits 2-Ketocaproat oder Sulfat, wobei das Besetzungsverhältnis 0.75 : 0.25 vorlag. Ein Vergleich aller vier bekannten Monomerstrukturen der D-HicDH zeigte, dass alle Strukturen sehr ähnlich sind. Die größten Abweichungen wiesen die $P6_3$ -Zwillings-Monomere auf, während die kubische und die bekannte hexagonale Struktur der b-Untereinheit der Zwillingsstruktur ähnlicher waren. Lediglich die Ausrichtung einiger Aminosäurereste im aktiven Zentrum variierte. Die Aminosäurereste Tyr100 und Arg234 konnten beide als unterschiedlich starke Bindungspartner der Substratcarboxylgruppe bzw. -carbonylgruppe identifiziert werden. Der Vergleich mit ähnlichen Enzymen zeigte, dass sich die Untereinheiten dieser Enzyme stärker voneinander unterscheiden (Ausnahme: FDH) als alle D-HicDH-Strukturen untereinander.

Zwei N-terminale **Phytochrom A**-Fragmente aus Hafer, 65 kDa und 59 kDa (ohne die N-terminalen 6 kDa), wurden aufgereinigt, ihre Eigenschaften in Lösung bestimmt und zur Kristallisation eingesetzt.

Bei der Aufreinigung der beiden Phytochrome wurde ein zusätzlicher Aufreinigungsschritt durch Anionenaustauschchromatographie eingeführt. Nicht rekonstituiertes Apoprotein konnte dadurch abgetrennt werden, wodurch sich das A_{654}/A_{280} -Verhältnis bei beiden Phytochromfragmenten von 1.2 auf einen bislang unerreichten Wert von 1.6 steigern ließ. Somit konnte erstmals auch das kürzere Phytochromfragment als voll funktionsfähig identifiziert werden. Offensichtlich werden die N-terminalen 6 kDa für diese spektroskopische Eigenschaft nicht benötigt. In Lösung lagen beide Proteine als Dimere vor. Beim Aufkonzentrieren aggregierte das 65 kDa Phytochromfragment. Die isoelektrische Fokussierung zeigte, dass möglicherweise noch weitere Proteinisoformen bei beiden Phytochromfragmenten vorhanden sind, die jedoch chromatographisch nicht komplett getrennt werden konnten.

Sekundärstrukturanalysen mit Circular-Dichroismus und Sekundärstrukturvorhersagen, die mit verschiedenen Programmen durchgeführt wurden, ergaben ähnliche Sekundärstrukturanteile in beiden Phytochromfragmenten von ca. 40 % α -Helix und 10 % β -Faltblatt. Das N-terminale 6 kDa Phytochromfragment besteht somit nicht ausschließlich aus α -Helices und die

Phytochromstruktur enthält β -Faltblattanteile.

In einem Zeitraum von mehreren Wochen bis zwei Jahren wurden bei drei Kristallisationsbedingungen Mikrokristalle erhalten.

2 Einleitung

2.1 Die Faltung von Proteinen

Proteine bestehen aus einer heteropolymeren Polypeptidkette mit vielen verschiedenen polaren und dissoziierbaren Seitenketten. Sie kontrollieren die meisten Funktionen in lebenden Organismen. Ihre Aktivität hängt jedoch nicht nur von ihrer Aminosäuresequenz ab, sondern auch von ihrer dreidimensionalen Struktur und Dynamik (Creighton, 1993; Frauenfelder *et al.*, 1988). Durch Einführung einer Punktmutation kann nicht nur die Funktion, sondern auch die Faltung und damit die Stabilität eines Proteins stark beeinflusst werden.

Nach seiner Synthese an den Ribosomen liegt das Protein in einem ungefalteten Zustand vor. Dieser zeichnet sich durch eine statistische Verteilung von vielen schnell ineinander umwandelbaren Formen aus, die alle verschiedene lokale Eigenschaften besitzen (Dinner *et al.*, 2000). Um seine Funktion ausüben zu können, muß es sich jedoch erst in seine native Struktur falten. Während des Faltungsprozesses wird die Polypeptidkette sehr kompakt und jede Aminosäure nimmt ihre native Geometrie an.

Im Zuge seiner Faltung durchläuft das Protein Konformationen zunehmender Stabilität und die freie Energie nimmt dabei stark ab. Viele schwache Bindungen werden gespalten und neu gebildet. Wasserstoffbrückenbindungen sowohl zwischen dem Protein und dem Lösungsmittel als auch im Lösungsmittel selbst spielen bei dem Prozeß eine wichtige Rolle. Auch die Entropie ist ein wichtiger Faktor. Lösungsmittelmoleküle, die das denaturierte Protein solvatisieren, werden bei der Faltung durch die Zusammenlagerung unpolarer Aminosäuren im hydrophoben Proteininneren frei (Kauzmann, 1959; Dill, 1990). Der hydrophobe Effekt ist sehr wichtig für den Kontakt innerhalb der Untereinheiten, zwischen den Untereinheiten scheint er aber nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Es bildet sich schließlich ein relativ rigider Proteinkern mit einer dichten Packung an Seitenketten und einem dichten Wasserstoffbrückennetzwerk.

Die Faltung erfolgt in weniger als einer Sekunde, meist sogar in einer Millisekunde, manchmal auch in noch kürzerer Zeit. In der Zelle gibt es dafür viele Faltungshelfermoleküle (Ellis und Hartl, 1999). Aber auch ohne diese Zusatzstoffe falten sich viele Proteine *in vitro* korrekt aus ihren denaturierten Strukturen. Somit müßte der "Faltungs-Code" in der Proteinsequenz enthalten sein. Jedoch ist es auch heute noch nicht möglich, die Sekundär- und Tertiärstruktur eines Proteins aus seiner Aminosäure-Sequenz vorherzusagen, wenn es weniger als 35 % Sequenzidentität zu Proteinen mit bekannter Struktur hat. Untersuchungen beschäftigen sich

nun mit dem Faltungsmechanismus, durch den die native Struktur eingenommen wird, und dem Beitrag der Sequenz zu dieser Struktur. Dabei versucht man, faltungsbestimmende Schritte zu bestimmen und untersucht die Struktur der Faltungsintermediate. Im Labor kann man die Faltung mit Hilfe der Fluoreszenz-, NMR-Spektroskopie, des Circular-Dichroismus und Aktivitätstests verfolgen.

Für kleine Proteine wurden verschiedene Modelle zur Proteinfaltung vorgeschlagen (Nölting und Andert, 2000). Dabei spielen u.a. die Vorstellungen von einem diffusen Faltungskern als Katalysator für die weitere Faltung (Kern-Wachstums-Mechanismus; Wetlaufer, 1973), einem Faltungsbeginn mit der Bildung von Sekundärstrukturelementen gefolgt von der Zusammenlagerung zur Tertiärstruktur (*framework* Modell; Udgaonkar und Baldwin, 1988; Kim und Baldwin, 1990) und die Kontraktion des Proteins initiiert durch den hydrophoben Effekt mit folgender Sekundärstrukturelementbildung (hydrophober *Collapse*; Dill, 1985; Dill, 1990) eine wichtige Rolle. Auch Kombinationen dieser Modelle sind möglich, z. B. der Kern-Kondensations-Mechanismus (Fersht, 1995, 1999). Große Proteine mit mehreren Domänen und Untereinheiten haben möglicherweise mehrere Faltungskerne.

Die Proteinfaltung ist von wachsendem theoretischen und experimentellem Interesse. Für die chemische Synthese könnten sich neue Wege öffnen für enzymatische Aktivitäten in organisch/wässrigen Lösungsmitteln (Klibanov, 1989, 1997; Griebenow und Klibanov, 1997; Kunugi *et al.*, 1997). Falsch gefaltete Proteine und unlösliche Proteinaggregate (Amyloide) führen zu einer Reihe von Krankheiten, z. B. Alzheimer, Huntington und Prionen-Krankheiten wie der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit und BSE (*bovine spongiform encephalopathy*) (Bychkova und Ptitsyn, 1995; Eigen, 1996; Booth *et al.*, 1997; Masters und Beyreuther, 1997; Carrell und Gooptu, 1998; Radford und Dobson, 1999). Prionen gelten bei Letzteren als Auslöser. Sie kommen im gesunden Hirngewebe mit einer überwiegend α -helikalen Konformation vor. Im kranken Hirngewebe liegt das gleiche Protein in einer Mischung aus α -Helix- und β -Faltblatt-Struktur vor und bildet dann unlösliche faserige Aggregate, die die Hirnzellen schädigen. Die falsch gefalteten Prionen sind sehr infektiöse Proteine, da sie die Umfaltung gesunder Prion-Proteine katalysieren (Prusiner, 1998). Darüber hinaus sind sie äußerst resistent gegenüber Nukleasen, Temperatur, UV- und Röntgenstrahlung sowie chemischen Einflüssen (Pschyrembel, 1994).

2.2 Thermostabilität von Proteinen

Unter der Stabilität eines Proteins versteht man die physikalischen Bedingungen, unter denen das Protein seine Struktur aufrecht erhalten kann. Hierzu gehören Einflüsse wie der pH-Wert, die Umgebungstemperatur, die Gegenwart und Konzentration denaturierender, oxidierender oder reduzierender Reagenzien oder seine Konzentration in Lösung. Das größte Interesse gilt hierbei neben der Stabilität bei extremen pH-Werten und Salzgehalten der Stabilität bei erhöhten Umgebungstemperaturen. Extreme Bedingungen in der Biosphäre bedingen die Anpassung der Aminosäuresequenz des Proteins durch Mutation, die Optimierung von schwachen Wechselwirkungen im Protein und an der Grenzfläche Protein-Lösungsmittel, oder den Einfluß äußerer Faktoren, wie Metaboliten oder Cofaktoren (Ladenstein und Antranikian, 1998).

Die Erhöhung der thermischen Stabilität von Proteinen ist von wirtschaftlichem Interesse für Technologien, die Biokatalysatoren bei extremen Bedingungen einsetzen, um höhere Löslichkeiten von Substraten zu erreichen oder Kosten durch einen verringerten Enzymverbrauch zu reduzieren. Daher ist es wichtig, die Faktoren, welche die thermische Stabilität bedingen, zu erforschen. Zur Untersuchung dieser Faktoren werden sowohl experimentelle (Mutationsstudien) als auch theoretische Methoden angewendet. Versucht wird auch, die thermophilen Eigenschaften auf mesophile Enzyme zu übertragen, um so z. B. Hochtemperatur-Biokatalysatoren zu entwickeln (Adams und Kelly, 1998).

Der Vergleich von Sequenz, Struktur und Stabilität homologer Proteine aus mesophilen (optimale Wachstumstemperatur: 10-45°C), thermophilen (60-80°C) und hyperthermophilen Organismen (85-110°C) hat gezeigt, dass verschiedene Faktoren die Proteinstabilität beeinflussen (Russell und Taylor, 1995; Querol *et al.*, 1996; Jaenicke und Bohm, 1998; Ladenstein und Antranikian, 1998). Trotz der stark erhöhten optimalen Reaktionstemperatur thermophiler Proteine sind sie in Sequenz(-alignments), Aminosäurezusammensetzung, (Kristall-)Struktur, Funktion und chemischen Eigenschaften vergleichbar mit ihren mesophilen Homologen. Für die Anpassung an hohe Temperaturen scheinen verschiedene kleinere Wechselwirkungen und zahlreiche untergeordnete Sequenzunterschiede verantwortlich zu sein, die meist charakteristisch für jede Proteinart sind (Vielle *et al.*, 1996; Ladenstein und Antranikian, 1998; Adams und Kelly, 1998) oder sogar organismenspezifisch (Adams und Kelly, 1998) sein können.

Proteine aus thermophilen Organismen enthalten eine höhere Anzahl geladener Aminosäuren (Arg, Glu, Lys) und weniger polarer Aminosäuren (Ser, Asn, Gln). In Helices thermophiler Proteine treten vermehrt die Aminosäuren Tyr, Gly und Gln auf, während Val seltener vorkommt (Warren und Petsko, 1995). Querol *et al.* (1996) halten eine steigende Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen, verbunden mit der Zunahme interner hydrophober Packungen, für den wichtigsten Faktor bei der Thermostabilisierung von Proteinen. In hyperthermophilen Proteinen wurde zudem eine Zunahme elektrostatischer Wechselwirkungen gefunden (Delboni *et al.*, 1995). Diese elektrostatischen Wechselwirkungen geladener Aminosäuregruppen an der Proteinoberfläche sieht Pace (2000) für die Thermostabilität verantwortlich an. Die Analyse von Oberfläche und Volumen weisen darauf hin, dass Proteine mesophilen und thermophilen Ursprungs nicht anhand der Packungsdichte unterschieden werden können (Karshikoff und Ladenstein, 1998). Dagegen fanden Russel *et al.* (1994), dass die Struktur thermophiler Proteine kompakter ist, da sie weniger und kleinere Hohlräume als ihre mesophilen Homologen besitzen. So können sie geringere thermische Bewegungen ausführen.

Die Flexibilität der Proteinstruktur ist eine fundamentale Eigenschaft der Proteinfunktion und kann von kleinen Streckungen einiger Aminosäuren bis zur Translokation großer Kettensegmente oder Änderungen in der relativen Orientierung zwischen den Domänen variieren. Für die Katalyse (Bindung von Substraten) benötigt das Enzym eine gewisse molekulare Flexibilität. Alle Enzyme müssen sowohl diese notwendige Flexibilität als auch die benötigte Proteinestabilität abwägen. So sind thermophile Proteine wesentlich weniger flexibel als mesophile Proteine bei ihrer jeweiligen optimalen Temperatur, und die katalytische Aktivität ist so reduziert. Bei ihrer physiologischen Temperatur ist diese Rigidität durch thermische Bewegung aufgehoben. Die erhaltene Flexibilität ist essentiell für die Funktion. Die Adaptation von Proteinen an extreme Temperaturen scheint somit das Ergebnis eines Kompromisses zwischen steigender Rigidität (verantwortlich für steigende thermische Stabilität) und Flexibilität (notwendig für physiologische Reaktion) zu sein.

Neuere Arbeiten zeigen, dass bessere Wasserstoffbrücken-Netzwerke, elektrostatische Wechselwirkungen und günstigere interne Packungen zur Stabilität von thermophilen Proteinen beitragen (Russell und Taylor, 1995; Querol *et al.*, 1996; Jaenicke und Bohm, 1998; Ladenstein und Antranikian, 1998).

2.3 Die D-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase (D-HicDH)

Die D-HicDH ist ein homodimeres Enzym mit 333 Aminosäuren pro Untereinheit und einem Molekulargewicht von 2 x 37 kDa. Es katalysiert die NADH-abhängige, reversible, stereospezifische Umsetzung zwischen 2-Ketocarbonsäuren und D-2-Hydroxycarbonsäuren.

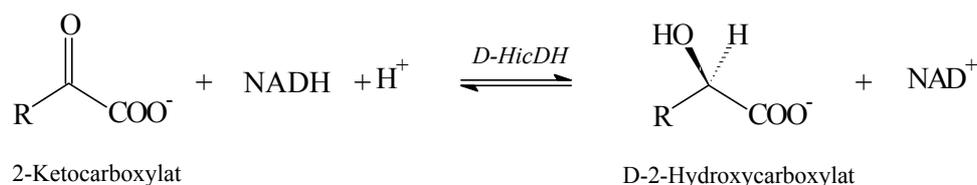


Abb. 1: Die von der D-HicDH katalysierte NADH abhängige, reversible, stereospezifische Umsetzung zwischen 2-Ketocarbonsäuren und D-2-Hydroxycarbonsäuren.

Im Gegensatz zu den, vom Reaktionstyp her vergleichbaren, Lactat- und Malat-Dehydrogenasen zeigt die D-HicDH nur eine geringe Spezifität bezüglich der Substituenten an der 2-Keto- bzw. 2-Hydroxylgruppe. So setzt sie Substrate mit C₄-verzweigten und unverzweigten aliphatischen, aromatischen und heteroaromatischen Resten (R) um, wobei Substrate mit hydrophoben Seitenketten besser umgesetzt werden als solche mit geladenen Seitenketten oder Verzweigungen in C₃-Position (Kallwaß, 1992, 1989).

Die D-HicDH ist bis 45°C und in einem pH-Bereich von 3.3-9.7 stabil. Die höchste enzymatische Aktivität wurde bei 50°C gemessen. Das pH-Optimum für die Reduktion von 2-Ketoisocaproat liegt zwischen 5.5 und 7.0 und für die Oxidation von 2-Hydroxyisocaproat zwischen 8.0 und 9.0. Es findet keine Reaktion mit NADPH statt (Hummel *et al.*, 1985). Das Enzym toleriert die Anwesenheit organischer Lösungsmittel wie Methanol, DMSO, Dioxan, n-Propanol und Isopropanol zu 10-30 % in Wasser (Kallwaß, 1989).

Die D-HicDH wurde bei der Suche nach natürlich vorkommenden D- und L-isomerspezifischen 2-Hydroxycarboxylat-Dehydrogenasen (2-HDH) mit breitem Substratspektrum zur Anwendung als Katalysatoren in biotechnologischen Prozessen oder zum Einsatz in präparativen organischen Synthesen gefunden. Im Stamm *Lactobacillus casei* ssp *pseudoplantarum* (DSM 20008) wurde das D-Isomer mit der breitesten Substratspezifität entdeckt. So wurde das Enzym aus diesem mesophilen Stamm zur Produktion und weiteren Charakterisierung ausgewählt. Da in ersten kinetischen Untersuchungen der niedrigste K_M-Wert für das Substrat 2-Ketoisocaproat gefunden worden war, wurde das Enzym danach benannt (Schütte *et al.*, 1984; Hummel *et al.*, 1985). Nach proteinchemischer Charakterisierung (Kallwaß, 1988) wurde sein

Gen kloniert, sequenziert und in *E. coli* exprimiert (Lerch, 1989; Lerch *et al.*, 1989). Bei der Genexpression in *E. coli* fallen bis zu 60 % des gesamten Zellproteins als D-HicDH an, größtenteils jedoch in Form unlöslicher *Inclusion Bodies* (Lerch, 1989).

Die Funktion der D-HicDH im Bakterium *Lactobacillus casei* (*L. casei*) ist bislang unbekannt. Möglicherweise spielt sie eine Rolle im Aminosäure-Katabolismus (Hummel *et al.*, 1985; Kallwaß, 1989).

Nach Sequenzvergleichen gehört die D-HicDH, wie auch die D-Lactat-Dehydrogenase (D-LDH), zur Familie der D-spezifischen NAD⁺-abhängigen 2-Hydroxycarboxylat-Dehydrogenasen. Im Gegensatz dazu gehört die L-HicDH zur Familie der tetrameren L-Lactat-Dehydrogenasen. Nur die Region des NAD⁺-Bindungsmotivs zeigt eine signifikante Homologie im Sequenzvergleich.

Die Kristallstruktur der D-HicDH wurde durch molekularen isomorphen Ersatz gelöst (Dengler *et al.*, 1997). Als Strukturvorlage diente die D-Glycerat-Dehydrogenase aus *Hyphomicrobium methylovum* (D-GDH; Goldberg *et al.*, 1994). Weitere ähnliche bisher bekannte 3D-Strukturen der D-HicDH sind die der D-LDH aus *Lactobacillus bulgaricus* (Modell; PDB-code 1DLN; Vinals *et al.*, 1995), der D-LDH aus *Lactobacillus helveticus* (PDB-code 2DLN, 1995), der D-LDH aus *Lactobacillus pentosus* (Stoll *et al.*, 1996), der D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase aus *Escherichia coli* (*E. coli*) (D-PGDH; Schuller *et al.*, 1995) und der Formiat-Dehydrogenase aus *Pseudomonas* sp. 101 (FDH; Lamzin *et al.*, 1992; 1994).

In Tabelle 1 sind alle bislang gelösten, ähnlichen Strukturen der D-HicDH mit ihren kristallographischen Kenngrößen aufgeführt. Alle Kristalle wurden bei Raumtemperatur vermessen. Die Abbildungen 2 und 3 zeigen die Struktur der dimeren D-HicDH und der monomeren Untereinheit. Abbildung 4 gibt einen Einblick in das aktive Zentrum.

Tabelle 1: Auswertungsstatistiken der NAD-abhängigen D-2-Hydroxycarboxylat-Dehydrogenase (2-HDH) Kristallstrukturen. OIC: 2-Ketoisocaproat, SO₄: Sulfat, ASE: asymmetrische Einheit.

	FDH Apoprotein	FDH Holoprotein	D-GDH	D-PGDH	D-LDH <i>L. helveticus</i>	D-LDH <i>L. pentosus</i>	D-HicDH
PDB-code	2NAC	2NAD	1GDH	1PSD	2DLD	-	1DXY
M _{monomer} [kDa]	43.1	43.1	38	44	37.6	37.2	36.9
Aminosäuren	2 x 393	2 x 393	2 x 321	4 x 409	2 x 337	2 x 332	2 x 333
Sequenzidentität zur D-HicDH (BLAST)	24 %	24 %	26 %	30 %	40 %	43 %	100 %
gebundene Substrate	-	NaN ₃ NAD ⁺	-	Serin NAD ⁺	Oxamat NADH	-	OIC/SO ₄ NAD ⁺
Raumgruppe	P2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P1	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁	P1	P6 ₃ 22
Gitterkonstanten	a = 110.5 Å b = 54.7 Å c = 70.3 Å α = 90° β = 101.9° γ = 90°	a = 116.0 Å b = 113.3 Å c = 63.4 Å α = 90° β = 90° γ = 90°	a = 60.4 Å b = 60.5 Å c = 66.3 Å α = 102.3° β = 113.7° γ = 102.7°	a = 136.1 Å b = 146.3 Å c = 53.3 Å α = 90° β = 90° γ = 90°	a = 86.2 Å b = 62.1 Å c = 77.4 Å α = 90° β = 113.2° γ = 90°	a = 54.5 Å b = 58.2 Å c = 61.2 Å α = 74.4° β = 83.9° γ = 82.9°	a,b = 134.1 Å c = 125.1 Å α,β = 90° γ = 120°
Monomere in ASE	2	2	2	2	2	2	1
Lösungsmittel- gehalt	49 %	49 %	54 %	59 %	48 %	50 %	72 %
Auflösung	1.8 Å	2.05 Å	2.4 Å	2.75 Å	2.7 Å	2.8 Å	1.9 Å
R _{work}	14.8 %	11.7 %	19.4 %	19.1 %	19.5 %	19.0 %	19.4 %
R _{frei}	-	-	-	-	29.7 %	27.3 %	21.7 %

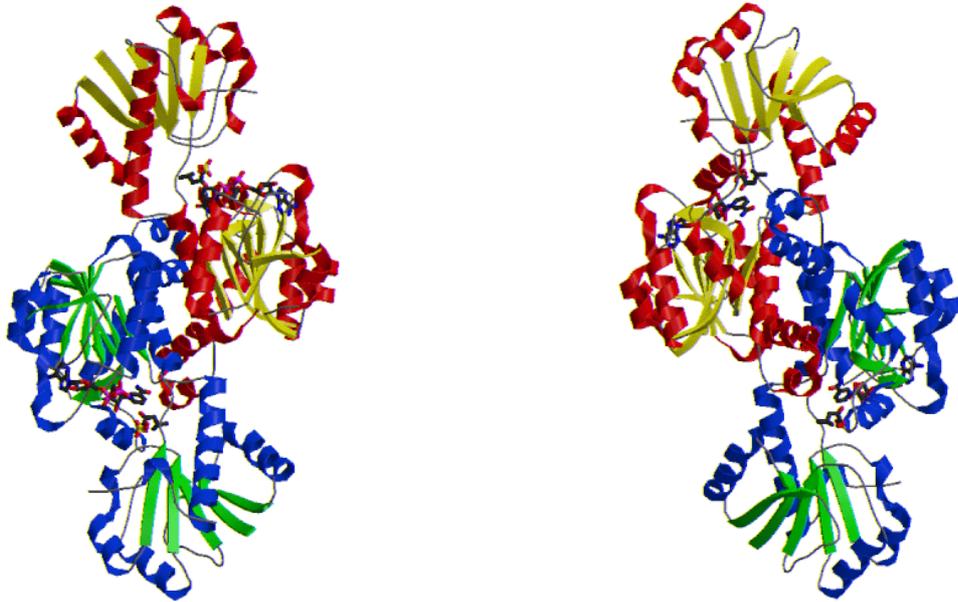


Abb. 2: Zwei verschiedene Perspektiven der dimeren D-HicDH-Struktur (1DXY) mit einheitlicher Färbung der Sekundärstrukturelemente innerhalb einer Untereinheit.

.bA

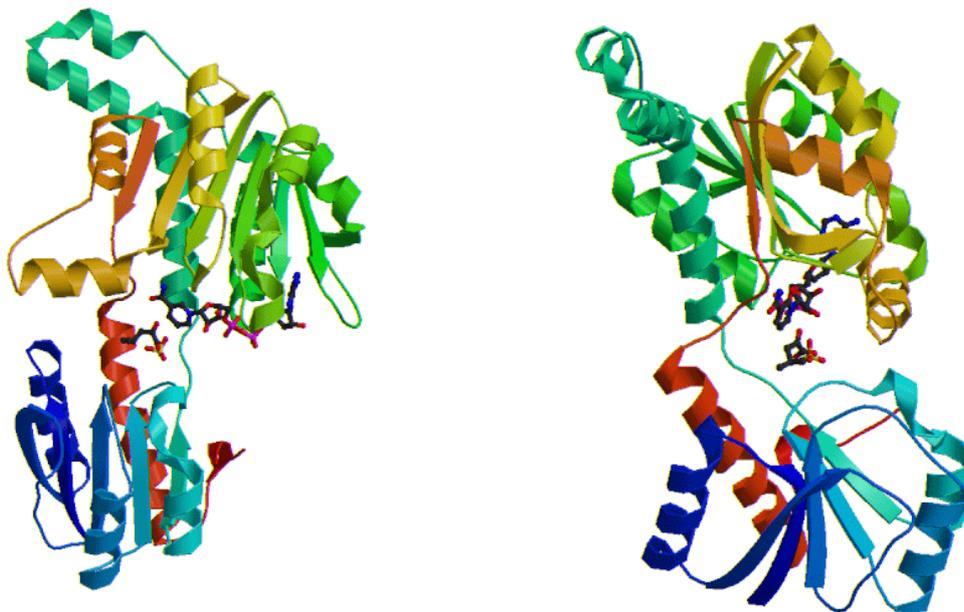


Abb. 3: Eine Untereinheit der D-HicDH mit den Substraten 2-Ketoisocaproat (grau), Sulfat (gelb) und NAD (grau). Heteroatome sind farbig gezeichnet. Die Peptidkette am N-Terminus ist dunkelblau gefärbt und durchläuft verschiedene Farbabstufungen bis zum roten C-Terminus.

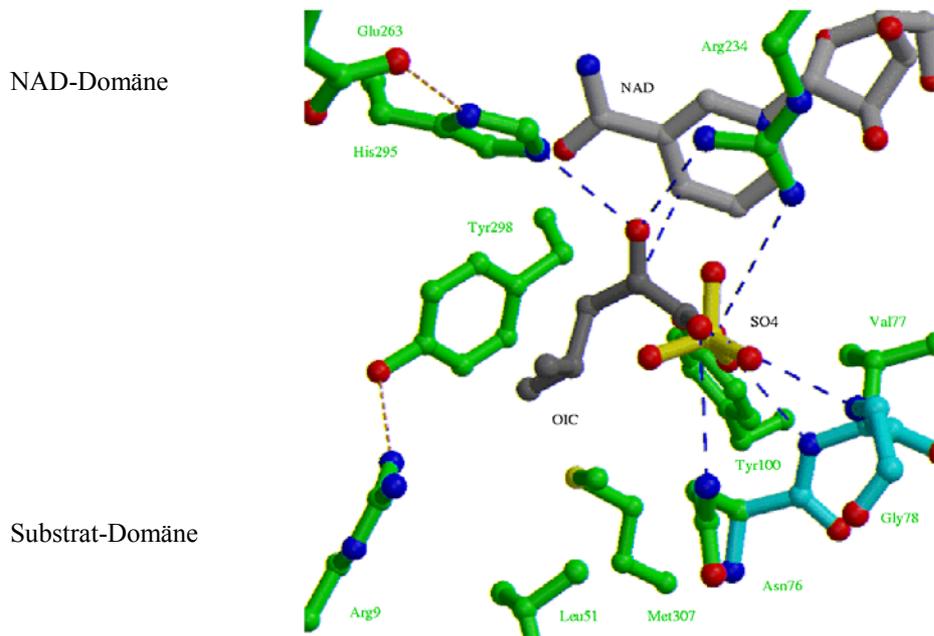


Abb. 4a: Das aktive Zentrum der D-HicDH. In der oberen Bildhälfte befindet sich die NAD-Domäne und in der unteren Bildhälfte die Substrat-Domäne.

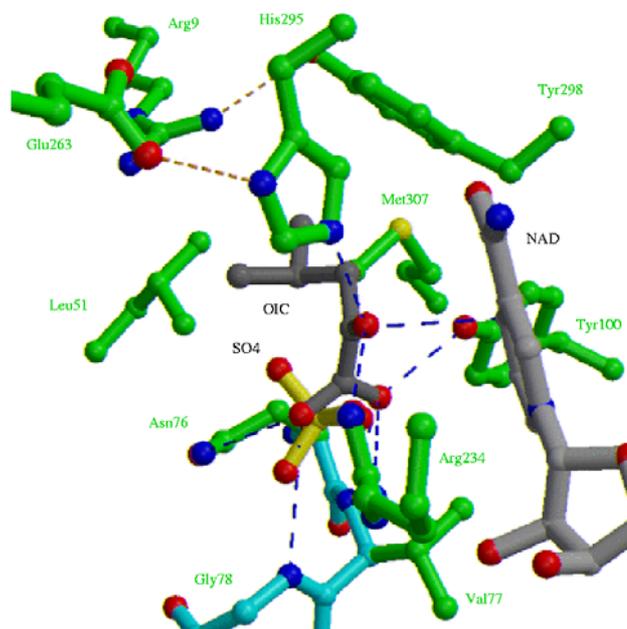


Abb. 4b: Das aktive Zentrum der D-HicDH. Blick entlang Arg234 auf das aktive Zentrum.

Abb. 4: Das aktive Zentrum der D-HicDH aus *L. casei* (PDB: 1DXY) mit den Substraten 2-Ketoisocaproat (dunkelgrau) und Sulfat (gelb) und dem Cofaktor NAD (hellgrau) aus zwei Perspektiven. Aminosäurereste: grün, Peptidgerüst: blau. Wasserstoffbrückenbindungen Substrat-Protein/NAD (blau gestrichelt) bzw. intramolekular im Protein (gelb gestrichelt).

2.3.1 Das aktive Zentrum der D-HicDH

2.3.1.1 Die D-2-Hydroxy- bzw. 2-Ketocarbonsäure-Bindungstasche

Im katalytisch aktiven Zentrum der D-HicDH sind die Aminosäuren His295, Glu263 und Arg234 in allen ähnlichen Strukturen konserviert. Durch Untersuchungen von Punktmutanten konnten ihre Funktionen bestimmt werden.

His295 dient als interner Säure/Base-Katalysator, da es reversibel Protonen zum Carbonylsauerstoff des 2-Ketocarboxylat-Substrates transferiert. In dieser Funktion ähnelt es dem Histidin im aktiven Zentrum der L-LDHs. Dies bestätigen Untersuchungen mit Punktmutationen am His295. Austausch gegen Tyrosin (Taguchi *et al.*, 1993), Serin (Bernard *et al.*, 1997) oder Glutamin (Taguchi *et al.*, 1993; Bernard *et al.*, 1997) führten zu einem drastischen Aktivitätsverlust. Die Restaktivität war mit Tyrosin noch am höchsten, da Tyrosin schwache Säure/Base-Funktion ausüben kann. Bei Austausch gegen Glutamin kommt es zu einer starken pH-Abhängigkeit der Reaktion. Dagegen zeigten sich bei Austausch gegen Lysin (Kochhar *et al.*, 2000) keine gravierenden Aktivitätsänderungen. Lysin kann damit die Funktion von His295 übernehmen, jedoch ist die Wasserstoffbrückenbindungs-Wechselwirkung Lysin-Substratcarbonyl geringer.

Glu263 stabilisiert mit seiner negativen Ladung den protonierten Zustand von His295 und bewirkt dadurch eine pK_A -Erhöhung (Kochhar *et al.*, 1992). Bei Substitution gegen Glutamin oder Aspartat (Taguchi *et al.*, 1997) wurde die katalytische Aktivität stark herabgesetzt. Die Enzymfunktion wurde mit Aspartat weniger beeinträchtigt als mit Glutamin. In den L-LDHs übt ein Aspartat eine äquivalente Funktion wie Glu263 aus. Somit moduliert Glu263 die pH-Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität und unterstützt (wie auch Arg234, s.u.) die Funktion von His295 zur Substratbindung und Katalyse.

Im Gegensatz zur L-LDH gibt es im aktiven Zentrum der D-LDHs und auch der D-HicDH nur ein Arginin. Bei der L-LDH bindet ein Arginin die Carboxylgruppe des Substrates und ein zweites Arginin polarisiert die Substrat-Carbonylgruppe (Grau, 1982). Bei der D-LDH bzw. D-HicDH wird eine duale Funktion des **Arg234** angenommen (Vinals *et al.*, 1995; Stoll *et al.*, 1996). Es zeigte sich, dass der Austausch von Arginin gegen Lysin (Taguchi *et al.*, 1997; Bernard *et al.*, 1997) oder Glutamin (Taguchi *et al.*, 1997) zu einer Aktivitätserniedrigung führt. Die Substratbindung wird aber mit Glutamin stärker beeinträchtigt. Zusätzlich ist für das Arg234 noch eine andere Funktion möglich. Da Substrate ohne 2-Ketogruppe durch die

Substitutionen weniger stark destabilisiert werden und es zu einem Verlust der pH-Abhängigkeit der Bindung kommt, scheint es die Wechselwirkungen zwischen dem Imidazolring des Histidins und dem Carbonylsauerstoff zu unterstützen. Beim Vergleich mit ähnlichen D-LDH-Strukturen fällt die unterschiedliche Ausrichtung von Arg234 auf. Nur wenn seine Seitenkette zum aktiven Zentrum zeigt, kann es eine Wasserstoffbrückenbindung zur Ribose des Nicotinamids ausbilden. Damit entspricht es dem Asn143 in der L-HicDH, das dieselben Eigenschaften besitzt. Es läßt sich folgender dreistufiger Katalysemechanismus vermuten: Zunächst bildet sich ein binärer Komplex durch Bindung von NADH, und erst in einem zweiten Schritt wird das Substrat gebunden unter Ausbildung eines Wasserstoffbrückenbindungs-Netzwerks (Dengler *et al.*, 1997). Solch ein Mechanismus konnte für die L-LDHs (Grau, 1982) und D-LDHs (Taguchi und Ohta, 1994) gezeigt werden.

Zur Bindung der Substrat-Carboxylgruppe dienen zusätzlich zum Arg234 die Hauptketten-Stickstoffatome von **Val77** und **Gly78** (Stoll *et al.*, 1996). Der Seitenkettenstickstoff von **Asn76** wird als zusätzlicher Bindungspartner zur Bildung einer allgemeinen Anionenbindungsstelle angenommen (Dengler *et al.*, 1997). Gly78 und Asn76 sind konserviert in der ganzen D-HDH-Familie.

Ein Tyrosin (**Tyr100**), das Verbindungsglied zwischen beiden Domänen ist, gilt auch noch als potentieller Wasserstoff-Donor für die Substrat-Carboxylgruppe (Dengler *et al.*, 1997). Dieser Aminosäurerest ist bislang noch nicht auf seine genaue Funktion hin untersucht worden.

2.3.1.2 Die Substratrest-Bindungstasche

Den Substratrest umgeben die Aminosäureseitenketten Arg9, Leu51, Tyr298, Met307 und Gly136. Gly136 stammt aus der b-Untereinheit. **Tyr298** bildet eine Wasserstoffbrücke mit **Arg9**. Möglicherweise ist die hydrophobe Seitenketten-Bindungstasche sogar wichtiger für die asymmetrische Induktion als die Bindung der Substrat-Carboxylgruppe (Dengler *et al.*, 1997).

Tyr298, Met307 und Leu51 bilden eine unpolare Tasche für den Substratrest. So sind Substrate mit aromatischen Seitenketten, bei denen das Enzym höchste Aktivität zeigt (Kallwaß, 1989), bei dieser unpolaren Umgebung bevorzugt. Dabei scheint es weniger auf die Kettenlänge des Substratrestes anzukommen, als vielmehr auf die mögliche sterisch ungehinderte Konformation mit Tyr298 und Met307. Es können sich vermutlich auch hydrophobe Interaktionen des Substratrestes mit dem aromatischen Rest von Tyr298 ausbilden (Dengler *et*

al., 1997). **Tyr298** ist schräg über den Substratrest gebogen und ist wahrscheinlich dafür verantwortlich, dass Substrate mit aromatischem Resten, die sich parallel anordnen, bevorzugt und sperrige C₃-Verzweigungen sowie geladene Reste überhaupt nicht umgesetzt werden. Nur die D-LDHs besitzen ebenso zwei parallel angeordnete Tyrosine bzw. Phenylalanine (Tyr298, Tyr299). Die D-LDHs setzen jedoch nur kleine Substrate mit einer Methylgruppe als Rest um, was allerdings auch durch andere Proteinreste im aktiven Zentrum bedingt wird.

Leu51 ist wohl der entscheidende Rest im aktiven Zentrum für die unterschiedlichen Substratspezifitäten in D-HicDH, D-LDH und D-PGDH (Dengler *et al.*, 1997). Bei der D-LDH (2DL) ragt an dieser Stelle ein sperriger und unflexibler Tyrosinrest mitten ins aktive Zentrum, so dass große Substrate gar nicht mehr gebunden werden können. Bei der D-PGDH liegt an dieser Stelle ein Arginin, das gemeinsam mit einem zweiten Arginin, an Stelle des Gly136 in der D-HicDH, eine positive Bindungsstelle für die Phosphoryl-Gruppe der D-PGDH bildet. So wird auch die Wichtigkeit des kleinen Restes **Gly136** (oder Ala135) der b-Untereinheit offensichtlich. Bei der D-LDH befindet sich an dieser Stelle ein Tryptophan. Es deckt den Eingang zum gesamten aktiven Zentrum ab, so dass hier nur kleinere Substrate ins aktive Zentrum gelangen können.

2.3.2 Domänenbewegung

Bei der Katalyse NAD⁺-abhängiger Dehydrogenasen konnte bei der enzymatischen Reaktion eine Bewegung der Domänen festgestellt werden. Dies scheint einer der wichtigsten Faktoren bei der Katalyse dieser Enzymklasse zu sein (Eklund und Bränden, 1987). Durch die Domänenbewegung wird das aktive Zentrum vom Lösungsmittel abgeschirmt, was den Protonentransfer erleichtert (Ptitsyn *et al.*, 1988; Eklund *et al.*, 1981), der effektiv nur in einer hydrophoben Umgebung erfolgen kann (Stoll *et al.*, 1996). In L-LDHs erfolgt diese Abschirmung durch die Bewegung eines Loop vor das aktive Zentrum (Waldman *et al.*, 1988). In den D-LDHs jedoch gibt es solch einen Loop nicht. Offene Apoproteinkonformationen und geschlossene Holoproteinkonformationen sind in verschiedenen NAD⁺-abhängigen Dehydrogenasen beobachtet worden (z. B. Grau *et al.*, 1980). Auch bei der FDH konnten beim Vergleich der Apo- und Holoproteinstruktur unterschiedliche Öffnungswinkel von etwa 7.5° zwischen den Domänen beobachtet werden (Lamzin *et al.*, 1994). Vermutlich bindet das NAD⁺ in der offenen Apoproteinkonformation an das Protein, gefolgt von der Domänenbewegung und dem Schließen des aktiven Zentrums. Wichtige Wechselwirkungen zwischen NAD⁺ und Protein, die weitere Konformationsänderungen initiieren und die katalytische Domäne in die

richtige Reaktionsorientierung bringen, müssen noch untersucht werden (Lamzin *et al.*, 1994). Ob sich der breite Spalt zwischen den Domänen erst unmittelbar bei der enzymatischen Reaktion der D-HicDH schließt oder nicht, konnte noch nicht nachgewiesen werden. Sowohl Apo- als auch Holoprotein der D-HicDH zeigen bei der Röntgenstrukturanalyse ihrer Kristalle die gleiche Spaltöffnung. Jedoch ist der Spalt zu groß für feste Wasserstoffbrückenbindungen der Substratsauerstoffatome zu allen potentiellen Wasserstoffbrücken-Donoren (His295, Arg234, Asn76-Gly78 und Tyr100). **Leu51** paßt nun optimal zwischen alle anderen Reste im Substratbindungsraum. Es würde eine optimale Wasserstoffbrückenbindung bei 10° engerem Spalt ermöglichen (Dengler *et al.*, 1997).

2.3.3 Anwendung der D-HicDH

Die D-HicDH kann zur enantioselektiven Synthese von D-2-Hydroxycarbonsäuren durch Reduktion der entsprechenden 2-Ketocarbonsäuren eingesetzt werden. Die optisch aktiven D-2-Hydroxycarboxylate sind wertvolle Ausgangsverbindungen zur Herstellung verschiedener Arzneimittel wie halbsynthetischer Penicilline, Cephalosporine und Medikamenten gegen Fettleibigkeit (Hummel und Kula, 1989).

Aus einem racemischen Gemisch von D- und L-2-Hydroxycarbonsäuren können in einem Enzym-Membran-Reaktor nach Oxidation zu Ketocarbonsäuren und einer Transaminierungsreaktion aliphatische und aromatische L-Aminosäuren hergestellt werden (Wandrey *et al.*, 1984). Durch Reaktion mit L-Leucin-Dehydrogenase im letzten Schritt entsteht L-Leucin (Schütte *et al.*, 1985), mit L-Phenylalanin-Dehydrogenase erhält man L-Phenylalanin (Hummel *et al.*, 1984; Brunhuber *et al.*, 1994).

2.4 Der pflanzliche Photorezeptor Phytochrom

Die Entwicklung und das Wachstum höherer Pflanzen sind stark abhängig von den Lichtverhältnissen an ihrem Standort. Pflanzen besitzen mehrere Photorezeptorsysteme, die die Richtung, die Intensität, Dauer der Einstrahlung und/oder spektrale Zusammensetzung des einfallenden Lichts erkennen können. Phytochrome sind solche Photorezeptoren, die viele Entwicklungsprozesse (Photomorphogenese) in der Pflanze regulieren, u.a. die Samenkeimung oder die Deetiolierung (Inhibierung des Hypokotylwachstums), Entwicklung von Chloroplasten, Blättern und Blütenbildung (Mohr und Schopfer, 1987).

Das Phytochrom aus etiolierten (im Dunkeln gewachsenen) Haferkeimlingen (Phytochrom A) ist am häufigsten untersucht worden. Es gelang die Präparation des intakten Moleküls mit einem Molekulargewicht von 124 kDa pro Monomer und 1128 Aminosäuren (Viestra und Quail, 1982). Die Primärstruktur des Phytochroms A (*phyA*) aus Hafer (*Avena sativa*) wurde durch cDNA-Sequenzierung bestimmt (Hershey *et al.*, 1985). Gelfiltration (Jones und Quail, 1986), elektronenmikroskopische Untersuchungen (Jones und Erickson, 1989) und Kleinwinkelstreuungsmessungen (Tokutomi *et al.*, 1989; Nakasako *et al.*, 1990) deuten auf eine dimere, γ -förmige dreidimensionale Proteinstruktur hin, bei der sich die beiden Monomere durch Wechselwirkungen zwischen den C-terminalen Hälften zusammenlagern. Hingegen sind die N-terminalen Hälften, in denen die Chromophore gebunden sind, für die spektroskopischen Eigenschaften außerordentlich wichtig. Beide Regionen werden durch eine Gelenk-Region verbunden, die dem Angriff von Endopeptidasen besonders ausgesetzt ist und wahrscheinlich zur Proteinoberfläche ausgerichtet ist.

Phytochrome besitzen als prosthetische Gruppe ein offenkettiges Tetrapyrrol-Molekül, das über eine Thioetherbrücke kovalent an ein Cystein (Cys 321 in *Avena sativa*) gebunden ist (Abb. 5).

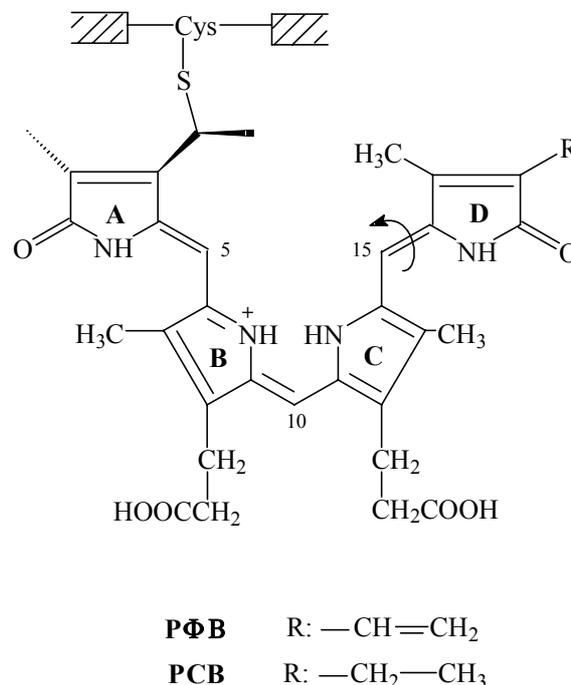


Abb. 5: Schematische Darstellung des Phytochromchromophors in der P_r-Form. Der Chromophor ist über eine Thioetherbrücke zum Cystein (Cys 321 in *Avena sativa*) an das Protein gebunden. Der Chromophor ist in der vorgeschlagenen ZZZ-anti, syn, anti-Konformation in der protonierten Form abgebildet (Hildebrandt *et al.*, 1992). PΦB: Phytochromobilin, PCB: Phycocyanobilin.

Die Bestrahlung mit Licht verschiedener Wellenlängen führt zu einer Z/E-Isomerisierung des Chromophors an der C₁₅-Doppelbindung. Dabei werden auch zwei verschiedene Protein-Konformationen eingenommen. Die P_{fr}-Form (*far red*) bildet sich bei Bestrahlung mit hellrotem Licht (um 660 nm) und besitzt das Absorptionsmaximum bei 730 nm (124 kDa Phytochrom A). Diese stellt beim nativen Phytochrom die biologisch aktive Form dar. In der Zelle wird das Phytochrom A in der inaktiven P_r-Form synthetisiert. Ihr Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 667 nm. Die starke Überlappung der Absorptionsbanden der P_r- und P_{fr}-Form verhindert eine vollständige Photokonversion, so dass das P_{fr}-Spektrum noch ca. 20 % der P_r-Form enthält. Die P_r-Form tritt überwiegend in Dunkelheit auf und kann auch durch Bestrahlung mit dunkelrotem Licht ($\lambda = 715 \text{ nm}$) aus der P_{fr}-Form reversibel erzeugt werden. Ohne erneute Belichtung wandelt sich die P_{fr}-Form über einen gewissen Zeitraum hinweg, je nach Phytochromart, wieder in die P_r-Form um. Im Gegensatz zu der aktiven Form ist die P_r-Form weitgehend thermisch stabil (Rajek, 1999).

Die Bindung des Chromophors an das Protein erfolgt *in vitro* „autokatalytisch“, d.h. ohne intermolekulare Beteiligung von Lyasen (Elich und Lagarias, 1989; Lagarias und Lagarias, 1989). So können neben dem nativen Chromophor Phytochromobilin (PΦB) auch verwandte Chromophore wie Phycocyanobilin (PCB) (Li und Lagarias, 1992 und 1994) oder auch modifizierte Tetrapyrrole (Lindner *et al.*, 1997) eingebaut werden. Der Chromophor PCB, der aus der photosynthetischen Alge *Spirulina geitleri* (Kufer *et al.*, 1982; Kufer und Scheer, 1979) gewonnen wird, wird sehr häufig verwendet, da er leichter und in größerer Ausbeute erhältlich ist als PΦB. Durch diesen Austausch des Chromophors ist allerdings eine Blauverschiebung der Absorptionsbanden beider Formen gegenüber den nativen Phytochromformen zu beobachten (Kidd und Lagarias, 1990). Die Biosynthesen des Apophytochroms und des Chromophors finden *in vivo* getrennt voneinander statt (Bonner, 1967; Beale, 1990; Jones *et al.*, 1986; Elich *et al.*, 1989).

In Abbildung 6 ist das Absorptionsspektrum der P_r- und P_{fr}-Form am Beispiel des 59 kDa Phytochrom A-Fragments aus Hafer mit dem Chromophor PCB dargestellt.

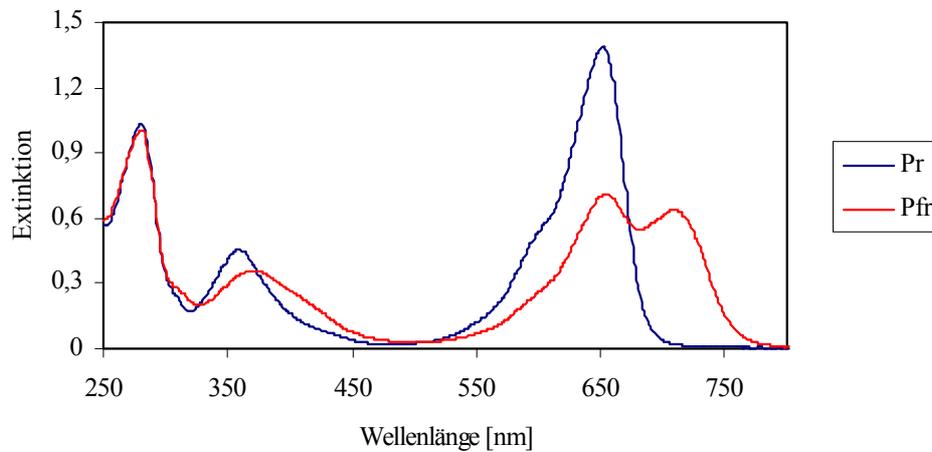


Abb. 6: Absorptionsspektrum der P_r - und P_{fr} -Form des 59 kDa Phytochrom A-Fragments aus Hafer mit dem Chromophor PCB. Die P_r -Form hat ihr Absorptionsmaximum bei 654 nm und die P_{fr} -Form bei 719 nm. Das Absorptionsverhältnis von A_{654}/A_{719} beträgt in diesem Fall 1.34.

Neben dem Phytochrom A, das den Hauptteil in etioliertem Pflanzengewebe ausmacht und bei Belichtung mit Weißlicht in der P_{fr} -Form rasch enzymatisch auf wenige Prozent abgebaut wird (Vierstra, 1993), existieren mehrere andere Phytochromtypen in Pflanzen in deutlich geringeren Mengen, die dagegen lichtstabil sind. In *Arabidopsis thaliana* konnten bisher insgesamt fünf Phytochrom-Typen mit den Bezeichnungen A, B, C, D und E identifiziert werden (Sharrock und Quail, 1989; Clack *et al.*, 1994). Ihre Aminosäuresequenzen zeigen eine Homologie von etwa 50 % (Sharrock und Quail, 1989).

2.4.1 Struktur und Funktion einzelner Phytochromabschnitte

Durch die Expression von Phytochromen in transgenen Pflanzen und Hefen und anschließender *in vitro* Analyse von modifizierten Phytochromen (Deletionen, Punktmutationen, etc.) war es möglich, Funktionen einzelnen Proteinabschnitten zuzuordnen (Abbildung 7).

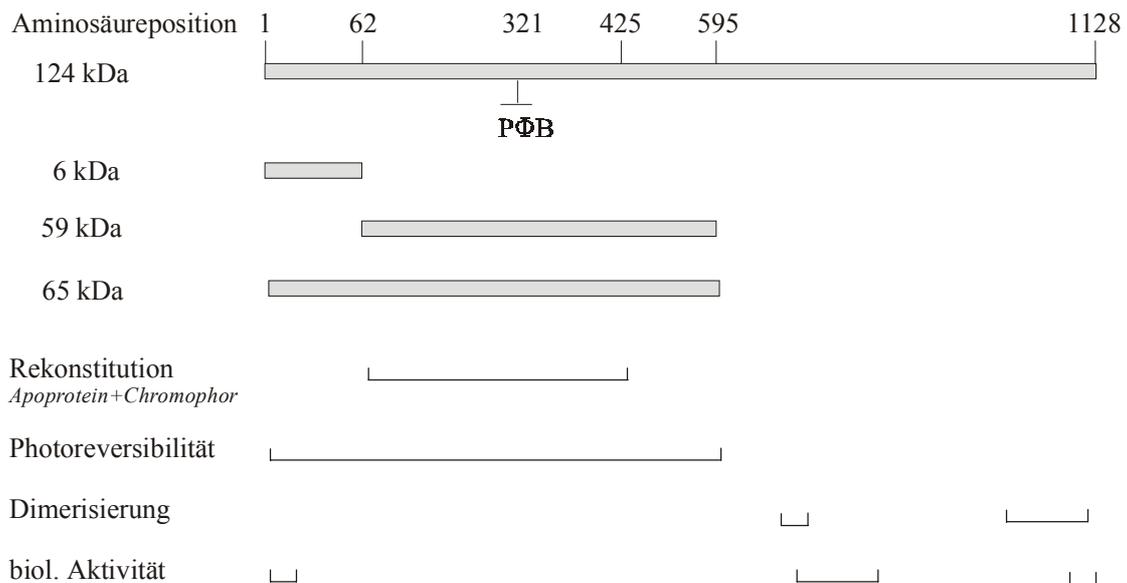


Abb. 7: Schematische Darstellung der Funktionen von Phytochromabschnitten. Die Chromophorbindungsstelle an Position 321 ist gekennzeichnet.

Der Bereich zwischen den Aminosäuren 69 und 425 ist essentiell für die Rekonstitution von Apoprotein und Chromophor (Boylan und Quail, 1991; Cherry *et al.*, 1993; Hill *et al.*, 1994). Für die volle Intensität der Absorptionsspektren sind jedoch zusätzlich die N-terminalen Aminosäuren (AS 13-69) von Bedeutung. Dieser 6 kDa N-terminale Bereich stabilisiert die P_{fr} -Form und setzt so die Geschwindigkeit der lichtunabhängigen Rückreaktion zur P_r -Form herab (Jordan *et al.*, 1995). Eine Deletion (Jordan *et al.*, 1995) oder der Austausch der serinreichen N-terminalen Region (AS 6-12) gegen Alanine (Stockhaus *et al.*, 1992) beeinflusst die biologische Aktivität. Möglicherweise ist dieser Teil an einer Phosphorylierung als Auslöser der Signaltransduktion beteiligt, wie dies fürs Rhodopsin beschrieben wird (Hofmann, 1999).

Im C-Terminus konnten die Aminosäurebereiche 623-673 und 919-1129 identifiziert werden, die für die Dimerisierung des Proteins verantwortlich sind. Die Aminosäuren 1113-1129 sind

darüber hinaus auch für die biologische Aktivität zuständig (Edgerton und Jones, 1992; Cherry *et al.*, 1993). Für die Signaltransduktion ist wohl auch der Bereich der Aminosäuren 630-770 wichtig (Quail *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1995).

Bei der Photoreaktion zwischen der P_r - und der P_{fr} -Form kommt es zu Konformationsänderungen in der gesamten Proteinstruktur. Verschiedene Methoden zeigten, dass in der P_{fr} -Form mehr Bereiche an der Proteinoberfläche liegen als in der P_r -Form (Cordonnier *et al.*, 1985; Schneider-Poetsch *et al.*, 1989; Singh *et al.*, 1989; Singh und Song, 1990; Toyama *et al.*, 1993; Nakazawa und Manabe, 1993). Durch proteolytischen Abbau beider Proteinkonformationen konnte der Aminosäurebereich 346-366 bestimmt werden, der ausschließlich in der P_{fr} -Form exponiert ist. Dieser umfaßt viele geladene Aminosäuren (Grimm *et al.*, 1988).

2.5 Aufgabenstellung

2.5.1 D-HicDH

Die Funktion einzelner Aminosäurereste und der Reaktionsmechanismus der D-HicDH sollen untersucht werden. Dadurch können die Aufklärung der Substratspezifität und der Beitrag von Aminosäureresten zur Thermostabilität der D-HicDH geklärt werden. Dieses Ziel soll einerseits durch Herstellung und Untersuchung von Punktmutanten erreicht werden. Darüber hinaus ist die Aufklärung der D-HicDH-Struktur in verschiedenen Raumgruppen und mit verschiedenen Substraten im aktiven Zentrum von besonderem Interesse.

Die Auswahl der Mutationen erfolgt durch Kombination theoretischer Methoden und der bekannten D-HicDH-Struktur. Punktmutationen im aktiven Zentrum sollen die breite Substratspezifität des Enzyms bezüglich der Seitenketten klären. Strukturalignments mit ähnlichen Enzymen, die nur eine sehr geringe Varianz an Substraten zulassen, sollen Hinweise auf die unterschiedliche Anordnung der Aminosäurereste im aktiven Zentrum geben. Untersucht werden sollen vor allem Mutationen in der hydrophoben Tasche (Tyr298, Met307, Leu51). Hierzu gehören die Austausch gegen polare (M307Q), geladene (Y298R) oder kleinere (Y298A, M307V) Aminosäurereste. Aber auch eine Änderung der Substratspezifität hin zu Substraten, die von der D-HicDH bislang nicht umgesetzt werden (Substrate mit C₃-Verzweigung, ϵ -Carboxylgruppe oder nur mit kleinem Rest), wird getestet. Durch Y298A soll das aktive Zentrum vergrößert werden, um Substrate mit sterisch gehinderten oder geladenen Resten umsetzen zu können. Ein sperriger Tryptophanring (G136W) am Eingang zum aktiven Zentrum könnte die Diffusion großer Substrate ins aktive Zentrum beeinflussen. Durch die Einführung eines Phenylringes ins aktive Zentrum (L51F) wird dieses stark verkürzt und ähnelt damit dem der D-LDHs. Durch die Einführung dieses großen, starren Rests in den Raum zwischen den beiden Domänen soll untersucht werden, ob zur katalytischen Reaktion der D-HicDH eine Domänenbewegung erforderlich oder überhaupt noch möglich ist. Darüber hinaus erfolgen Mutationen zum Bindungsverhalten des Substrats. Ein konserviertes Gly78 zur Bindung der Substrat-Carboxylgruppe wird durch einen größeren Rest ersetzt (G78A). Ein weiterer potentieller Bindungspartner der Substrat-Carboxylgruppe (Y100F) wird untersucht.

Mit Hilfe eines von Leven (1999) erstellten Programms zur Vorhersage thermostabiler Proteinmutanten sollen Aminosäureaustausche für die D-HicDH vorgeschlagen werden. Diese werden anhand der Struktur überprüft und ausgewählt. Die Thermostabilität der Mutanten wird durch kalorimetrische Bestimmung des/der Schmelzpunkt(e) gegenüber dem Wildtyp überprüft.

Die Mutanten werden durch zielgerichtete Mutagenese hergestellt. Zur Kontrolle ihrer mutierten Regionen werden die entsprechenden Plasmidbereiche sequenziert. Alle Enzymvarianten werden analog zum Wildtypprotein exprimiert und aufgereinigt. Ihre Charakterisierung soll durch enzymatische Aktivität, Gelelektrophorese, Massenspektrometrie und Schmelzpunktanalyse erfolgen.

Verschiedene Kristallformen der Wildtyp-D-HicDH mit unterschiedlichen Substraten werden röntgenkristallographisch untersucht. Sie sollen weitere Einblicke in den Reaktionsmechanismus und das Substrat-Bindungsverhalten der D-HicDH ermöglichen.

2.5.2 Phytochrom

Ein 65 kDa und ein 59 kDa (ohne das N-terminalen 6 kDa Fragment) langes N-terminales Phytochrom A-Fragment aus Hafer sollen zur Homogenität aufgereinigt werden und durch Gelelektrophorese, Massenspektrometrie, dynamische Lichtstreuung und spektroskopische Untersuchungen charakterisiert werden. Spektroskopische Untersuchungen ermöglichen einen Funktionstest der Phytochromfragmente unter verschiedenen Bedingungen. Unter anderem soll geklärt werden, ob das kürzere Fragment noch voll funktionstüchtig ist.

Sekundärstrukturuntersuchungen erfolgen mit Circular-Dichroismus. Vergleiche mit Sekundärstrukturvorhersagen sollen Unterschiede zwischen beiden Phytochromfragmenten ermöglichen und Rückschlüsse auf die Struktur des N-terminalen 6 kDa Fragments liefern.

Beide Phytochrome sollen in der P_r-Form kristallisiert werden.

Abbildung 8 zeigt ein Schema der in dieser Arbeit verwendeten Methoden.

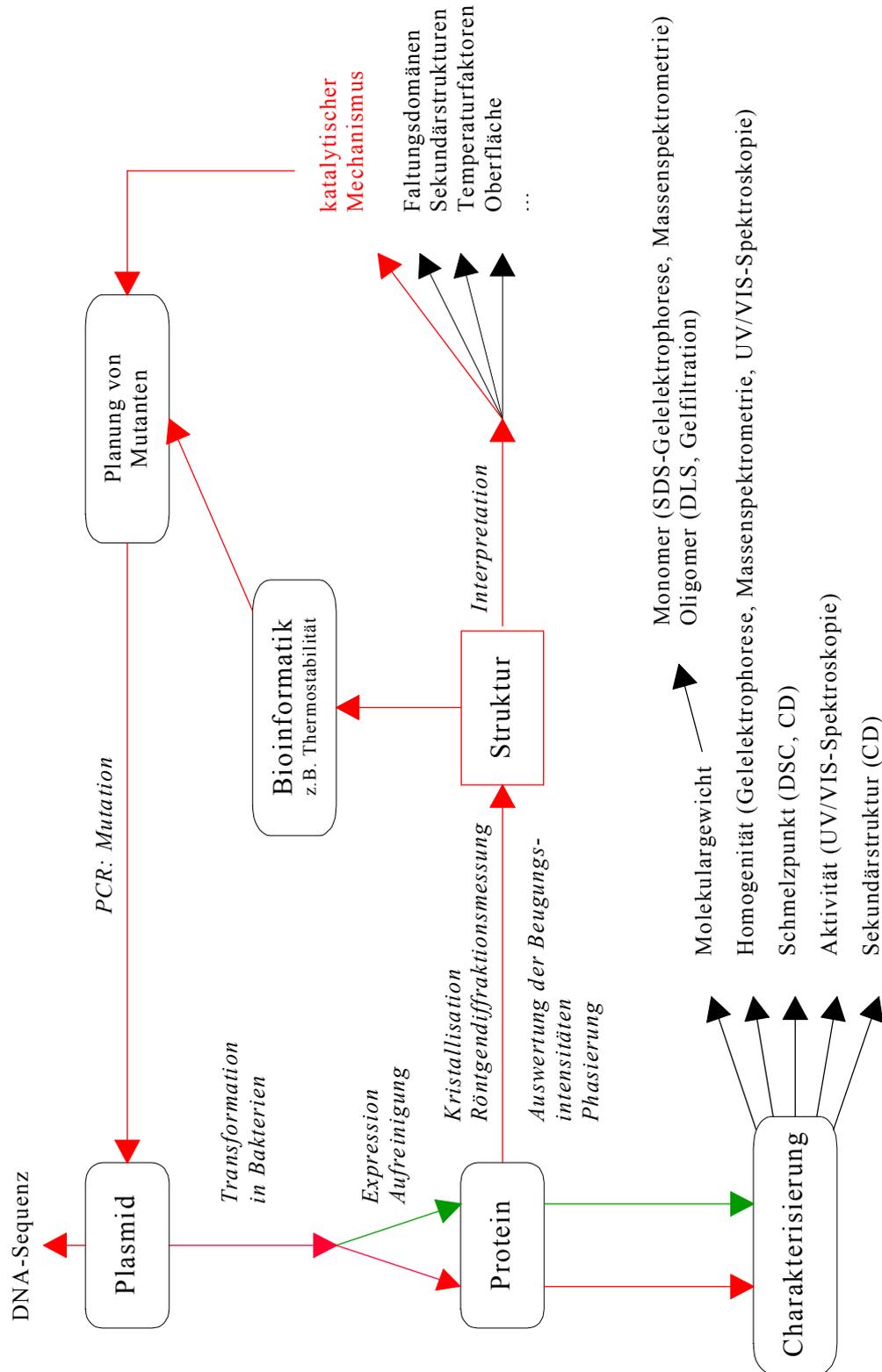


Abb. 8: Schematische Darstellung aller in dieser Arbeit verwendeten Methoden. Rote Pfeile stehen für die Bearbeitung der D-HicDH, grüne Pfeile zeigen den Weg des Phytochroms.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

3.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad *zur Analyse* und wurden von den Firmen Biomol, Merck, Sigma, Fluka, Roth, Serva, Gibco, Riedel-de Haën, Aldrich und Roche (Boehringer Mannheim) bezogen. Bestandteile von Bakterien-Nährmedien wurden von Difco und Gibco bezogen. Restriktionsenzyme (NcoI, AvrII, BlnI, NdeI, NsiI), ihre Reaktionspuffer, weitere Enzyme (Vent_R DNA-Polymerase, T4 DNA Ligase), Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP) und DNA-Gelmarker (100 bp, 1 kb, λ-DNA-BstEII Digest) stammten von der Firma New England Biolabs (NEB). Die Oligonukleotide wurden bei MWG-Biotech angefertigt. Ihre Sequenzen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Das Plasmid pHL4 wurde von Lerch (1989) konstruiert. Der *Escherichia coli* (*E. coli*) Stamm K12 TG1 (DSM Nr.6056) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen.

Das Substrat Tertiär-Butylglyoxylat (Ketotertiärleucin) war ein Geschenk der Degussa-Hüls AG. Alle getesteten Substrate sind in Tabelle 3 aufgelistet. Allen Substraten liegt das Strukturelement R-C(O)-COO⁻ zugrunde. In dieser Arbeit werden die Substrate nur noch mit der Angabe ihres Restes bezeichnet.

Für die Herstellung aller Medien und Lösungen wurde destilliertes Wasser aus einer Reinstwasseranlage von Seralpur mit einer Leitfähigkeit [Ω^{-1}] von $< 50 \mu\text{S}/\text{cm}$ verwendet. Alle angesetzten Lösungen wurden durch eine $0.2 \mu\text{m}$ Membran (Sartorius) filtriert.

Tabelle 2: Oligonukleotidsequenzen der für die Mutagenese und die Plasmidsequenzierung verwendeten Primer

<p>Mutagenese- Primer 5'63' (PSF-Qualität)</p>	<p>NcoI: CAAGAACTCTCCATGGCTTATGG BlpIa: CAAGCCATGCTCAGCAATCTTAAG BlpIb: CAGACTTAAGATTGCTGAGCATGG EcoRI: CTA CT CAGAATTCTACTTACCTAGG E12I: GCACGCGTTGACATCATTCAATATTTCC L51F: GATGGCATCAATTCAATCCAGACAAC G78A: GATTCGGAATGTGGCTACGGATAAC Y100F: GTACCGGCTTTTTCGCCAGCAG D112I: GAATTTGCTTTGACCATTACTTTGTAC T113M: CTTTGACCGATA TGTTGTTACTTGCTAC G136W: GATTATGAAAAAGCGTGGACCTTCATCG D202F: GTGATGTCATT TTTCTTCATGTTCCCTG D202I: GTGATGTCATT ATTCTTCATGTTCCCTG E263Q: CCTATGAATACCAGACCGAGGACTTG E263D: CTATGAATACGACACCGAGGACTTG S293H: GTTGTCTCCACCCGCACATTGC Y298A: GCACATTGCCGCTTACACCGAGACG Y298R: GCACATTGCCCGCTACACCGAGAC M307V: CTGTGCATAATGTTGTTTACTTCTCACT M307Q: CTGTGCATAATCAGGTTTACTTCTCACT</p>
<p>Sequenzierungs- Primer 5'63' (HPSF-Qualität)</p>	<p>A: TGACCACCATGAAGGTGAC B: GGCAACACACTTGAATAC C: ATTGCTGAGCATGGCTTG D: TGTTTCGTCAATGGCGCTG E: TCTCACTACAACATCTCG F: TGATGCTCTCAACAATCG G: CTGTCCTACGAGTTGCAT</p>

Tabelle 3: Substrate der D-HicDH, R: Substratrest, Ph: C₆H₆, Abk.: Abkürzung (verwendet im Ergebnisteil).

Abk.	Struktur: R-	Name, Synonyme
CH ₃ -	CH ₃ -	Pyruvat, 2-Ketopropionat
C ₂ H ₅ -	CH ₃ -CH ₂ -	2-Ketobuttersäure, Propionylameisensäure
	(CH ₃) ₃ -C-	Tertiär-Butylglyoxylat, Ketotertiärleucin
C ₃ H ₇ -	CH ₃ -(CH ₂) ₂ -	2-Ketovaleriansäure, 2-Ketopentansäure
4i-C ₄ H ₉ -	(CH ₃) ₂ -(CH ₂) ₂ -	2-Ketoisocaproat, 4-Methyl-2-oxopentansäure
3i-C ₄ H ₉ -	C ₂ H ₅ -(CH ₃)CH-	2-Ketoisoleucin, 3-Methyl-2-oxopentansäure
n-C ₄ H ₉ -	CH ₃ -(CH ₂) ₃ -	2-Ketocaproat, 2-Ketohexansäure
C ₆ H ₁₃ -	CH ₃ -(CH ₂) ₅ -	2-Ketocaprylsäure, 2-Ketooktansäure
Ph-	Ph-	Phenylglyoxylat, 2-Ketophenylacetat
Ph-CH ₂ -	Ph-CH ₂ -	Phenylpyruvat, 2-Keto-3-phenylpropanat
HO-Ph-CH ₂ -	HO-Ph-CH ₂ -	4-Hydroxyphenylpyruvat, 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure
Indol-CH ₂ -	Indol-CH ₂ -	Indol-3-pyruvat, 3-Indolylbrenztraubensäure
	⁺ NH ₃ -	Oxamat, Aminooxoacetat
	⁻ O-	Oxalat
HO-CH ₂ -	⁻ O-CH ₂ -	3-Hydroxypyruvat, 3-Hydroxy-2-ketopropionat
HOOC-	⁻ OOC-	2-Ketomalonat, Mesoxalat
HOOC-CH ₂ -	⁻ OOC-CH ₂ -	2-Ketobernsteinsäure, Oxalacetat
HOOC-(CH ₂) ₂ -	⁻ OOC-(CH ₂) ₂ -	2-Ketopentandicarbonsäure, 2-Ketoglutarat

3.1.2 Geräte

In Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 4: verwendete Geräte

Technik	Gerät	Firma
CD-Spektrometer	CD-Spektropolarimeter J-715	Jasco
Chromatographie	Äkta explorer 100, MonoQ-HR 5/5- und -HR10/10-Säulen, Superose-12-, Phenyl Sepharose CL-4B-, Superdex 200 HR 10/60-Säulen	Pharmacia Biotech Pharmacia Biotech Pharmacia Biotech Pharmacia Biotech
Dialyseschläuche	MWCO-12-14 kDa, Size 5 ($\phi = 19$ mm)	Medicell Int.
Diaprojektor	Prado Universal	Leitz
DLS	DynaPro-801	Protein-Solutions
DNA-Sequenzierung	ABIPRISM 310	PE Applied Biosystems
DSC	VP-DSC MicroCalorimeter	MicroCal
Elektrophorese	Power Pac 200 (Midicell EC 350 und Minicell EC 370 M), PHAST-System (Steuer-, Lauf- und Färbeeinheit), SDS/IEF /native Gele und Pufferstreifen	BioRad Pharmacia Biotech Pharmacia Biotech
Filter	658 nm Interferenzfilter (P_r -Form), 715 nm Filter (P_{fr} -Form), Celluloseacetatfilter (0.2 μ m und 0.45 μ m), Acrodisc (0.8/0.2 μ m) Spritzenfilter, Ultrafree-MC (0.22 μ m) Celluloseacetatfilter (0.02 μ m)	Sartorius Pall Millipore/Amicon Whatman
Inkubator	Schüttelinkubator Certomat BS-1 Schüttelinkubator Model G25 Brutschrank Function line Heizblock HB-130	B.Braun Biotech Int. New Brunswick Sci. Heraeus Unitek
Kamera	Spiegelreflexkamera EOS 500N	Canon
Kristallisations-zubehör	Linbro-Schalen, Mikrobrücken, silikonisierte Deckgläschen, Cryoloops	Hampton Research Hampton Research

Technik	Gerät	Firma
Küvetten	Quarzhalmikroküvetten (Suprasil) Plastikhalmikroküvetten	Hellma Greiner
Massen- spektrometer	ESI-MS LCQ (T) MALDI-MS Biflex III (TOF)	Finnigan Bruker
Mikroskop	Stemi 2000-C, Stemi SV5	Zeiss
PCR	Mastercycler 5330 (plus)	Eppendorf
pH-Meter	766 Calimatic	Knick
Pipettierautomat	Robotic System Multiprobe 104	Packard
Röntgenanlage	Goniometerköpfe Cryostream Cooler Drehanode (Cu) FR 591 Drehanode (Cu) Rotaflex RU-200 B Flächenzähler MAR 345 Flächenzähler DIP-2030H Monochromator: MAC-XOS Doppelspiegel Monochromator: CMF12-38Cu6 Doppelsp.	Stoe Oxford Cryosystems Nonius Rigaku MAR Research MAC Science MAC Science Osmic
Ultrafiltrations- röhrchen	Centricon-30, Centriprep-30 Ultrafree-15	Millipore/Amicon Millipore
UV/VIS-Spektral- photometer	Ultrospec 2000 UV/VIS, UV-2102 PC und UV-2401 PC	Pharmacia Biotech Shimadzu
Vortex	REAX 2000, REAX top	Heidolph
Waage	Laborwaage SBA 52 Analysenwaage FA-210-4	Scaltec Faust
Wasserbad	WB 7	Memmert
Zellyse	French Pressure Cell Press Ultra-Turrax T25	Sim-Aminco Spec. Ins. IKA Labortechnik Jakob & Kunkel
Zentrifuge	RC 3B Plus und RC 5B Plus; J2-21 mit Rotor JA20, Ultrazentrifuge L8-55 mit Rotor Ti60, 5417C mit Rotor F 45-30-11 5810R mit Rotor F 34-6-38 Biofuge Pico Z 383 K mit Rotor 220.78 V02	Sorvall Beckmann Beckmann Eppendorf Eppendorf Heraeus Hermle

3.1.3 Auswertungsprogramme

Für alle Strukturberechnungen wurden die Rechner Indigo2, Octane und O2 der Firma Silicon Graphics (SGI) mit dem Betriebssystem Irix 6.5 verwendet. Folgende Programme wurden dabei benötigt (Tabelle 5).

Tabelle 5: verwendete Programme zur Auswertung von Daten in dieser Arbeit

Verwendung	Programme	Referenz
Röntgendaten, Verfeinerung	HKL-suite (Denzo, Scalepack) CCP4-suite CNS-suite	Otwinowski und Minor (1997) CCP4 (1994) Brunger <i>et al.</i> (1998)
Graphik	BRAGI O	Schomburg und Reichelt (1988) Jones <i>et al.</i> (1991)
Strukturabbildungen	MOLSCRIPT RASMOL BOBSOFT RENDER LIGPLOT	Kraulis (1991) Sayle und Milner-White (1995) Esnouf (1997) Merritt und Cason (1997) Wallace <i>et al.</i> (1995)
Sekundärstruktur- vorhersagen	DPM DSC GOR IV HNHC PHD PREDATOR SIMPA 96 SOPMA MLRC Secondary Consensus Prediction	Deléage und Roux (1987) King und Sternberg (1996) Garnier <i>et al.</i> (1996) Guermeur (1997) Rost und Sander (1993) Frishman und Argos (1996) Levin (1997) Geourjon und Deléage (1995) Guermeur <i>et al.</i> (1999) Deléage <i>et al.</i> (1997)
Sekundärstruktur- berechnungen	DSSP PROCHECK	Kabsch und Sander (1983) Laskowski <i>et al.</i> (1992)
Strukturalignments	STAMP	Russell und Barton (1992)
Sequenzalignments	BLAST FASTA	Altschul <i>et al.</i> (1997) Pearson (1990)
CD-Spektren	CONTIN K2D SELCON	Provencher und Glöckner (1981) Andrade <i>et al.</i> (1993) Sreerama und Woody (1993)
Aktivitätstest, nicht-lineare Regression	GraFit 4.0	Leatherbarrow (1998)

3.2 Methoden

3.2.1 Site Directed Mutagenesis der D-HicDH

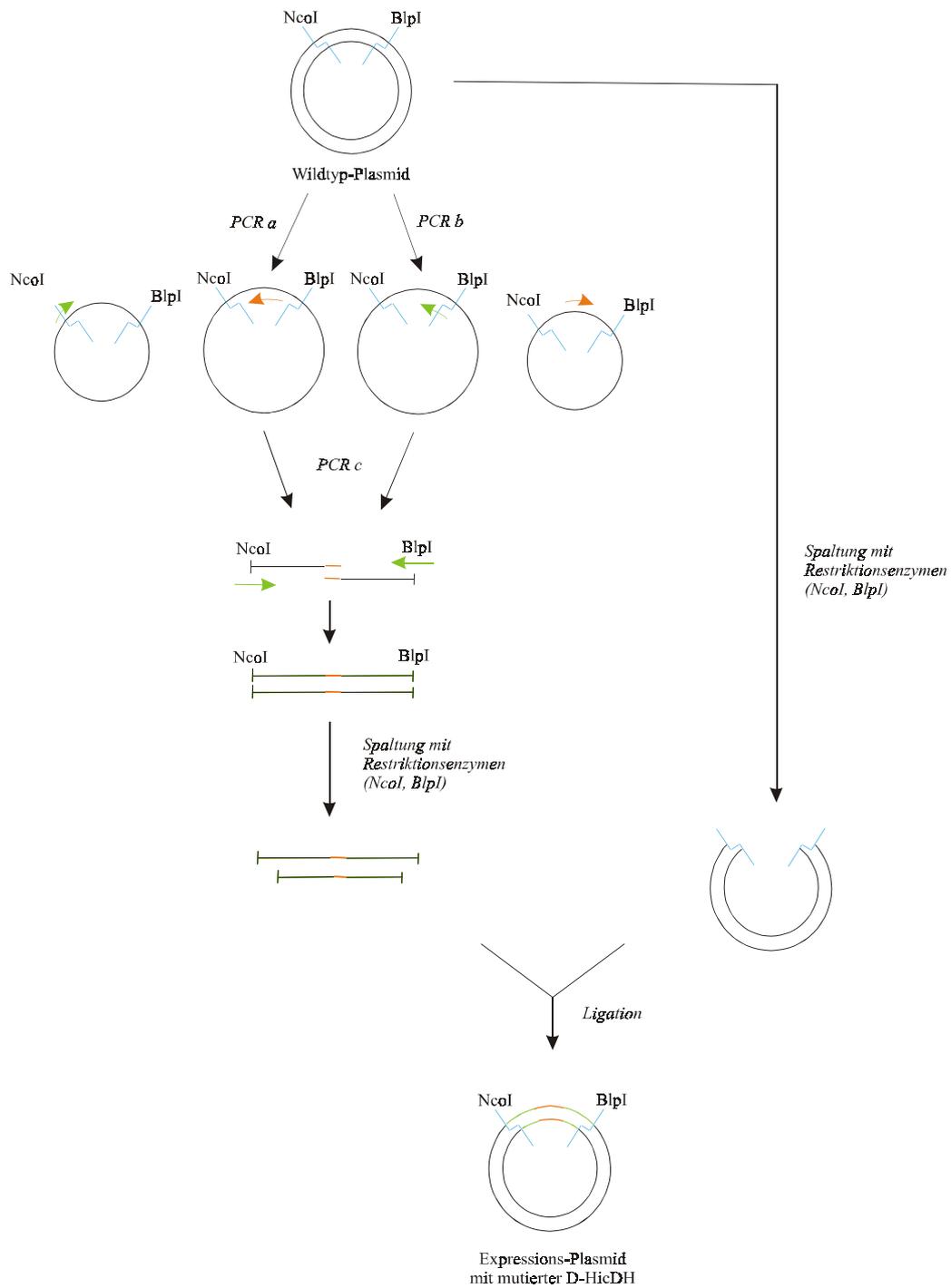


Abb. 9: Schematische Darstellung der *Site-Directed Mutagenesis* der D-HicDH am Beispiel der NcoI/BlnI-Mutationsregion. Mutationsprimer: orange, Restriktionsprimer: grün, Schnittstellen der Restriktionsenzyme: blau.

Die Mutation wird durch drei Polymerase-Kettenreaktionen (Reaktionen a, b, c) eingeführt. Der zwischen zwei Restriktionsschnittstellen (hier NcoI und BlnI) liegende Mutationsort wird mit komplementären, mutationstragenden Oligonukleotiden bedeckt. In den Reaktionen a und b werden jeweils die Sequenzen zwischen mutationstragenden Oligonukleotid und flankierenden Schnittstellen amplifiziert. In Reaktion c werden die gelgereinigten Reaktionsprodukte zusammen mit den die Restriktionsschnittstellen bedeckenden Oligonukleotiden eingesetzt. Das Amplifikationsprodukt wird mit den die flankierenden Schnittstellen schneidenden Restriktionsenzymen nachgeschnitten und mit dem ebenso geschnittenen Plasmidfragment ligiert (Abbildung 9).

3.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR-Reaktion a und b)

Die PCR-Reaktion erfolgt in sterilen dünnwandigen Reaktionsgefäßen mit dem Mastercycler 5330 der Firma Eppendorf in einem Gesamtvolumen von 100 µl. Für die Reaktion werden 2 µg Plasmid-DNA, je 1 µl der beiden Primer (100 pmol/µl in H₂O), 2 µl 100 mM MgSO₄, 10 µl 10x Reaktionspuffer und 3 µl dNTP-Mix (10 mM je dNTP) vereinigt und mit sterilem Wasser auf 99 µl aufgefüllt. Die DNA-Amplifizierung beginnt nach Denaturierung der DNA 2 min bei 95°C mit der Zugabe von 1 µl Vent-Polymerase in die Reaktionslösung. Es folgen 30 Zyklen Denaturierung (30" bzw. 60", abhängig von der Fragmentlänge (<500 bp: 30"), bei 95°C), *Annealing* (61/63/65°C, je nach Schmelzpunkt der Primer, für 20") und Synthese (bei 72°C für 10-70", abhängig von den Fragmentlängen: 80-1180 bp; die Polymerase synthetisiert ca. 17 b/sec). Nach Beendigung der Reaktionszyklen werden die Proben kühl gelagert (4°C oder -20°C).

3.2.1.2 Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel

Zur Kontrolle der PCR-Reaktion (analytisches Agarosegel) werden 15 µl der PCR-Proben mit 2 µl Gelladepuffer (50 % Glycerin, 0.4 % Bromphenolblau, 0.4 % Xylen Cyanol FF) versetzt und auf einem 1 bzw. 2 %igen (2 % bei <500 bp) Agarosegel aufgetrennt. Das 2 %ige Agarosegel ist stärker vernetzt und die kleinen Fragmente werden stärker im Gel zurückgehalten, als bei geringerer Vernetzung (z. B. 1 %). Es wird aus 1 % *low melting* und 1 % normaler Agarose hergestellt. Die Agarose wird in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat pH 8.0, 1 mM EDTA) durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Beim Erkalten wird 1 µl/10 ml Lösung Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml konzentriert) zugegeben, bevor die noch warme

zähflüssige Agaroselösung in einen BRL-Gelträger gegossen wird. Die Proben werden mit 1/10 Volumen 10x Gelladepuffer vermischt, auf das Gel aufgetragen und in einer mit 1x TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer bei 80 mV in 1-1.5 h aufgetrennt. Nach dem Lauf werden die Gele unter UV-Licht betrachtet und zur Dokumentation fotografiert.

Zur Isolation des amplifizierten PCR-Stückes von der restlichen Plasmid-DNA im präparativen Ansatz werden 50 µl der PCR-Reaktionslösung mit 7 µl Gelladepuffer versetzt und auf einem präparativen Gel aufgetrennt. Als Marker dienen im 2 %igen Agarosegel der 100 bp DNA-Marker und im 1 %igen Agarosegel der 1 kb bzw. der λ -Bst EII DNA-Marker (Markerlösung: 1 µg Marker (1 µg/µl), 1 µl 10x Gelladepuffer, 8 µl 1x TAE-Puffer).

3.2.1.3 Aufreinigung der DNA-Probe aus Agarosegelen

Nach Lokalisierung des zu extrahierenden DNA-Fragments im Gel unter UV-Licht werden die Banden aus dem Gel mit Hilfe eines Skalpellens geschnitten, ohne überschüssiges Gel in ein 1.5 ml Eppendorf Einmalreaktionsgefäß überführt und dieses anschließend gewogen. Die weitere Extraktion und Reinigung der DNA aus dem Gelstück erfolgt mit dem NUCLEOTRAP (Macherey-Nagel, Nr. 740584) Extraktions Kit. Die DNA-Agarosestückchen werden je 100 mg mit 300 µl NT1-Puffer (bei 2 %igen Agarosegelen wird das doppelte Volumen NT1-Puffer eingesetzt) in Lösung gebracht, mit 15 µl NUCLEOTRAP-Suspension (Glasmilch) versetzt und 10 min bei 50°C im Heizblock unter mehrmaligem Vortexen inkubiert. Anschließend werden die Proben bei 10000 rpm 30" zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet 2x mit 500 µl NT2-Puffer unter Vortexen gewaschen und 30" bei 10000 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird 2x in 500 µl NT3-Puffer gewaschen (vortexen und zentrifugieren, s.o.). Nach dem Entfernen des NT3-Puffers wird das Pellet noch einmal zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet an der Luft für 10-15 min getrocknet, in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) aufgenommen und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert mit mehrmaligem Vortexen. Nach 30" Zentrifugation bei 10000 rpm enthält der Überstand die DNA und wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bei NT1, NT2 und NT3 handelte es sich um im Kit mitgelieferte Lösungen, deren genaue Zusammensetzung nicht beschrieben ist.

3.2.1.4 PCR-Reaktion c

Jeweils 25 µl der zugehörigen DNA-Fragmente a und b einer Mutation aus **3.2.1.3** werden mit 3 µl 100 mM MgSO₄, 10 µl 10x Reaktionspuffer, 3 µl dNTPs und 66 µl Merck-H₂O versetzt. Die PCR-Reaktion erfolgt unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie unter **3.2.1.1** beschrieben: 60" Denaturierung, Annealing bei 61°C für 70" und Synthesezeit von 50" (NcoI/BlpI) bzw. 1'25" (BlpI/EcoRI). 1 µl Vent-Polymerase wird wieder erst nach der ersten Denaturierung zum Reaktionsgemisch gegeben.

3.2.1.5 Ethanolfällung der PCR-Reaktion c

90 µl des PCR-Ansatzes c wird mit 9 µl 3 M Natriumacetat (pH 5.2) und 250 µl Ethanol (RT) versetzt und 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, das Pellet in 70 % Ethanol gewaschen, 5 min zentrifugiert bei 13000 rpm und der Überstand vollständig abgenommen. Das Pellet wird 15 min an der Luft getrocknet und anschließend in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.2.1.6 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen

Die DNA-Enden von den mutierten Fragmenten und das unveränderte Plasmid müssen mit denselben Restriktionsenzymen an entsprechender Stelle geschnitten werden, damit das mutierte DNA-Fragment mit dem Restplasmid ligiert werden kann. Hierzu werden in einem 500 µl Einmalreaktionsgefäß 10 µl der in TE-Puffer aufgenommenen Fragment-DNA aus **3.2.1.5** mit 2.5 µl 10x Spaltungspuffer, je 1 µl der Restriktionsenzyme (NcoI/BlpI oder BlpI/EcoRI) und 10.5 µl Merck-H₂O versetzt (insgesamt 25 µl) und 2-3 h bei 37°C inkubiert. Ebenso verfährt man mit der Plasmid-DNA: 20 µg-Plasmid-DNA werden mit 5 µl 10x Spaltungspuffer und je 2.5 µl Restriktionsenzymen versetzt, die Lösung mit Merck-H₂O auf 50 µl aufgefüllt und dann inkubiert (s.o.). Die Wahl des Spaltungspuffers ist abhängig von der Art der Restriktionsenzyme. In diesem Fall wird der NEB-Puffer 4 verwendet mit folgender Zusammensetzung: 20 mM Tris/Acetat pH 7.9, 10 mM Magnesiumacetat, 50 mM Kaliumacetat, 1 mM DTT.

Auf einem präparativen Agarosegel werden anschließend die kompletten Spaltungsansätze, mit 1/10 Volumen Gelladepuffer versetzt, aufgetragen und aufgetrennt. Die entsprechenden Banden

werden wie unter **3.2.1.3** beschrieben ausgeschnitten und mit dem NUCLEOTRAP Extraktions Kit von Macherey und Nagel die DNA isoliert. Der letzte Elutionsschritt wird dabei nur einmal durchgeführt und das Pellet dann in nur 25 µl TE-Puffer aufgenommen. Zur erneuten Kontrolle wird noch einmal ein analytisches Agarosegel mit 3 µl DNA-Lösung durchgeführt, das auch zur Konzentrationsabschätzung der DNA dient.

3.2.1.7 Ligation der mutierten DNA-Fragmente mit Restplasmid

Die Ligation wird in modifizierter Weise nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Etwa äquimolare Mengen Vektor- (3 µl) und Fragment-DNA (5 µl) werden in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß vereinigt und 5 min bei 45°C inkubiert. Die Erwärmung dient zum Aufschmelzen kohärenter Enden, die sich bereits verbunden haben könnten. Anschließend werden auf Eis 3 µl 5x T4 DNA-Ligasepuffer, 1 µl T4 DNA-Ligase und 3 µl Wasser zu einem Gesamtvolumen von 15 µl zugegeben. Über Nacht wird der Ligationsansatz bei 16°C inkubiert.

3.2.1.7.1 Herstellung kompetenter Zellen

Kompetente Zellen (*E. coli*-Stamm TG1) werden nach dem Protokoll von Inoue *et al.* (1990) hergestellt. Bakterienzellen aus einer Glycerin-Dauerkultur (Stocklösung) werden auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer Kolonie wird eine 20 ml LB-Kultur angeimpft. Nach etwa 12 h Wachstum bei 37°C und 180 rpm erhält man eine dichte Bakterienkultur. Mit dem resuspendierten Pellet von 1 ml dichter Übernachtskultur in frischem Medium wird eine 250 ml LB-Kultur angeimpft und bei 30°C und 180 rpm bis zu einer Dichte von 0.8 OD₆₀₀ angezogen. Dann wird sie 10 min auf Eis gestellt, in Falconröhrchen 15 min bei 4000 rpm und 4°C im Ausschwingrotor zentrifugiert. Das Pellet wird kurz gevortext und dann in 10-20 ml kaltem TB-Puffer (10 mM Pipes, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl) resuspendiert. Die Suspensionen werden vereinigt, 10 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 4°C, 4000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 20 ml TB-Puffer resuspendiert, 1.4 ml DMSO zugegeben (Endkonzentration 7 %), 10 min auf Eis inkubiert, in 500 µl Portionen aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Zellen werden bei -70°C gelagert.

3.2.1.8 Transformation

5 µl des Ligationsansatzes werden mit 100 µl kompetenter *E. coli* TG1 Zellen gemischt und 20-30 min auf Eis inkubiert. Danach werden sie 90 s bei 42°C im Wasserbad und sofort wieder 1-3 min auf Eis inkubiert. Zu jedem Transformationsansatz werden 300 µl auf 37°C vorgewärmtes LB-Medium gegeben, 45 min bei 37°C geschüttelt (225 rpm) und auf LB/Amp-Platten ausgestrichen. Nachdem die Flüssigkeit absorbiert wird, läßt man die Platten über Nacht bei 30°C inkubieren. Die gewachsenen Kolonien können einzeln in kleine LB-Mediumansätze (3 ml) überführt werden, um Plasmid-DNA zu isolieren.

3.2.2 Nachweis der korrekten Mutation

3.2.2.1 Anzucht von Bakterienkulturen

Bakterienkulturen werden in LB-Medium (10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, in 1 l) angezogen. Zum Gießen von Agarplatten wird dem Medium 14 g/l Agar vor dem Autoklavieren zugesetzt. Da das in dieser Arbeit verwendete pHL4-Plasmid ein Ampicillinresistenzgen besitzt, wird dem Medium unmittelbar vor dem Animpfen mit Zellen 150 µg/ml dieses Antibiotikums in Form einer 1000fachen Stammlösung in sterilem Wasser zugegeben.

Die Anzucht der Bakterien zur Proteinexpression erfolgt in SR-Medium, einem reichhaltigen Medium. Dabei werden 900 ml Medienlösung (20 g Trypton, 20 g Hefeextrakt, 20 g Casaminoäuren, 10 g Fleischextrakt und 10 ml Glycerin, mit Wasser aufgefüllt) und 100 ml Pufferlösung (0.17 M KH_2PO_4 und 0.72 M K_2HPO_4 in Wasser) nach dem Autoklavieren steril vereinigt, und vor dem Animpfen mit Bakterien (einer 20 ml Übernachtskultur in LB-Medium) mit der entsprechenden Menge Ampicillin versetzt. Das Wachstum der Bakterien erfolgt bei 30°C und 180 rpm im Schüttelinkubator und kann photometrisch durch Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) verfolgt werden.

3.2.2.2 Plasmidisolation

3.2.2.2.1 Minipräparation von Plasmid-DNA nach der Methode der alkalischen Lyse

Diese Methode der Plasmid-DNA Herstellung benutzt man zur schnellen Identifizierung von erwünschten Plasmidvarianten nach der Mutagenese.

Eine nach der Transformation (3.2.1.8) gewachsene Kolonie wird in 3 ml LB/Amp-Medium überführt und über Nacht bei 220 rpm und 29.5°C geschüttelt. 1 ml der dichten Kultur wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird möglichst vollständig abgenommen. Das Pellet wird in 300 µl Puffer P1 (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA) resuspendiert. Es werden 300 µl frische Lösung P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) zugegeben, vorsichtig geschwenkt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 300 µl kalter Puffer P3 (2.55 M Kaliumacetat pH 4.8) zugesetzt, vorsichtig gemischt und 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Protein und chromosomale DNA sind präzipitiert und werden bei der Zentrifugation pelletiert. 600 µl vom Überstand werden abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß mit demselben Volumen der gelben Phase aus Tris-Puffer überschichtetem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 50/49/1 versetzt, gut geschüttelt und 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase enthält nun die Plasmid-DNA und wird in einem frischen Reaktionsgefäß mit 400 µl (0.6 Volumenteilen) Isopropanol gemischt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 13000 rpm 5 min zentrifugiert. Das Pellet wird mit 300 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach 15 min Trocknen des Pellets an der Luft wird es in 20 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase aufgenommen.

3.2.2.2.1.1 Restriktionsanalyse der Minipröp-Plasmid-DNA

Ähnlich wie unter 3.2.1.6 beschrieben wird nun die Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen versetzt und die gespaltene DNA auf einem Agarosegel aufgetrennt. 5 µl der Minipröp-Plasmid-DNA werden mit je 1 µl Restriktionsenzym (NcoI/BlpI: NdeI, NsiI; BlnI/EcoRI: AvrII), 1 µl 10x Spaltungspuffer (NcoI/BlpI: NEB-Puffer 3 (50 mM Tris/HCl pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1 mM DTT); BlnI/EcoRI: NEB-Puffer 2 (10 mM Tris/HCl pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT)) und Merck-Wasser versetzt, so dass ein Endvolumen von 10 µl erreicht wird. Zum Vergleich wird auch Wildtyp-Plasmid-DNA auf diese Weise gespalten und im Gel aufgetrennt. 1 µl Gelladepuffer wird vor dem Gelauftrag zugegeben. Bei den unter UV-Licht dokumentierten Gelen kann man aus dem Fragmentierungsmuster der Plasmid-DNA

auf eine eingebaute Mutation im Plasmid schließen.

3.2.2.2 Midipräparation von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA Präparation für größere DNA-Mengen, z.B. für Sequenzierungen und Mutagenese, wird mit dem Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Eine 25 ml Kultur mit LB-Medium/Amp wird 12-16 h bei 29.5°C und 180 rpm angezogen bis sie eine Zelldichte OD_{600} von >2,0 haben. Die Bakterienzellen werden bei 6000 g (7100 rpm SS-34 Rotor) 15 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend werden sie nach dem Verwerfen des Überstandes bei -20°C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

Das Zellpellet wird in 4 ml Resuspensionspuffer P1 (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNASE A) durch Vortexen resuspendiert. Danach wird die Zellsuspension mit 4 ml Lysispuffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) versetzt, leicht geschwenkt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann 4 ml Neutralisationspuffer P3 (3.0 M Kaliumacetat pH 5.5) zugegeben, leicht geschwenkt und 15 min auf Eis inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation bei 20000 g (13.000 rpm SS-34 Rotor) für 30 min bei 4°C. Der Überstand wird noch einmal bei gleichen Bedingungen 15 min zentrifugiert. Dieser Überstand wird sofort auf die Qiagen-tip 100 Säulen gegeben, die zuvor mit 4 ml Äquilibrierungspuffer QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15 % Isopropanol, 0.15 % Triton X-100) beschickt wurden. Die Säule wird mit 2x 10 ml Waschpuffer QC (1.0 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15 % Isopropanol) gewaschen und die Plasmid-DNA mit 5 ml Elutionspuffer QF (1.25 M NaCl, 50 mM Tris pH 8.5, 15 % Isopropanol) eluiert. In 15 ml Falconröhrchen wird das Eluat mit 3.5 ml Isopropanol (RT) gemischt und sofort bei 6000 rpm 40 min bei 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird mit 2 ml 70 % Ethanol (RT) gewaschen und noch einmal bei 6000 rpm, 4°C, 20 min zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig abgenommen, das Pellet 10 min luftgetrocknet und in 30 µl H₂O (oder TE-Puffer) aufgenommen.

3.2.2.3 Konzentrationsbestimmung und Reinheit von DNA

Photometrisch wird die Absorption einer 1:200 verdünnten DNA-Lösung in Wasser bei 260 und 280 nm bestimmt. Bei 260 nm absorbiert DNA und bei 280 nm die aromatischen Aminosäuren der Proteine. Letztere dienen als Reinheitsfaktor, um die Verunreinigung mit Proteinen zu überprüfen.

$C_{\text{DNA}} = E_{260} \cdot c \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$ mit $c_{\text{DNA}} = 50 \mu\text{g/ml}$ ($E_{260} = 1$)

Reinheitskoeffizient: E_{260}/E_{280} sollte bei 1.8-2.0 liegen

3.2.2.4 DNA-Sequenzierung

Folgendes Verfahren wird zur Sequenzierung des gesamten Plasmids und zur Kontrolle der Mutagenese eingesetzt.

In PCR-Reaktionsgefäßen werden 4 μg Plasmid-DNA mit Merck-Wasser auf 10 μl verdünnt und dann mit 1 μl Sequenzierprimer (10 pmol/ μl) und 4 μl Bigdye-Mix (ABIPRISM) versetzt. Die PCR-Reaktion im Mastercycler 5330 der Firma Eppendorf setzt sich wie folgt zusammen:

1. 4 min 95°C,
2. 30 Zyklen: 15" 95°C, 15" 55°C, 4 min 60°C,
3. anschließend 8°C (über Nacht).

Die PCR-Ansätze werden mit 85 μl Wasser verdünnt und in 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Bei Raumtemperatur werden nun 10 μl 3 M Natriumacetat pH 4.6 zugegeben, leicht gemischt und anschließend noch 250 μl Ethanol (RT) hinzu pipettiert. Sofort wird 30 min bei 20°C und 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand vollständig entfernt und das nicht sichtbare Pellet noch einmal mit frischem 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand wieder vollständig entfernt, das Pellet lichtgeschützt an der Luft 10 min getrocknet, in 20-25 μl H₂O/TSR 1:1 aufgenommen und in Sequenziergefäße mit Gummistopfen überführt. Diese werden bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt bis zur Sequenzierung. Unmittelbar vor der Sequenzierung wird die DNA in den Sequenziergefäßen 1 min bei 95°C denaturiert. Die DNA-Sequenzierung erfolgt in einem Gerät der Firma ABIPRISM durch Kapillarelektrophorese. Vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe sind an die vier terminierenden Basen gebunden und werden von einem entsprechenden Detektor am Ende der Kapillare registriert. Das Elektropherogramm muß anschließend noch mit der vorgeschlagenen Basensequenz verglichen werden.

3.2.3 Proteinaufreinigung

3.2.3.1 Expression und Reinigung der D-HicDH

3.2.3.1.1 Expression

Die Proteinexpression erfolgt in 1 l SR/Amp-Medium, angeimpft mit dem Pellet einer dichten 10 ml LB/Amp-Kultur (siehe 3.2.2.1). Die Induktion zwecks Proteinexpression erfolgt bei einer Bakteriendichte OD_{600} von 0.5-0.7 durch einen Temperatursprung von 30°C (Bakterienanzuchttemperatur) auf 42°C der zu einer Dissoziation des thermolabilen Repressors vom Promotor führt. 4-5 h nach dieser Induktion werden die Zellen 30 min bei 4°C und 4500 rpm abzentrifugiert und bei -70°C eingefroren. Man erhält dabei ca. 7 g Zellen pro Liter Kulturvolumen (Feuchtgewicht).

3.2.3.1.2 Zellyse und Reinigung der *Inclusion Bodies*

Das Zellpellet wird in 60 ml Lösung A/B (20 mM Kaliumphosphat, 10 mM EDTA, 0.1 % Natriumcholat, pH 7.4) resuspendiert. Zweimal wird diese Zellsuspension jeweils bei 900 psi in der French Press aufgeschlossen. Anschließend wird die Lösung stufenweise zur Reinigung der *Inclusion Bodies* zentrifugiert. Das Rohlysat wird 15 min bei 12000 g zentrifugiert, der Überstand A/B abgenommen, das Pellet in 60 ml Lösung C (20 mM Kaliumphosphat, 0.5 M NaCl, 1 % Natriumcholat, pH 7.4) resuspendiert. Es wird wieder 15 min bei 12000 g zentrifugiert, der Überstand C abgenommen, das Pellet in 60 ml Lösung D (4.5 M Harnstoff, 5 mM DTT) resuspendiert, wieder zentrifugiert (s.o.), der Überstand D verworfen und das Pellet in Lösung E (8 M Harnstoff, 5 mM DTT) resuspendiert. Man läßt 1 h bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schwenken inkubieren und zentrifugiert dann wieder 15 min bei 12000 g und 20°C. Der Überstand der letzten Zentrifugation wird vereinigt und über Nacht gegen Lösung F (20 mM Natriumphosphat, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7.4) bei 4°C dialysiert. Das Dialysat wird 30 min bei 15000 g zentrifugiert und der klare Überstand mit der Anionenaustauschersäule Mono Q HR 10/10 der Firma Pharmacia Biotech aufgetrennt. Dabei wird eine 20 mM Tris/HCl pH 7.4, 1 mM DTT Lösung mit einem 0-0.4 M NaCl-Gradienten verwendet. Die renaturierte D-HicDH bindet nur recht schwach an diese Säule und eluiert bei ca. 0.12 M NaCl. Nach Vereinigen der Fraktionen und Umpuffern in Centriprep-30 Röhrchen der Firma Millipore bei 3000 g und 10°C kann das Protein für weitere Charakterisierungen verwendet werden.

3.2.3.2 Reinigung von Phytochrom

Die Phytochromfragmente werden als Zellpellets nach der Expression in *Hansenula polymorpha* (65 kDa) bzw. *Pichia pastoris* (59 kDa) zur Verfügung gestellt. Bedingungen zur Proteinexpression und verwendete Plasmide befinden sich in Rajek (1999). Die Aufreinigung dieser Proteine erfolgte am Max-Planck-Institut für Strahlenchemie in Mülheim an der Ruhr.

3.2.3.2.1 Zellyse

10 g Hefezellenpellet werden mit 10 ml 2x Aufschlußpuffer (100 mM Tris/HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 10 % Glycerin) resuspendiert, jeweils mit 10 µl Pefabloc (200 µM) und β-Mercaptoethanol versetzt und mit einem Ultra-Turrax (T25-Homogenisator, Jahnke & Kunkel) unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff bei ca. 15000 rpm lysiert. Die Zelltrümmer werden bei 45000 rpm und 4°C für 40 min in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Das Phytochrom-Apoprotein befindet sich im Überstand.

3.2.3.2.2 Rekonstitution Apophytochrom und Chromophor

Der Phytochrom Überstand wird mit 1 M Tris auf pH 7.5 eingestellt. Dies ist wichtig für den folgenden Aufreinigungsschritt über die Ni-Säule und die Stabilität des Proteins. Das Apoprotein wird mit in DMSO gelöstem Chromophor (PCB, hergestellt am MPI in Mülheim) bis zur Sättigung rekombiniert. Die Kontrolle erfolgt am Photometer mittels Differenzbildung aus Spektren der mit dunkelrotem (P_r) und mit hellrotem (P_{fr}) Licht bestrahlten Formen.

3.2.3.2.3 Affinitätschromatographie

Da beide Phytochromfragmente C-terminal einen (His)₆-Tag, eine Sequenz von sechs aufeinanderfolgenden Histidinen, besitzen, kann man sie leicht an eine Nickelchelatsäule binden. Das gewählte Säulenmaterial ist das TALON *Metal Affinity Resin* von der Firma Clontech. Nach dreimaligem Waschen des Säulenmaterials mit der Säulenäquillibrierungs-Lösung (50 mol Tris pH 7.5, 100 mol NaCl ± 5% Glycerin) wird es zu der Holoproteinlösung gegeben (1 ml/2 mg Phytochrom) und lichtgeschützt 20 min bei RT vorsichtig geschwenkt, um eine optimale Bindung des Proteins an das Säulenmaterial zu ermöglichen. Nachdem sich das

Säulenmaterial nach weiteren 15 min etwas abgesetzt hat, dekantiert man den Überstand vorsichtig ab und verteilt den Rückstand gleichmäßig auf mehrere kleine Säulen (1-2 ml / Säule). Jede Säule wird mit 2 ml Äquilibrierungspuffer und anschließend mit 4 ml Waschlösung (50 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM Imidazol) gewaschen. So werden unspezifische Proteinbindungen an die Säule gelöst. Mit 4 ml 50 mM Tris pH 7.5, 50 mM Imidazol wird das Protein mit (His)₆-Tag von der Säule eluiert (Mozley *et al.*, 1997).

3.2.3.2.4 Ionenaustauschchromatographie

Das eluierte Phytochrom in der Imidazolösung wird umgehend auf eine voräquilibrierte (20 mM Tris pH 8.0, 1 mM DTT) Anionenaustauschersäule Mono Q HR 10/10 von Amersham Pharmacia Biotech aufgetragen. Bei einer Flußgeschwindigkeit von 1 ml/min bei 4°C wird sauberes Holoprotein bei etwa 0.15 M NaCl von der Säule eluiert. Erst bei hohen Salzkonzentrationen (2 M NaCl) eluiert fest an der Säule gebundenes Apoprotein. Die sauberen Holoproteinfraktionen werden vereinigt und in Ultrafree-15-Röhrchen bei 3000 g und 4°C umgepuffert (20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM NaN₃) und aufkonzentriert. Die weitere Lagerung des gereinigten Phytochroms erfolgt bei 4°C unter Lichtausschluß.

3.2.4 Charakterisierung/Reinheit von Proteinen

3.2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Bei der Proteinaufreinigung erfolgt die Konzentrationsbestimmung nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Das benötigte Farbreagenz vertreibt die Firma BioRad. Beim Mikroassay-Ansatz werden Proteinkonzentrationen von 1-20 µg/ml Protein nachgewiesen. Hierzu werden 800 µl Proteinlösung mit 200 µl Farbreagenz gemischt und nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur die Extinktion der Lösung bei 595 nm spektralphotometrisch gemessen. Als Nullwert dient eine Lösung aus 800 µl Wasser und 200 µl Farbreagenz. Anhand einer Eichkurve, die mit bekannten BSA-Konzentrationen erstellt wurde, läßt sich die Proteinkonzentration der gemessenen Lösung ablesen.

Die Konzentration der gereinigten Proteinproben wird spektroskopisch durch Absorptionsmessung der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm bestimmt. Als Nullwert dient die Proteinpufferlösung. Die molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ_{mol}) werden aus der

Aminosäurezusammensetzung nach Gill und von Hippel (1989) ermittelt.

$$\epsilon_{\text{mol}} = a \cdot \epsilon_{\text{Tyr}} + b \cdot \epsilon_{\text{Trp}} + c \cdot \epsilon_{\text{Cys}}$$

mit: a, b, c Anzahl der jeweiligen Residuen in der Sequenz

ϵ_{Tyr} , ϵ_{Trp} , ϵ_{Cys} molare Extinktionskoeffizienten der jeweiligen Aminosäuren bei 280 nm

$$\epsilon_{\text{Tyr}} = 1280 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}; \epsilon_{\text{Trp}} = 5690 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}; \epsilon_{\text{Cys}} = 120 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Der Extinktionskoeffizient von Phenylalanin ist bei 280 nm vernachlässigbar (Mach *et al.*, 1992). Die Proteinkonzentration erhält man nach folgender Gleichung:

$$C = \frac{E_{280} \cdot M_w}{\epsilon_{\text{mol}}} = \frac{E_{280}}{\epsilon_k} \quad [\text{mg/ml}]$$

M_w Molekulargewicht des Proteins

ϵ_k Proteinspezifische Konstante ($\epsilon_k = M_w / \epsilon_{\text{mol}}$)

ϵ_k kann mit Hilfe eines Programms berechnet werden, welches sich unter folgender Internetseite findet:

http://www.up.univ-mrs.fr/~wabim/d_abim/compo-p.html

Die Proteinkonzentration des Phytochroms wurde zusätzlich noch aus der Differenz seiner P_r - und P_{fr} -Absorptionsspektren unter Verwendung des molekularen Extinktionskoeffizienten bei 667 nm ($132\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) berechnet. Details zu dieser Art der Bestimmung finden sich in Kapitel 3.2.4.4.3.

3.2.4.2 Gelelektrophorese

Alle gelelektrophoretischen Proteinauftrennungen werden mit dem PHAST-System und diversem Zubehör (Gradientengele, Pufferstreifen, Probenkämme, Marker) der Firma Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt.

3.2.4.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen erfolgt nach dem Prinzip des Siebeffekts, wobei ihre relative Mobilität linear mit dem Logarithmus ihrer molaren Masse korreliert.

1 µl (0.3 µl) einer ca. 0.1 mg/ml Proteinprobe, 5:1 versetzt mit SDS-Denaturierungspuffer (10 % (w/v) SDS, 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 0.04 % Bromphenolblau, 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol, pH 8.0), wird 10 min bei 95°C inkubiert mit anschließender scharfer Zentrifugation und mit Probenkammern 8/1 (12/0.3) auf ein 8-25 % PHAST-Gradientengel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt mit SDS-Pufferstreifen nach dem Pharmacia *Separation Technique File No 110*. Als Proteinmarker werden der *Low Molecular Weight*-Standard (14.4, 20.1, 30, 43, 67, 94 kDa) und die Standardmischung IV (Cytochrom C 12.4 kDa, Myoglobin 17 kDa, Carboanhydrase 30 kDa (Doppelbande), Ovalbumin 42.7 kDa, Albumin 66.3 kDa, Ovotransferin 78 kDa) von Pharmacia verwendet.

3.2.4.2.2 Natives Gel

1 µl einer 0.1 - 0.3 mg/ml nativen Proteinprobe wird mit einem Probekamm auf ein 8-25 % PHAST-Gradientengel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt mit nativen Pufferstreifen nach dem Pharmacia *Separation Technique File No 120*. Es wird kein Standard aufgetragen, da die Wanderung des Proteins im Gel von der Größe und Ladung des Proteins abhängt.

3.2.4.2.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

1 µl (0.3 µl) einer ca. 0.1 mg/ml Proteinprobe in Wasser wird mit einem Probenkamm 8/1 (12/0.3) auf ein PHAST-GEL IEF pH 5-8 in der Mitte des Gels (ca. pH 6.5) aufgetragen. Als Proteinmarker dient das *IEF-high-pI-Kit* von Pharmacia (pI: 5.20, 5.85, 6.55, 6.85, 7.35, 8.15, 8.45, 8.65, 9.30 und 10.25). Die Auftrennung erfolgt nach dem Pharmacia *Separation Technique File No 100*.

3.2.4.2.4 Titrationskurve

Zur Analyse der Proteinladungsverteilung wurde eine elektrophoretische Titrationskurve aufgenommen. Hierzu wird zunächst eine IEF generiert, gefolgt von einer Elektrophorese senkrecht dazu. Ein Proteinfilm (0.1 mg/ml) wird entlang des pH-Gradienten mit einem Kamm in der Mitte des Gels aufgetragen. Die Proteine werden je nach dem vorliegenden pH-Wert bzw. pI positiv oder negativ geladen und wandern entsprechend im elektrischen Feld. Die Auftrennung erfolgt nach dem Pharmacia *Seperation Technique File No 100*.

3.2.4.2.5 Entwicklung von PHAST-Gelen

Mit einer sehr sensitiven Silberfärbung werden die Proteinbanden sichtbar gemacht. Die verwendete Methode ist modifiziert nach Butcher und Tomkins (1985) und dem Pharmacia *Seperation Technique File No 210*.

Verwendete Lösungen

Fix	20 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA)
Wash1	10 % (v/v) Ethanol, 5 % Essigsäure (v/v)
Wash2	MQ Wasser
Wash3	50 % (v/v) Ethanol, 10 % Essigsäure (v/v)
Sens	1.2 % (v/v) Glutaraldehydlösung
Sens IEF	8.3 % (v/v) Glutaraldehydlösung
High Sens Fix	0.5 % (v/v) Glutaraldehydlösung, 28.5 % (v/v) Ethanol, 1.5 % (v/v) Isopropanol, 0.3 % (w/v) Natriumacetat, 0.065 % (w/v) Natriumthiosulfat
Stain	0.4 % (w/v) Silbernitrat
Stain IEF	0.5 % (w/v) Silbernitrat
Developer	2.5 % (w/v) Natriumcarbonat, 0.015 % (v/v) Formaldehydlösung
Reducer	50 mM EDTA pH 8.0
Preserver	5 % (v/v) Glycerin, 1 mM NaN ₃
Preserver IEF	5 % (v/v) Essigsäure

Entwicklungsmethoden*High Sensitive SDS*

Schritt	Lösung	Zeit [min]	T [°C]
1	Wash1	2	50
2	Wash1	4	50
3	High Sens Fix	6	50
4	Wash1	3	50
5	Wash1	5	50
6	Wash2	2	50
7	Wash2	2	50
8	Stain	6.5	40
9	Wash2	0.5	30
10	Wash2	0.5	30
11	Developer	0.5	30
12	Developer	4	30
13	Reducer	2	30
14	Preserver	5	50

High Sensitive Nativ

Schritt	Lösung	Zeit [min]	T [°C]
1	Fix	5	20
2	Wash3	2	50
3	Wash1	2	50
4	Wash1	4	50
5	Sens	6	50
6	Wash1	3	50
7	Wash1	5	50
8	Wash2	2	50
9	Wash2	2	50
10	Stain	10	40
11	Wash2	0.5	30
12	Wash2	0.5	30
13	Developer	1	30
14	Developer	5	30
15	Reducer	2	30
16	Preserver	5	50

IEF

Schritt	Lösung	Zeit [min]	T [°C]
1	Fix	5	20
2	Wash3	2	50
3	Wash1	2	50
4	Wash1	4	50
5	Sens IEF	6	50
6	Wash1	3	50
7	Wash1	5	50
8	Wash2	2	50
9	Wash2	2	50
10	Stain IEF	10	40
11	Wash2	0.5	30
12	Wash2	0.5	30
13	Developer	0.5	30
14	Developer	4	30
15	Preserver IEF	5	50

3.2.4.3 Größenbestimmung von Proteinen

3.2.4.3.1 Massenspektren

Es werden zwei verschiedene Methoden zur Massenbestimmung angewendet: die MALDI-TOF-MS und die ESI-MS. Bei der MALDI-Methode (*matrix assisted laser desorption*, Karas und Hillenkamp, 1988) werden makromolekulare Substanzen mit einem großen Überschuß an Matrixteilchen kokristallisiert. Die Matrixteilchen werden durch die Einstrahlung eines Laserimpulses verdampft, wobei die Makromoleküle mit in die Gasphase gerissen werden. Positive angelagerte Matrixmoleküle ionisieren die Makromoleküle. Nach Beschleunigung in einem elektrischen Feld erfolgt die Detektion in einem Flugzeitanalysator (TOF: *time of flight*). Bei der Elektrosprayionisation (ESI, Fenn *et al.*, 1989) wird die Proteinlösung durch eine positiv geladene Metallkapillare geleitet und beim Austritt aus der Kapillare zerstäubt. Die dabei entstehenden Tröpfchen verlieren kontinuierlich Lösungsmittel, was zu einem Ansteigen der Oberflächenladung führt, und teilen sich nach Erreichen der Grenzladungsdichte an der Tropfenoberfläche (Rayleigh-Limit). Nach mehrmaliger Wiederholung dieses Prozesses erhält man lösungsmittelfreie Molekülonen, die in einem Quadrupolanalysator getrennt und detektiert werden.

Die Proteinproben werden in MQ-Wasser umgepuffert und auf ca. 5 mg/ml aufkonzentriert. Für die MALDI-Analyse werden 5 µl dieser Proteinprobe mit 15 µl 0.1 % Trifluoressigsäure (TFA) und 30 µl Sinapinsäurelösung gemischt. Die Sinapinsäurelösung ist eine Lösung aus 0.1 % TFA in Acetonitril und Wasser im Verhältnis 1:2, in der die Sinapinsäure gesättigt vorliegt. Ein Spot auf dem MALDI-Target wird mit 0.5 µl Lösung von gesättigter Sinapinsäure in Ethanol benetzt. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels werden 0.5 µl Protein/MALDI-Lösung pipettiert. Nach dem Trocknen dieser Lösung wird die Messung gestartet. Als Proteinstandards zur externen Kalibrierung wurden Trypsinogen (23 981.9 Da), Carboanhydrase (29 025.7 Da), Trypsinogen-Dimer (Da), BSA (66 413.0 Da) und BSA-Dimer (Da) verwendet.

Für die ESI-Analyse wird die Proteinprobe mit einer Lösung aus 0.1 % (w/v) Essigsäure in Methanol/Wasser (1:1) auf eine Proteinkonzentration von etwa 0.5 mg/ml verdünnt.

3.2.4.3.2 Gelfiltration

Mit Hilfe der Gelfiltration kann man das Molekulargewicht des nativen Proteins bestimmen. Durch Vergleich mit dem Molekulargewicht des Monomers kann man auf den Aggregationszustand des nativen Proteins schließen.

Die Gelfiltration der D-HicDH erfolgt auf der HiPrep-16/60-Sephacryl-S300-Säule von Pharmacia in 20 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM DTT mit einer Flußrate von 0.4 ml/min und 10°C. 3 ml Lösung mit einer Proteinkonzentration von 8 mg/ml werden aufgetragen.

Die Gelfiltration des Phytochroms wird auf einer Superdex-200-HR-10/30-Säule der Firma Pharmacia bei 10°C und einer Flußrate von 0.3 ml/min durchgeführt. Als Laufmedium dient 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl. Die Eichung der Säule erfolgt mit je 0.1-0.3 mg Dextranblau (ca. 2000 kDa), Ferritin (450 kDa), Katalase (240 kDa), BSA (67 kDa), Ovalbumin (45 kDa) und Lysozym (14 kDa). Die Phytochromlösung hat eine Konzentration von 0.4 mg/ml, 500 µl werden jeweils auf die Säule aufgetragen.

3.2.4.3.3 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Mit der dynamischen Lichtstreuung erhält man Informationen über das Molekulargewicht des nativen Proteins und sein Aggregationsverhalten. Es wird der durchschnittliche translationale Diffusionskoeffizient D_p , der ein Maß für die Homogenität der Probe ist, in Lösung bestimmt. Der hydrodynamische Radius R_H des Proteins läßt sich aus der Stokes-Einstein-Gleichung bestimmen:

$$R_H = \frac{k_B \cdot T}{6 \pi \cdot \eta \cdot D_t}$$

mit	R_H	hydrodynamischer Radius des Proteins
	k_B	Boltzmannkonstante
	T	absolute Temperatur
	η	Viskosität der Lösung (für wäßrige Puffer wird der Wert 1.019 verwendet)
	D_t	translatinaler Diffusionskoeffizient (experimentell bestimmt)

Die Messungen erfolgen am Gerät DynaPro-801 der Firma Protein Solutions. Proteinproben von etwa 1 mg/ml werden zunächst durch 0.2, 0.1 oder 0.02 μm Porenfilter (Whatman) filtriert, um die Proben von festen Partikelrückständen oder bereits aggregiertem Protein zu befreien. 20 μl der filtrierten Proteinlösung werden luftblasenfrei in die Messzelle gefüllt. Etwa 20 Messungen erfolgen pro Probe bei Raumtemperatur.

Die Auswertung der Messungen erfolgt mit dem Programm Dynamics V 3.0 der Firma Protein Solution. Zur Bestimmung des Molekulargewichts kann man zwischen zwei Molekülmodellen wählen. Das eine Molekülmodell geht von einer globulären, kugelförmigen Proteingestalt aus. Das Molekulargewicht wird dabei empirisch aus dem hydrodynamischen Radius R_H bestimmt. Das andere Modell (*Volume-Shape-Hydration*) beachtet je nach Größenbereich des Proteins auch das partielle spezifische Volumen und die Reibung. Für beide Modelle sind zahlreiche experimentell bestimmte Werte dem Programm vorgegeben worden (Santos und Castanho, 1996). Nach Auswahl des Proteinmodells kann man zwischen einer monomodalen und bimodalen Verteilung jedes Meßwertes wählen. So können auch verschiedene Moleküle (polydisperse Verteilungen) in der Probe detektiert werden.

Weitere Informationen befinden sich unter: <http://www.protein-solutions.com>

3.2.4.4 Bestimmung von Proteinaktivitäten

3.2.4.4.1 Bestimmung der Enzymaktivität von D-HicDH und deren Mutanten

Die Enzymaktivitäten werden mit einem optischen Test bestimmt. Dazu werden 1 ml 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7.0, 40 μl Substratlösung (0.25 mM - 2.0 M in Wasser) und 20 μl NADH-Lösung (10 mg/ml) in einer Quarzküvette gemischt, die Extinktion 1 min mit einem Spektralphotometer kontrolliert, und die Reaktion dann mit 20 μl Enzymlösung (in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0, 1 mM DTT) gestartet. Nach sorgfältigem Mischen der Lösung wird die Abnahme der Absorption bei 340 nm (1 cm Lichtweg, 30°C), bedingt durch den Umsatz von NADH zu NAD^+ , gemessen. Die Enzymkonzentration muß dabei so gewählt werden, dass die Extinktionsänderung innerhalb 1 min 0.15 OD_{340} nicht überschreitet. Im Abstand von 5 Sekunden werden die ΔE_{340} -Meßwerte registriert. Nach der Reaktion wird die Steigung im Auswerteprogramm Swift/*Reaction-Kinetics* manuell entlang des linearen Bereiches korrigiert. Von jedem Substrat werden mindestens 8 verschiedene Konzentrationen vermessen. Diese sind abhängig von der Art des Substrates, seiner Löslichkeit in Wasser und

der Aktivität des jeweiligen Enzyms. Jeder Meßwert wird mindestens drei mal bestimmt. Die Aktivität wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{(V_{\text{Test}} + V_{\text{Enzym}}) \cdot f \cdot \Delta E_{340}}{\epsilon_{\text{NAD}} \cdot V_{\text{Enzym}}} = \frac{1080 \mu\text{l} \cdot f \cdot \Delta E_{340}}{6.22 \cdot 20 \mu\text{l}} = 8.682 \cdot f \cdot \Delta E_{340} \quad \left[\frac{\text{U}}{\text{ml}} \right]$$

V_{Test}	Testvolumen (1060 μl)
V_{Enzym}	Enzymvolumen (20 μl)
f	Verdünnungsfaktor
ΔE_{340}	Extinktionsänderung bei 340 nm
ϵ_{NAD}	molarer Extinktionskoeffizient für NADH/NAD ⁺ (6.22 M ⁻¹ cm ⁻¹)

1 Unit [U] ist definiert als die Enzymmenge, die 1 μmol Substrat unter Verbrauch von 1 μmol NADH in einer Minute bei 30°C umsetzt.

3.2.4.4.2 Bestimmung kinetischer Parameter

Die K_M - und v_{max} -Werte für die D-HicDH und deren Mutanten werden aus den experimentell ermittelten Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen mit dem Programm GraFit (Leatherbarrow, 1998) durch nicht-lineare Regressionsrechnung ermittelt. Es wird die Hill-Gleichung für allosterische Enzyme zur Berechnung eingesetzt:

$$v = \frac{v_{\text{max}} \cdot [S]^n}{K_M + [S]^n}$$

n	Hill-Koeffizient, Zahl der gebundenen Substratmoleküle pro aktives Zentrum
v	Reaktionsgeschwindigkeit
v_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
K_M	Michaelis-Menten-Konstante, Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit halbmaximal ist.

Für eine reine Michaelis-Menten-Kinetik wird der Hill-Koeffizient gleich 1. Die Messpunkte werden mit Kurven verschiedener Hill-Koeffizienten überlagert. Aus der jeweils am besten mit den Messwerten übereinstimmenden Kurve werden die kinetischen Parameter ermittelt. Für die nicht-lineare Regressionsrechnung werden Anfangswerte für v_{max} und K_M benötigt. Diese erhält

man aus den Messwerten nach Lineweaver-Burk. Im Verlauf der Rechnung werden diese Parameter dann verfeinert.

Mit Hilfe der K_M - und v_{\max} -Werte wird die Wechselzahl k_{cat} ermittelt. Sie gibt die Anzahl der Reaktionen an, die jedes aktive Zentrum pro Zeiteinheit (i. a. Sekunde) katalysiert.

$$k_{\text{cat}} = \frac{v_{\max} \cdot M_w}{[E_0] \cdot 60} \quad [\text{s}^{-1}]$$

M_w Molekulargewicht (Monomer)

$[E_0]$ Enzymkonzentration

Das Verhältnis k_{cat}/K_M ist ein Maß für die katalytische Effektivität des Enzyms bzgl. des jeweiligen Substrates.

3.2.4.4.3 Differenzspektren von Phytochrom

Aus dem Kurvenverlauf der P_r - und P_{fr} -Absorptionsspektren, bzw. aus ihrem Differenzspektrum (Abb. 10) kann man auf das Vorhandensein von intaktem photoreversiblen Phytochrom schließen. Außerdem wird die Proteinkonzentration unter Berücksichtigung des Extinktionskoeffizienten des Chromophors aus dem Differenzspektrum nach folgender Gleichung bestimmt: $(A_{654} + |A_{719}|):2 = C_{\text{Phytochrom}}$.

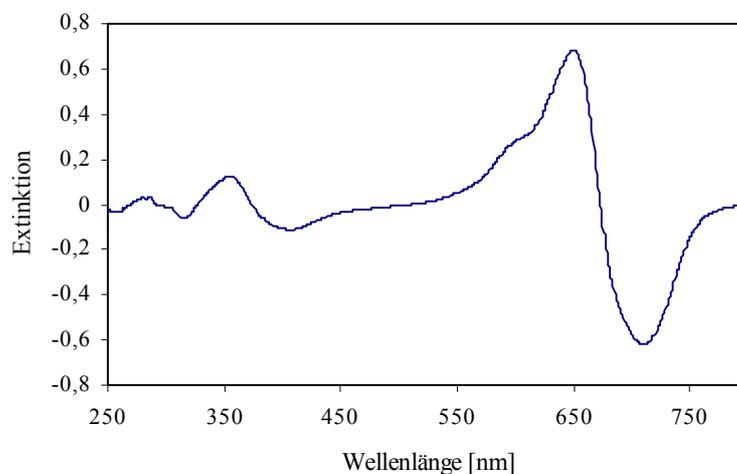


Abb. 10: Differenzspektrum des 59 kDa Phytochrom A-Fragments aus Hafer mit dem Chromophor PCB.

3.2.4.5 Schmelzpunktbestimmung

Der Schmelzpunkt eines Proteins liefert Aufschluß über seine Stabilität. An diesem Punkt geht die geordnete dreidimensionale Struktur des Proteins durch Denaturierung verloren, das Protein ist dann nicht mehr aktiv.

3.2.4.5.1 *Differential Scanning Microcalorimetry (DSC)*

Die Bestimmung des Schmelzpunktes erfolgte kalorimetrisch mit DSC. Mit dieser Methode kann man direkt die Wärmekapazität eines Proteins in Lösung in Abhängigkeit von der Temperatur messen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt darin, dass sie keine Entfaltungsmodelle oder andere Voraussetzungen benötigt (Pfeil, 1998). Durch Extrapolation der Wärmekapazitätskurven vor und nach dem Übergang erhält man die Änderung der Wärmekapazität (ΔC_p). Die Enthalpieänderung (ΔH) wird aus der Fläche unter dem Peak bestimmt. Gleichzeitig kann auch die van't Hoffsche Enthalpieänderung (ΔH_v) aus der Peakform berechnet werden (je spitzer der Peak, desto größer wird ΔH_v). Dabei geht man von einem 2-Stufen-Übergang aus. Bei multiplen Übergängen erhält jeder Übergang seinen eigenen kompletten Parametersatz.

Das Verhältnis von ΔH zu ΔH_v kann Informationen über den Entfaltungsmechanismus liefern. Ist das Verhältnis größer als 1, dann verhält sich die hitzeinduzierte Denaturierung eines Proteins nicht nach einem 2-Stufen-Mechanismus (Tanford, 1968). Wenn ein Protein aus zwei identischen Domänen besteht, die sich mit dem gleichen T_m und ΔH , aber unabhängig voneinander entfalten, dann nimmt das Verhältnis der beiden Entfaltungsenthalpien den Wert 2.0 an. Hat das Protein nur eine Entfaltungsdomäne, so hat das Verhältnis den Wert 1.0. Wenn das Protein ein Dimer ist und nur einen gekoppelten Entfaltungsmechanismus zeigt, wird das Verhältnis 0.5 (bei Angabe des Monomergewichts bei der Normalisierung der Proteinkonzentration).

Die Messung erfolgt an einem VP-DSC Mikrokalorimeter von MicroCal in 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 gegen Wasser als Referenz. Die Proteinkonzentration wird über den aus der Sequenz berechneten molaren Extinktionskoeffizienten bei 280 nm bestimmt. Das Zellvolumen beträgt 0.5106 ml und die Aufheizrate 1°C/min. Eine Basislinienkorrektur wird durch Subtraktion eines reinen Pufferspektrums durchgeführt.

Die Auswertung der Schmelzkurve erfolgt mit dem *non-2-state* Modell der *non-linear least-square* Methode von Levenberg/Marquardt.

Ist eine Mutante thermostabiler als der Wildtyp, so hat sie einen höheren Schmelzpunkt.

3.2.4.5.2 Schmelzpunktbestimmung mit Circular-Dichroismus (CD)

Bei der Schmelzpunktanalyse misst man das CD-Signal (s. u.) einer Proteinlösung bei einer Wellenlänge. Dabei nutzt man meist die Auflösung der α -Helix-Struktur des Proteins bei 222 nm (α/β -Proteine). Bei $\alpha+\beta$ -Proteinen kann man auch bei 208 nm messen (Beck *et al.*, 1996). Die Existenz eines isodichroen Punktes zeigt, dass es sich bei einem solchen Übergang um einen direkten Übergang zwischen zwei Zuständen handelt.

Die Messungen erfolgen in 5 mM Kaliumphosphat-Puffer. Der pH-Wert liegt bei der D-HicDH bei 7.0 und beim Phytochrom bei 8.0. Die Proteinkonzentration beträgt jeweils 0.5 mg/ml. Es werden 600 μ l Probe in einer 2 mm breiten Küvette vermessen. Das CD-Signal wird bei 222 nm (D-HicDH) bzw. 207 nm (Phytochrom) verfolgt.

Folgende Parameter werden eingestellt:

Temperaturbereich:	20-100°C	Wellenlängenbereich:	250 -200 nm
Temperaturgradient:	40°C/h	Geschwindigkeit:	50 nm/min
Auflösung:	0.1°C	Auflösung:	0.1 nm
Empfindlichkeit:	50 mdeg	Empfindlichkeit:	50 mdeg
Bandweite:	1.0 nm		
Akkumulationen:	1	Akkumulationen:	5
Stickstofffluß:	5 l/min		

Den Schmelzpunkt erhält man aus dem Maximum der ersten Ableitung des CD-Spektrums.

3.2.4.6 Sekundärstrukturanalyse

3.2.4.6.1 Sekundärstrukturvorhersage

Mittlerweile gibt es eine Reihe von Programmen, die die Sekundärstruktur von Proteinen aus ihrer Sequenz vorhersagen. Grundlage für diese Programme ist die statistische Auswertung von experimentell bestimmten Röntgen- und NMR-Strukturen bzgl. ihrer Sekundärstrukturelemente. In dieser Arbeit werden die Programme DPM (Deléage und Roux, 1987), DSC (King und Sternberg, 1996), GOR IV (Garnier *et al.*, 1996), HNNC (Guermeur, 1997), PHD (Rost und Sander, 1993), PREDATOR (Frishman und Argos, 1996), SIMPA 96 (Levin, 1997), SOPMA (Geourjon und Deléage, 1995), MLRC (Guermeur *et al.*, 1999) und Secondary Consensus Prediction (Deléage *et al.*, 1997) verwendet. Die Beschreibung der Programme und Details zur Berechnung finden sich auf folgender Internetseite:

http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_server.html

3.2.4.6.2 Circular-Dichroismus (CD)

Experimentell kann man den Gehalt der einzelnen Sekundärstrukturelemente eines Proteins mit Hilfe der CD-Spektroskopie bestimmen. Dafür werden Spektren im fernen UV (250-180 nm) aufgenommen. Bei Messungen im UV/VIS-Bereich kann man Informationen über unterschiedliche Anordnungen aromatischer Aminosäuren im Protein erhalten.

Das unterschiedlich starke Absorptionsvermögen des Proteins von rechts und links zirkular polarisiertem Licht wird gemessen und dann mit folgender Gleichung auf die konzentrationsunabhängige spezifische Elliptizität Θ umgerechnet:

$$\Theta = \frac{\theta \cdot \overline{M_{AS}}}{C_{\text{Protein}} \cdot l} \quad [\Theta] = \frac{\text{deg} \cdot \text{cm}^2}{\text{mol}}$$

mit	Θ	Elliptizität
	M_{AS}	mittlere molare Masse der Aminosäuren, meist 115 g/mol
	C_{protein}	Proteinkonzentration
	l	Weglänge in der Küvettenlänge

3.2.4.6.2.1 UV-Bereich

Die Amidgruppe der Peptidbindung dient in diesem Wellenlängenbereich als Chromophor. Es gibt hier zwei Übergänge: $n \rightarrow \pi^*$ ($\epsilon = 20 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und $\lambda_{\text{max}} = 220 \text{ nm}$) und $\pi \rightarrow \pi^*$ ($\epsilon = 7000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und $\lambda_{\text{max}} = 195 \text{ nm}$). Die für die CD-Aktivität notwendige Chiralität wird durch das benachbarte chirale Zentrum am C_{α} -Atom induziert. Die verschiedenen Sekundärstrukturen liefern dabei unterschiedliche UV-CD-Spektren.

Die Messungen erfolgen in 5 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8.0 in einer 1 mm breiten Küvette. Die Proteinkonzentration beträgt 0.1 mg/ml. Folgende Parameter werden eingestellt:

Wellenlängenbereich:	250-185 nm
Geschwindigkeit:	50 nm/min
Auflösung:	0.1 nm
Empfindlichkeit:	50 mdeg
Bandweite:	1.0 nm
Akkumulationen:	10
Temperatur:	20°C
Stickstofffluß:	10 l/min

Nach Abzug des Pufferspektrums und der Umrechnung aller Meßwerte in spezifische Elliptizitäten erfolgt die weitere Auswertung der Spektren. Mit verschiedenen Programmen kann nun der Sekundärstrukturgehalt eines Proteins aus CD-Spektren bestimmt werden (Greenfield, 1996). In dieser Arbeit wurden die Programme CONTIN (Provencher und Glöckner, 1981), K2D (Andrade *et al.*, 1993) und SELCON (Sreerama und Woody, 1993) verwendet.

3.2.4.6.2.2 VIS-Bereich

Bei Proteinen mit einem kovalent gebundenen chiralen Chromophor, wie das Phytochrom, liefern Messungen im Chromophor-absorbierenden-Spektralbereich (250-800 nm) Hinweise auf unterschiedliche Chromophoranordnungen und -umgebungen.

Die Messungen erfolgen in 5 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 8.0 in einer 10 mm breiten Küvette. Die Proteinkonzentration beträgt 0.1 mg/ml. Folgende Parameter werden eingestellt:

Wellenlängenbereich:	250-800 nm
Geschwindigkeit:	100 nm/min
Auflösung:	0.5 nm
Empfindlichkeit:	50 mdeg
Bandweite:	1.0 nm
Akkumulationen:	10
Temperatur:	20°C
Stickstofffluß:	5 l/min

Nach Messung der Phytochrom P_r-Form wird durch Belichtung mit hellrotem Licht in der Küvette die P_{fr}-Form hergestellt und direkt vermessen.

3.2.5 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

3.2.5.1 Kristallisation von Proteinen

Die Kristallisation eines Proteins ist ein Vorgang, der *in vivo* im allgemeinen nicht auftritt. Die Bedingungen, unter denen ein Protein kristallisiert, müssen empirisch ermittelt werden und können nicht vorhergesagt werden.

Die Bildung von Proteinkristallen wird von einer Reihe von Faktoren beeinflusst. Die Proteinlösung sollte hochkonzentriert und dabei homogen (frei von Verunreinigungen und Proteinaggregaten) vorliegen. Die Art, Polarität und Konzentration des Fällungsmittels, sowie die Ionenstärke und der pH des zugesetzten Puffers sind von Bedeutung. Zusätze wie Additive, Detergenzien und spezifische Bindungspartner (z. B. Substrate, Inhibitoren und Metallionen) üben Einfluß auf die Kristallisation aus. Darüber hinaus spielen auch die Temperatur oder die Kristallisationstechnik eine wichtige Rolle. Durch Variation dieser Parameter wird versucht, Proteine zu kristallisieren und im Anschluss daran die Kristallformen zu optimieren. Denn regelmäßige und kompakte Proteineinkristalle sind eine Voraussetzung für die röntgenkristallographische Strukturlösung von Proteinen (McPherson, 1999).

Die Kristallisation der Proteine erfolgt mit der Dampfdiffusionstechnik. Sowohl die Methode des sitzenden als auch des hängenden Tropfens wird angewendet (Abb. 11).

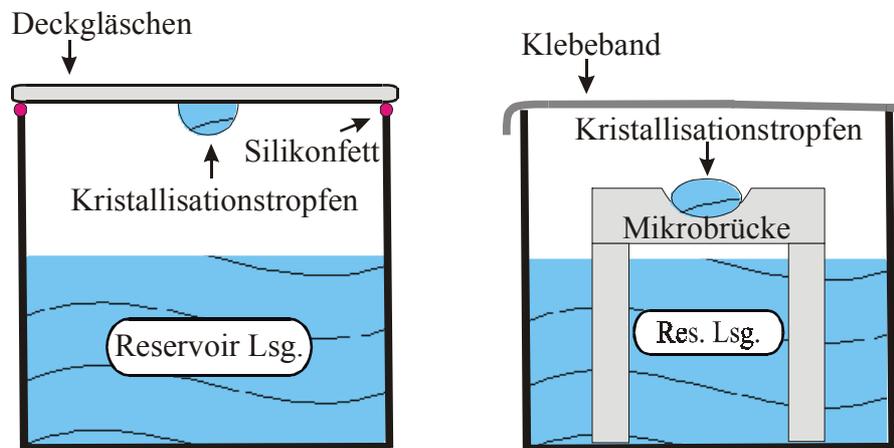


Abb. 11: Kristallisation von Proteinen nach der Methode des hängenden (links) und des sitzenden Tropfens (rechts).

In Vertiefungen von Linbro-Platten (Firma Hampton Research) werden von Hand oder mit einem Roboter unter Verwendung des Programms PH-SCREEN (Schröder, 1997) die Reservoirlösungen pipettiert. Die Kristallisationstropfen bestehen aus Proteinlösung und Reservoirlösung, und enthalten gegebenenfalls zusätzlich Detergenzien und/oder Substratlösungen. Nach dem luftdichten Verschließen der einzelnen Kristallisationsansätze mit Deckgläschen oder Klebeband werden die Ansätze lichtgeschützt und erschütterungsfrei gelagert. In regelmäßigen Abständen wird das Aussehen der Kristallisationstropfen unter dem Mikroskop beobachtet und protokolliert.

Eine Proteinprobe unbekanntes Kristallisationsverhaltens, wie das Phytochrom, wird zunächst einem Kristallisations-Screening unterworfen. Bei den Screenings nach Jancarik und Kim (1991) und Cudney *et al.* (1994) werden bislang erfolgreiche Kristallisationsbedingungen von Proteinen mit einer großen Breite an Fällungsmitteln, ihren Konzentrationen und pH-Bereichen an dem neuen Protein getestet. Eine andere Kristallisationstestreihe untersucht die Konzentrations- und pH-Abhängigkeit einzelner Fällungsmittel, wie Ammoniumsulfat, NaCl, Polyethylenglykole (PEG) und 2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD) (McPherson, 1990; Weber, 1991). Von weiteren bei Hampton-Research (<http://www.hamptonresearch.com>) angebotenen Schnelltestscreens werden vereinzelt Lösungen verwendet.

Häufig treten Probleme bei der Kristallkeimbildung auf. Dies kann man umgehen durch Animpfen der Kristallisationstropfen mit Kristall- oder Glassplittern. Sie dienen dann als Keim

für das Kristallwachstum.

Erhält man in einem Proteintropfen Kristalle, können die Kristallisationsbedingungen optimiert werden. Findet man Proteinaggregate vor, so können die Bedingungen entsprechend verändert werden, z.B. durch Herabsetzen der Fällungsmittel- oder Proteinkonzentration, Zugabe von Additiven/Detergenzien oder Erniedrigung der Kristallisationstemperatur.

3.2.5.2 Montieren von Kristallen für Tieftemperaturmessungen

Proteinkristalle sind sehr empfindlich gegenüber Veränderungen in ihrer Umgebung. Stöße, Temperaturänderungen, Störung der Gasphase um den Kristallisationstropfen und Wechsel des Fällungsmittels, z. B. für Tieftemperaturmessungen, können Proteinkristalle bereits zerstören. So muß bei der Extraktion des zu vermessenden Kristalls aus der Kristallisationslösung sehr vorsichtig vorgegangen werden.

Die zu vermessenden D-HicDH-Kristalle werden mit einem *Cryoloop* vorsichtig von der Unterlage gelöst und direkt in die Cryolösung überführt. Die Cryolösung besitzt die gleiche Zusammensetzung wie das Reservoir des Kristalls, jedoch enthält sie zusätzlich noch 25 % Glycerin, NAD^+ und ein Substrat der D-HicDH (2-Ketocaproat bzw. Phenylpyruvat). Cofaktor und Substrat werden pulverförmig bis zur Sättigung hinzugegeben. Nach mehreren Stunden Äquilibration in der Cryolösung wird der Kristall wieder mit einem *Cryoloop* aus der Lösung herausgeholt und direkt auf dem Goniometerkopf der Röntgenanlage im Stickstoff-Cryostrom befestigt. Vor Beginn der Diffraktionsmessung wird der Kristall noch richtig justiert, so dass durch Drehung der Goniometerachse der Kristall in der Strahlebene zu liegen kommt.

3.2.5.3 Röntgendiffraktionsmessung

Die Röntgendiffraktionsmessungen erfolgten bei einer Temperatur von 100 K am Messplatz BW7B/EMBL des DESY (DORIS-Speicherring) in Hamburg. Die Röntgenstrahlung hatte eine Wellenlänge von 0.842 Å. Die Belichtungszeit pro Bild richtete sich nach der Strahlendosis. Für niedrig aufgelöste Datensätze wurde eine Dosis von 1400-1500 eingesetzt, für die hochaufgelösten Datensätze eine Dosis von 4600-4700 verwendet. Während einer Beugungsaufnahme wurde der Proteinkristall um einen Winkel $\Delta\phi$ von 0.5 bzw. 1° gedreht. Die Daten wurden mit einer MAR345 Bildspeicherplatte aufgezeichnet. Der Detektorabstand

variierte zwischen 300 und 400 mm.

3.2.5.4 Auswertung von Beugungsdaten

Für die Prozessierung der Daten wurde das HKL-Paket (Otwinowski und Minor, 1997) verwendet. Die Indizierung (Zuordnung von symmetrieabhängigen Kristallgittern) und Integrierung (Hintergrundrauschen je Reflex subtrahiert und anschließend Reflexbereiche aufsummiert) der Reflexe erfolgten mit DENZO. Für die Skalierung der Einzelbilder zu einem Gesamtdatensatz wurde das Programm SCALEPACK verwendet.

Mit Programmen der CCP4-Sammlung (*Collaborative Computing Project Number 4*; CCP4, 1994) erfolgen die Auswertung der Daten nach der Methode des Molekularen Ersatzes (MR: *Molecular Replacement*). Aus der Raumgruppe, den Gitterkonstanten, dem Molekulargewicht und der Anzahl der Monomere in der asymmetrischen Einheit (ASE) berechnet MATTHEWS_COEF den Matthews-Koeffizienten (Matthews, 1968) und den Lösungsmittelgehalt von Proteinkristallen. SCALEPACK2MTZ und MTZ2VARIABLES konvertieren die Scalepack-Ausgabedateien in die MTZ-, CCP4- und CNS-Datenformate und UNIQUE und FREE_RFAG legen den Anteil der Reflexe am freien R-Wert fest. TRUNCATE rechnet, mit der korrekten Anzahl von Resten in der Asymmetrischen Einheit (ASE), die Reflexintensitäten in Strukturfaktoramplituden um und berechnet den B-Faktor aus einem Wilson-Plot (French und Wilson, 1978). Das Programm AMORE berechnet aus den konvertierten Daten die richtige Orientierung und Position des Suchmodells und LSQKAB dreht und verschiebt das Suchmodell entsprechend der gefundenen Lösung. Als Suchmodell zum Molekularen Ersatz dient die Struktur des selben Proteins in der Raumgruppe P6₃22 (PDB-code: 1DXY). Für den hexagonalen Datensatz wird das Monomer als Suchmodell eingesetzt, beim kubischen Datensatz nur die NAD-Domäne (Aminosäuren 101-300).

Die Kristallpackung wird mit dem Graphikprogramm O (Jones *et al.*, 1991) überprüft.

3.2.5.5 Verfeinerung der Struktur

Die Verfeinerung erfolgt mit CNS 1.0 (*Crystallography and NMR Systems*; Brünger *et al.*, 1998). Vor jeder Verfeinerungsrunde werden zunächst mit dem Programm GENERATE_EASY die Koordinatendateien umformatiert und Topologiedateien generiert. Jeder Datensatz wird einmal auf seine Tendenz zur perfekten oder hemihedralen Verzwilligung mit DETECT_TWINNING (Yeates, 1997) getestet. Unter einer Verzwilligung versteht man die Verwachsung von verschieden orientierten Domänen derselben Struktur, so dass ihre Beugungsgitter im reziproken Raum ganz oder teilweise überlappen (Massa, 1996; Chandra *et al.*, 1999). Ein Symmetrieelement kann den einen Zwillingssteil (Domäne) in den anderen überführen. Da sich der hexagonale Datensatz als Zwillings erwies, wurden für ihn die entsprechenden Inputdateien für hemihedrale Verzwilligung verwendet. Dafür mußten die Testreflexe für den freien R-Wert neu verteilt werden mit MAKE_CV_TWIN.

In Tabelle 6 sind die verwendeten Inputskripte aufgelistet.

Tabelle 6: Inputskripte für die Verfeinerung der beiden Datensätze

	Datensatz P4 ₃ 32	Datensatz P6 ₃ Zwillings
Starre-Körper-Verfeinerung	rigid.inp	-
B-Faktorverfeinerung über ganze Domäne	bdomain.inp	-
Moleküldynamik, Energieminimierung und B-Faktorverfeinerung	refine.inp	-
Moleküldynamik	-	anneal_twin.inp
Energieminimierung	minimize.inp	minimize_twin.inp
B-Faktorverfeinerung	-	bindividual_twin.inp
Einbau von Wassermoleküle in Elektronendichten	water_pick.inp	water_pick_twin.inp
Berechnung von Elektronendichtekarten	model_map.inp	model_map_twin.inp
Optimierung des Gewichtungsfaktors zwischen den Röntgentermen und den geometrischen Vorgaben	optimize_wa.inp	-

Mit QGROUP werden die Besetzungsfaktoren der Substrate im aktiven Zentrum des hexagonalen Datensatzes verfeinert.

Nach der Verfeinerung werden die Torsionswinkel mit PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) überprüft.

Strukturen und Domänen werden in O (Jones *et al.*, 1991) und BRAGI (Schomburg und Reichelt, 1988) übereinander gelegt und mit MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) und RASMOL (Sayle und Milner-White, 1995) abgebildet.

4 Ergebnisse

4.1 D-HicDH und ihre Mutanten

4.1.1 Sequenzierung des Plasmids

Die vollständige DNA-Sequenz (6826 bp) des Plasmids pHL4 (Lerch, 1989) befindet sich im Anhang dieser Arbeit. Die Herkunft und Eigenschaften der wichtigsten Plasmidsegmente sind mit ihren Nukleotidpositionen (Nup) im Folgenden dargestellt:

<u>Nup</u>	<u>Eigenschaften</u>
980 - 267	produziert lambda cIts857, hitzesensitiv
1565 - 2564	produziert D-HicDH (reguliert durch lambda cIts857)
5001	ColE1 ori aus pBR322 (ohne ROP), <i>high copy plasmid</i>
6551 - 5753	bla aus pBR322, Ampicillin-Resistenz

<u>Nup</u>	<u>Herkunft der Plasmidsegmente</u>
1 - 6	SmaI Schnittstelle
7 - 1147	j02459.phg: lambda 36967-38107: PL, cI, PMR
1148 - 1205	x67656.pro1: E.coli oriC 356-413
1205 - 1215	Linker: AvaI, XmaI, SmaI, BstYI
1216 - 1464	j02459.phg: lambda 35715-35467: nutL
1465 - 1505	Linker: ca. 18 Schnittstellen
1506 - 3097	m26929.pro1: <i>L. casei dhd/ddh</i> 363-1948, korrigierte Sequenz
3098 - 6826	j01749.syn: pBR322 188-4359: EcoRV-EcoRI/ApoI
3479	Deletion von 88 bp im Tc-Gen: zerstört Tetracyclin-Resistenz
3479 - 3528	Insertion: Linker: 7 Schnittstellen
3847 - 4079	Insertion: j02451.phg: fd 1657-1425: Terminator
4534	Deletion von 637 bp: zerstört ROP

Abbildung 10 zeigt das Plasmid pHL4.

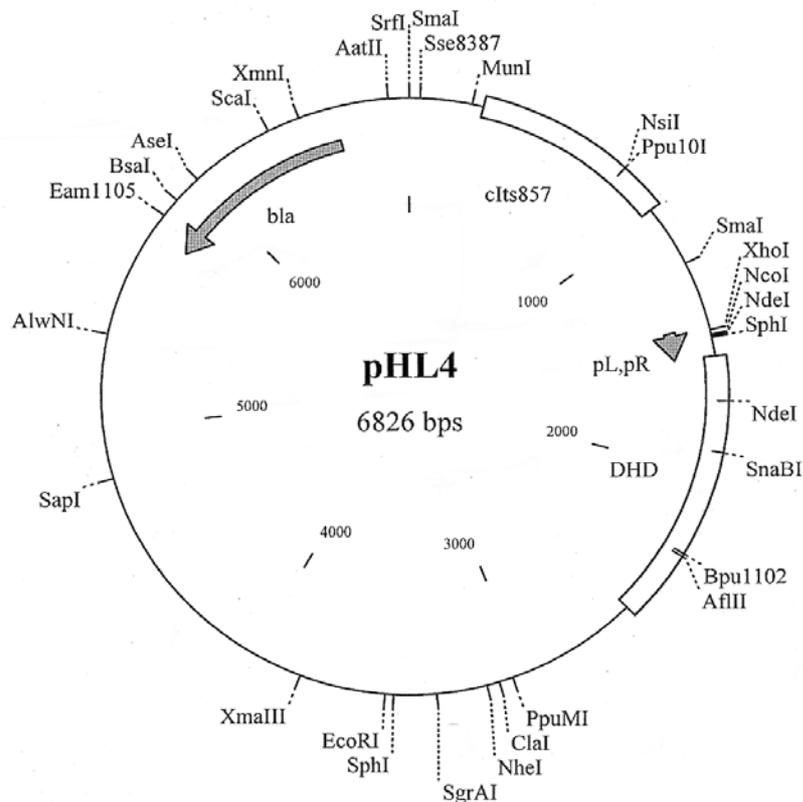


Abb. 10: Plasmid pHL4 mit dem D-HicDH-Gen.

4.1.2 Auswahl von Punktmutanten

4.1.2.1 Punktmutationen im aktiven Zentrum

Zur Auswahl von geeigneten Mutanten wird ein *Strukturalignment* ähnlicher Strukturen mit dem Programm STAMP verwendet. Nach Domänen getrennt erfolgt der Vergleich der Strukturen, der im Anhang abgedruckt ist. In der Einleitung werden bereits die Kriterien für die Aminosäureaustausche beschrieben und in der folgenden Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7: Aminosäureaustausche im aktiven Zentrum

Mutation	Domäne	Ziel (Funktion der Aminosäure?)
L51F	Sustrat-D.	kleinere Substrate? Domänenbewegung?
G78A	Substrat-D.	Bindungsstudie konservierten Restes
Y100F	Verbindung zwischen D.	Substratbindung?
G136 W	NAD-D./Untereinheit-b	kleinere Substrate? (vgl. D-LDH)
E263Q, E263D	NAD-D.	Bindungsstudien
Y298A, Y298R	NAD-D.	geladene/C ₃ -verzweigte Substrate?
M307V, M307Q	NAD-D.	polare/hydrophobe Substrate?

4.1.2.2 Auswahl der Thermostabilitätsmutanten

Durch Austausch einzelner Aminosäuren soll die Thermostabilität des Proteins erhöht werden. Bevorzugte Positionen dieses Aminosäureaustausches werden dabei mit dem von Leven (1999) entwickelten Thermostabilitätsprogramm über Aminosäureatompotentiale (AAP) und Torsionswinkelpotentiale (TP) vorhergesagt und mit dem Strukturmodell verglichen. Die ausgewählten Mutanten sind in Tabelle 8 mit ihren jeweiligen Vorhersagewerten dargestellt.

Die Mutanten E12I, D112I, D202F und D202I werden nach der Vorhersage aus dem AAP ausgewählt. Leu51 ist von der TP-Vorhersage ausgewählt worden. Das TP vernachlässigt allerdings Substrat- und Cofaktorlagen in der Berechnung. So liegen vor allem auch in diesen Regionen vorhergesagte Positionen. Für die Kombination beider Methoden eignen sich T113M und S293H.

Glu12 befindet sich frei zugänglich in der Substrat-Domäne an der Oberfläche zum aktiven Zentrum, senkrecht zu Leu51. Asn112 und Ser293 liegen senkrecht zueinander lösungsmittelzugänglich an der Oberfläche der Dimerisierungs-Kontaktfläche. Thr113 zeigt ins Innere der NAD-Domäne und hat eine hydrophobe Umgebung. Asn202 liegt mitten im Inneren der NAD-Domäne und ist ebenfalls von hydrophoben Resten umgeben.

Tabelle 8: Thermostabilitätsmutanten mit den berechneten Werten für Aminosäureaustausche aus Aminosäureatompotentialen (AAP) und Torsionswinkelpotentialen (TP) nach Leven (1999). Außerdem ist ihre Lage im Protein und die Anzahl der Salz- oder Wasserstoffbrücken ihrer Seitenketten in der Struktur angegeben.

Mutante	AAP	TP	Lage im Protein	Salz-/H-Brücken	Sonst. Abstände
E12I	-137.3	0.55	α -Helix α 1, Oberfläche zu aktivem Zentrum	OE1-R9 N: 2.82 Å OE1-R75 NH2: 2.84 Å OE1-R75 NE: 2.85 Å OE2-H ₂ O: 2.71 Å OE1-G7 O: 3.67 Å	-
L51F	-15.8	-1.80	aktives Zentrum	CD2-E12OE2: 3.43 Å	-
D112I	-164.5	0.00	α -Helix α A, Dimerisierungs- Kontaktfläche	OD2-H ₂ O: 2.60 Å	OD1-M120 CE: 3.43 Å
T113M	-82.2	-0.67	α -Helix α A, NAD- Domänenkern	OG1-109A O: 2.78 Å	CG2: hydrophobe Umgebung
D202F	-116.6	-0.02	β -Faltblatt β D, NAD- Domänenkern	OD2-H204 NE2: 2.61 Å OD1-H ₂ O: 2.75 Å	OD2-F164 CE2: 3.36 Å OD1-A109 CB: 3.62 Å
D202I	-159.7	0.65	s.o.	s.o.	s.o.
S293H	-42.8	-0.59	β -Faltblatt β G, Dimerisierungs- Kontaktfläche	OG-D258 OD1: 2.55 Å OG-H ₂ O: 2.56 Å OG-I257 O: 3.57 Å	OG-F108 CZ: 3.33 Å

4.1.2.3 Basenaustausche der Punktmutanten

In Tabelle 9 sind die erhaltenen D-HicDH-Klone für die entsprechenden Aminosäureaustausche mit ihren Basencodeänderungen (5'63') und der Basensequenzposition im Plasmid zusammengestellt.

Tabelle 9: Mutanten der D-HicDH und ihre Austausch, Nup: Nukleotidposition

Mutation	Codeänderung	Nup	Klon
E12I	GAG 6 ATC	1598	1c
L51F	TTG 6 TTC	1725	2p, 2r
G78A	GGT 6 GCT	1796	3a
Y100F	TAT 6 TTT	1862	4a
D112I	GAT 6 ATT	1898	5a
T113M	ACT 6 ATG	1901	6d
G136W	GGC 6 TGG	1970	7a, 7b
D202F	GAT 6 TTT	2168	8a
D202I	GAT 6 ATT	2168	9b
E263Q	GAA 6 CAG	2351	10b
E263D	GAA 6 GAC	2351	11a, 11c
S293H	AGC 6 CAC	2441	12h
Y298A	TAC 6 GCT	2456	13e
Y298R	TAC 6 CGC	2456	14c
M307V	ATG 6 GTT	2483	15f
M307Q	ATG 6 CAG	2483	16b

4.1.3 Aufreinigung der D-HicDH

Alle Mutanten konnten analog zum Wildtyp exprimiert und aufgereinigt werden und über ihre enzymatischen Aktivitäten nachgewiesen werden. Abbildung 11 zeigt die einzelnen Schritte der Proteinaufreinigung schematisch.

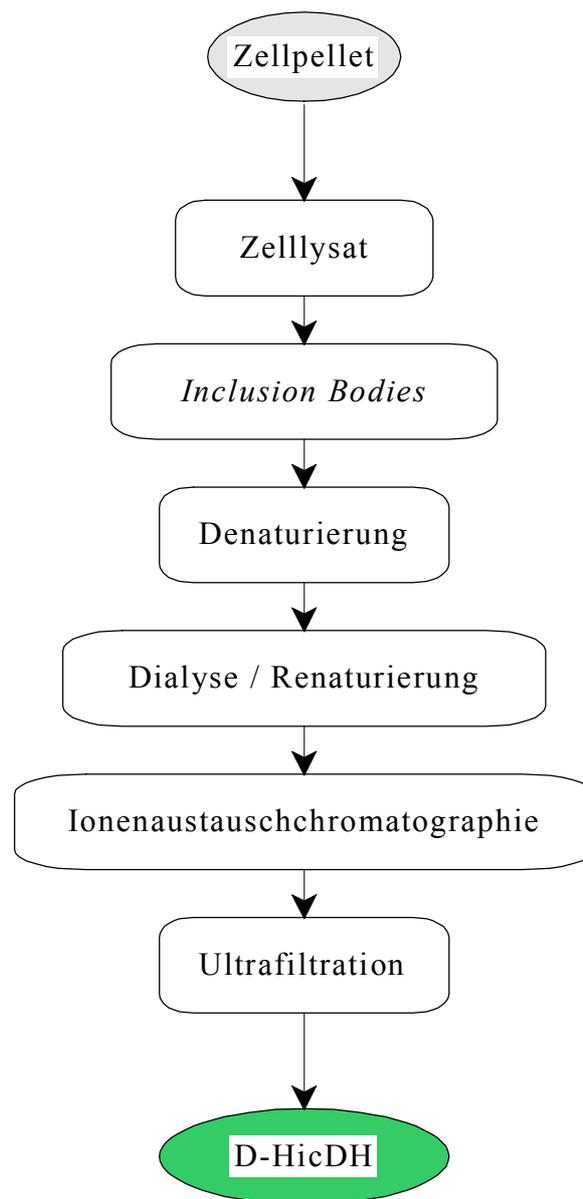


Abb. 11: Aufreinigungsschema der D-HicDH Wildtyp und Mutanten.

Mit der Anionenaustauschchromatographie konnte ungefaltetes und falsch gefaltetes Protein von der korrekt gefalteten Proteinfraction getrennt werden. Die meisten Mutanten wiesen das gleiche Elutionsverhalten von der MonoQ-Säule auf wie der Wildtyp. In Abbildung 12 ist das Chromatogramm vom Wildtyp dargestellt.

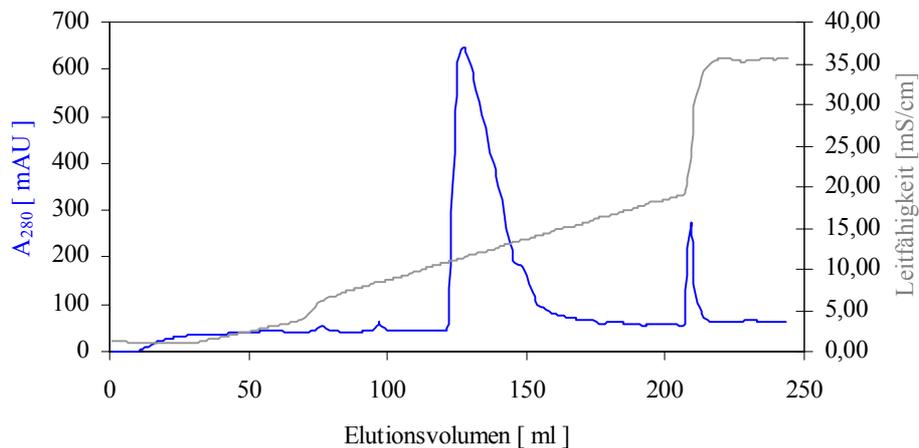


Abb. 12: Ionenaustauschchromatogramm von D-HicDH Wildtyp. Es wird eine MonoQ HR 10/10-Säule von Pharmacia mit dem Laufmedium 20 mM Tris/HCl pH 7.4, 1 mM DTT verwendet. Der Gradient wird mit 0-0.4 M NaCl eingestellt und kann über die Leitfähigkeit (grau gezeichnet) beobachtet werden. Die D-HicDH eluiert bei ca. 0.12 M NaCl im Laufmedium.

Bei den Mutanten D112I, D202F und D202I zeigen die Chromatogramme unter denselben Laufbedingungen wie in Abbildung 12 mehrere Proteinelutionspeaks. Die Chromatogramme von D112I und D202I sind in den Abbildungen 13 und 14 zu sehen. Die Peaks wurden in unterschiedlichen Fraktionen aufgefangen und getrennt untersucht.

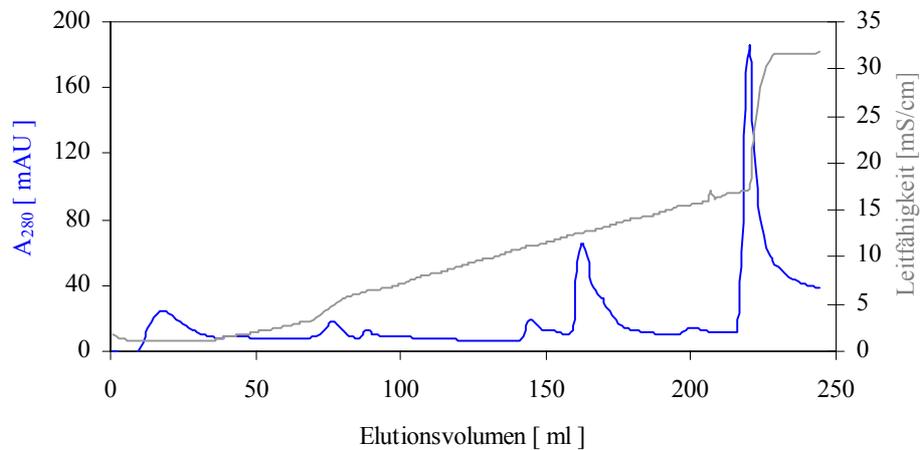


Abb. 13: Ionenaustauschchromatogramm der Mutante D112I. Es gelten die gleichen Bedingungen wie in Abb. 12.

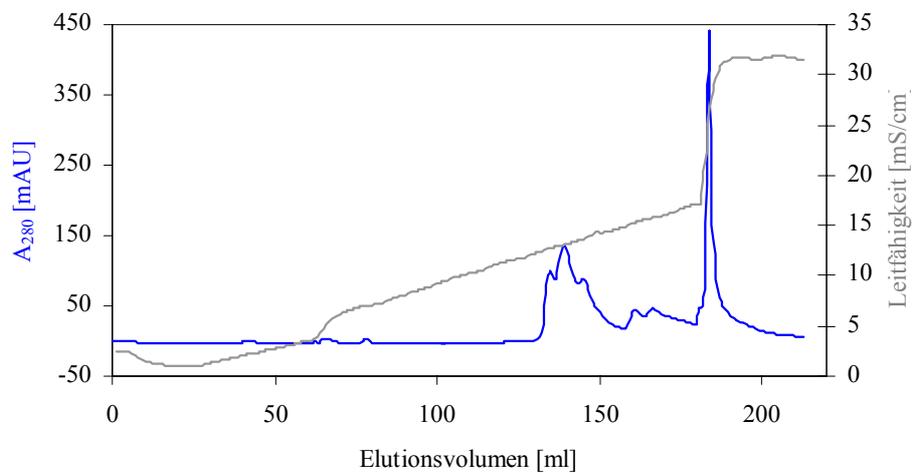


Abb. 14: Ionenaustauschchromatogramm der Mutante D202I. Es gelten die gleichen Bedingungen wie in Abb. 12.

Die Ausbeuten der Proteinexpression/-reinigung und die spezifischen Aktivitäten von D-HicDH Wildtyp und ihrer Mutanten sind in Tabelle 10 schematisch aufgeführt. Die Monomerenmassen sind theoretisch bestimmt worden.

Tabelle 10: Proteinaufreinigung und spezifische Aktivität von D-HicDH-Wildtyp (wt) und Mutanten mit den Substraten 2-Ketoisocaproat und Phenylpyruvat (je 50 mM).

Mutante	M _w [Da]	A ₂₈₀ 0.1 %	m _{8M Harnstoff} [mg]	MonoQ Frakt.	m _{MonoQ} [mg]	m _{Kristal.} [mg]	Akt. [U/mg] 2-Ketoisocap.	Akt. [U/mg] Phenylpyruvat
wt	36 893	1.053	90		14.6	18.7	203	1866
E12I	36 877	1.053	136		1.5	-	0.1	1
L51F	36 927	1.052	196		15.9	16.8	1.5	252
G78A	36 907	1.052	61		4.2	2.6	5	84
Y100F	36 877	1.018	98		19	23.8	11	123
D112I	36 891	1.053	91	52-56	2.0	-	24	426
				60-67	4.6		61	1586
				76-78	1.3		2	35
T113M	36 923	1.052	118		33	-	147	2604
G136W	37 022	1.203	488		29.6	10.5	167	1279
D202F	36 925	1.052	147	61-68	7.4	-	36	79
				70-76	8.2		8	16
				84-88	19.2		2	5
D202I	36 891	1.053	85	60-62	2.8	-	69	1135
				64-65	2.5		98	1342
				68-70	2.1		57	880
				75-77	2.2		6	84
E263D	36 879	1.053	207		46.5	35	-	-
E263Q	36 892	1.053	113		15.4	8.6	-	-
S293H	36 943	1.051	94		9.0	-	2	32
Y298A	36 801	1.020	161		24	16.2	0.3	6
Y298R	36 886	1.018	156		45	41.4	0.01	0.3
M307V	36 861	1.053	230		-	42.7	2	14
M307Q	36 890	1.053	177		49	4.3	29	156

4.1.4 Charakterisierung der D-HicDH Wildtyp und ihrer Mutanten

4.1.4.1 Gelelektrophorese

Die Proteinaufreinigung kann mit SDS- und nativer Gelelektrophorese verfolgt werden. In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der einzelnen Aufreinigungsstufen in einem SDS- und einem nativen Gel dokumentiert. Dabei sieht man deutlich, dass die D-HicDH auch im Cytosol exprimiert wird. Erst nach der Renaturierung der D-HicDH durch Dialyse kann man im nativen Gel die Proteinbande des gefalteten Proteins erkennen, die auf einer Höhe mit der stärksten Proteinbande aus dem Überstand des Zellysats liegt. Durch Ionenaustauschchromatographie wird das ungefaltete Protein abgetrennt, das im nativen Gel als *tailing* zu erkennen ist.

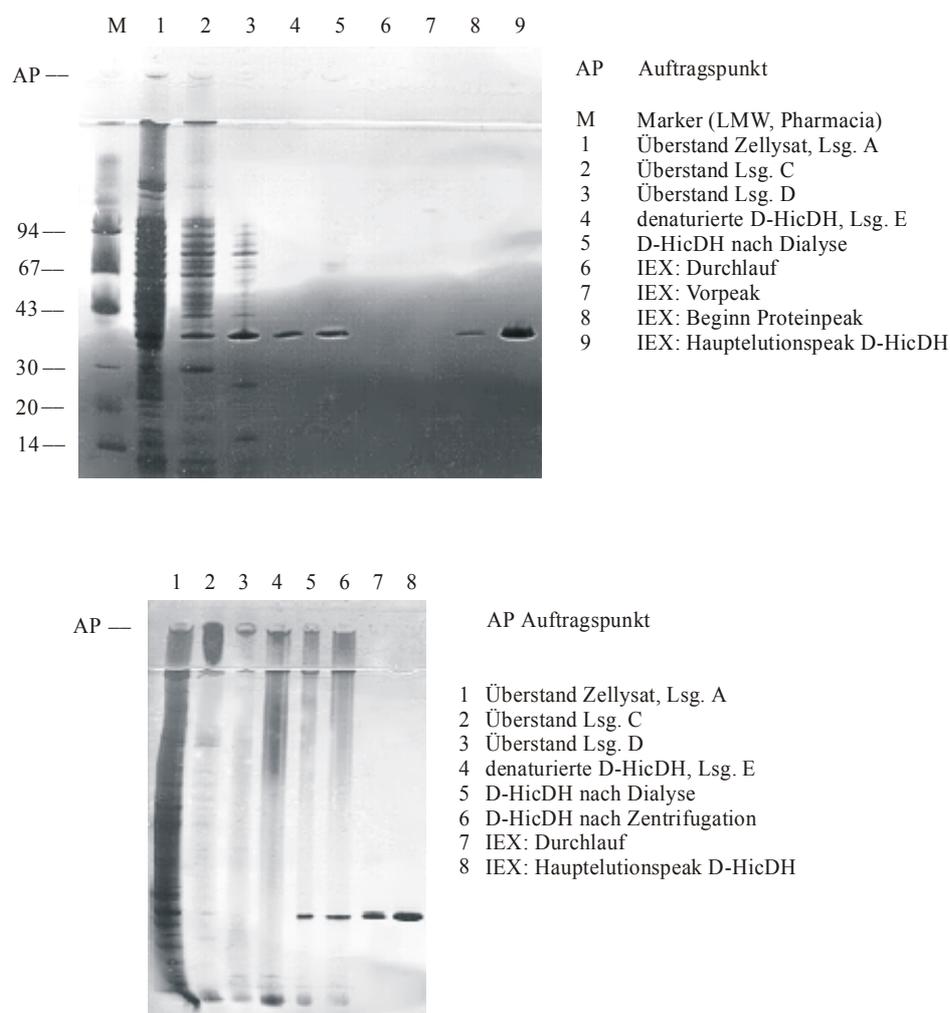


Abb. 15: SDS-Gel (oben) und natives Gel (unten) der Aufreinigung von D-HicDH Wildtyp.

Eine native gelelektrophoretische Analyse der Ionenaustauscher-Elutionsfraktionen der Mutanten D112I und D202I (Abb. 16) zeigt, dass es sich bei den Fraktionen um unterschiedlich gefaltetes Protein handelt. Sie wandern unterschiedlich schnell durch das Gradientengel. Die Fraktionen mit einheitlicher Zusammensetzung werden vereinigt und weiter charakterisiert.

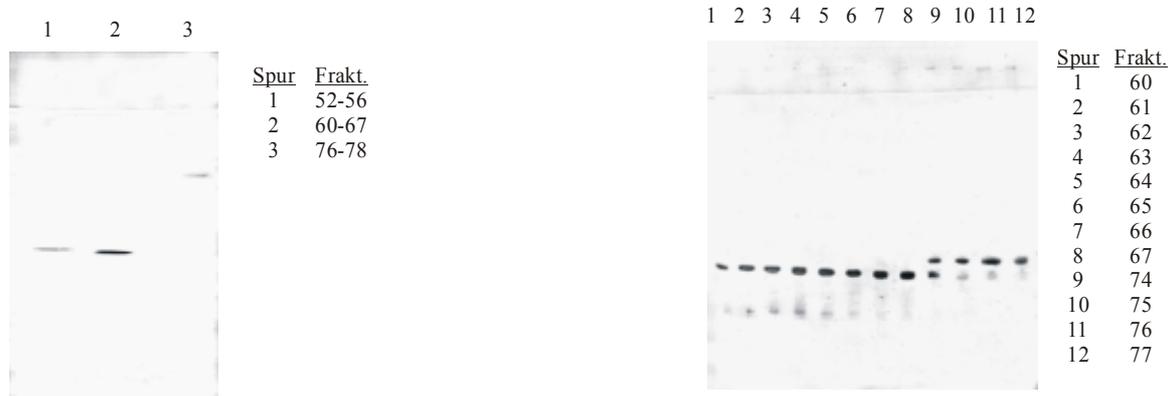


Abb. 16: Untersuchung der Ionenaustauscher-Elutionsfraktionen der Mutanten D112I (links) und D202I (rechts) mit nativer Gelelektrophorese.

Die isoelektrische Fokussierung der D-HicDH (Abb. 17) zeigt eine Proteinbande bei pH 5.2.

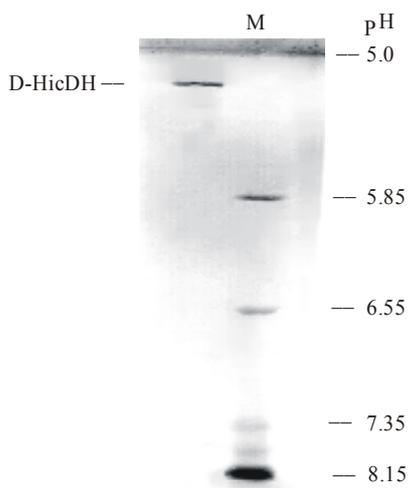


Abb. 17: Isoelektrische Fokussierung der D-HicDH auf einem PHAST-Gel IEF pH 5-8 von Pharmacia.. Es ist eine 0.1 mg/ml D-HicDH Proteinprobe in Wasser analysiert worden. Die Markerbanden (M) des Pharmacia *IEF high pI-Kit* mit einem $pI > 8$ sammeln sich am anodischen Ende des Gels.

4.1.4.2 Massenspektrometrie

Die gereinigten Proteinlösungen wurden mit MALDI-TOF-MS untersucht. Die Spektren zeigen eine sehr saubere Proteinlösung, da nur zwei Peaks im Massenbereich von 5-150 kDa erkennbar sind, die beide der D-HicDH zugeordnet werden können. In Abbildung 18 ist exemplarisch das Spektrum der D-HicDH-Mutante M307V abgebildet. Die Auflösung in diesem Spektrum ist sehr hoch, da neben dem Molekülpeak diskrete Signale von Sinapinsäureaddukten mit dem Proteinmolekül auftreten. Der Anstieg der Basislinie zu kleinen Massen hin ist ein Messartefakt. Die theoretische Masse der Mutante liegt mit 36861 Da zwischen den experimentell erhaltenen Werten aus dem Molekülpeak ($[M+H]^+$: 36809 Da) und dem zweifach geladenen Monomer ($[M+2H]^{2+}$: $18450 \text{ Da} \cdot 2 = 36900 \text{ Da}$).

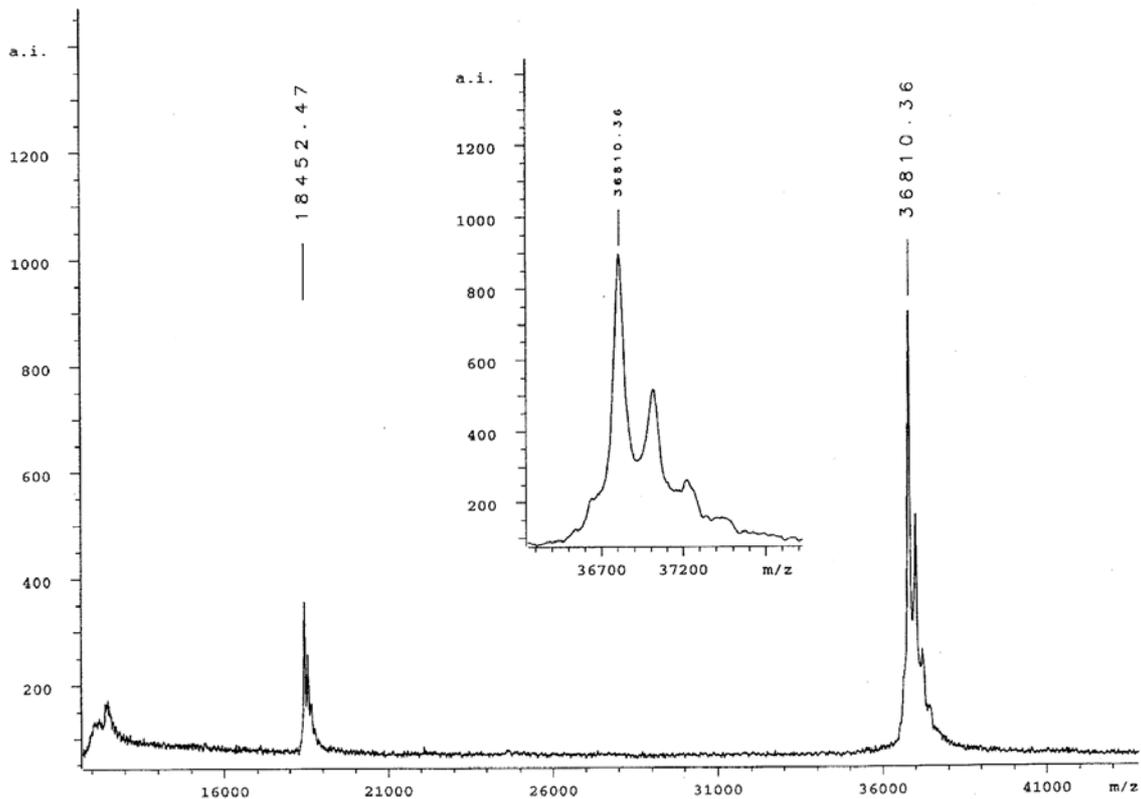


Abb. 18: MALDI-TOF-Massenspektrum von der D-HicDH-Mutante M307V. Die Kalibrierung erfolgte mit Myoglobin $[M+H]^+$, Trypsinogen $[M+H]^+ + [M+2H]^{2+}$ und BSA $[M+2H]^{2+}$.

4.1.4.3 Gelfiltration

Das Chromatogramm der Gelfiltration (Abb. 19) zeigt, dass es sich um eine einheitliche Proteinprobe handelt. Bei den D-HicDH Mutanten wird auf diesen Aufreinigungsschritt verzichtet, da die Mutanten schon im vorherigen Schritt rein erhalten wurden.

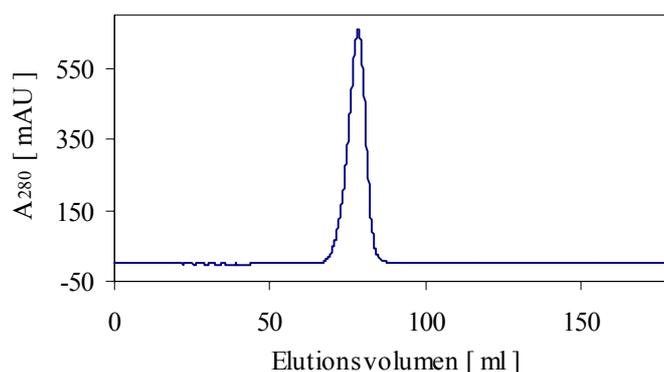


Abb. 19: Gelfiltration der D-HicDH Wildtyp. Es wurde eine HiPrep 16/60 Sephacryl S300 Säule von Pharmacia verwendet. Als Laufpuffer wurde 20 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM DTT bei einer Flußgeschwindigkeit von 0.4 ml/min und 10°C gewählt. 24.5 mg Protein wurden in 3 ml aufgetragen.

4.1.4.4 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die Analyse der D-HicDH-Lösung weist auf eine monomodale Proteinverteilung hin, selbst bei hohen, zur Kristallisation verwendeten, Proteinkonzentrationen. In Tabelle 11 sind die gemessenen hydrodynamischen Radien R_H exemplarisch für den Wildtyp (5.4 mg/ml) und die Mutante L51F (8.9 mg/ml) aufgeführt. Die daraus berechneten Molekulargewichte sind unter der Annahme einer globulären Proteingestalt (M_w glob.) und für ein *Volume-Shape-Hydration* Modell (M_w VSH) mit dem Massenbereich 24-110 kDa aufgeführt. Die Molekulargewichte deuten auf ein dimeres Protein in Lösung hin.

Tabelle 11: Analyse der D-HicDH Teilchengröße in Proteinkristallisationslösungen. *SOS-Error*: Summe der Fehlerquadrate, D_i : translationaler Diffusionskoeffizient.

	D_i [10^{-9} cm ² s ⁻¹]	R_H [nm]	M_w glob. [kDa]	M_w VSH [kDa]	<i>Baseline</i>	<i>SOS-Error</i>
wt	562	3.9 ± 1.1	80	106	1.004	1.684
L51F	637	3.5 ± 0.4	59	73	1.000	0.510

4.1.4.5 Schmelzpunktbestimmung, Thermostabilität und Sekundärstrukturanalyse

4.1.4.5.1 *Differential Scanning Microcalorimetry (DSC)*

Für die Bestimmung der Thermostabilität werden die Schmelzpunkte aller D-HicDH-Mutanten mit DSC gemessen. Exemplarisch sind in Abbildung 20 die Schmelzkurven vom Wildtyp und der Mutante D202F (Fraktionen 70-76) abgebildet. In den Tabellen 12 und 13 sind die gemessenen Schmelzpunkte und Schmelzenthalpien aller Mutanten im Vergleich zum Wildtyp aufgelistet.

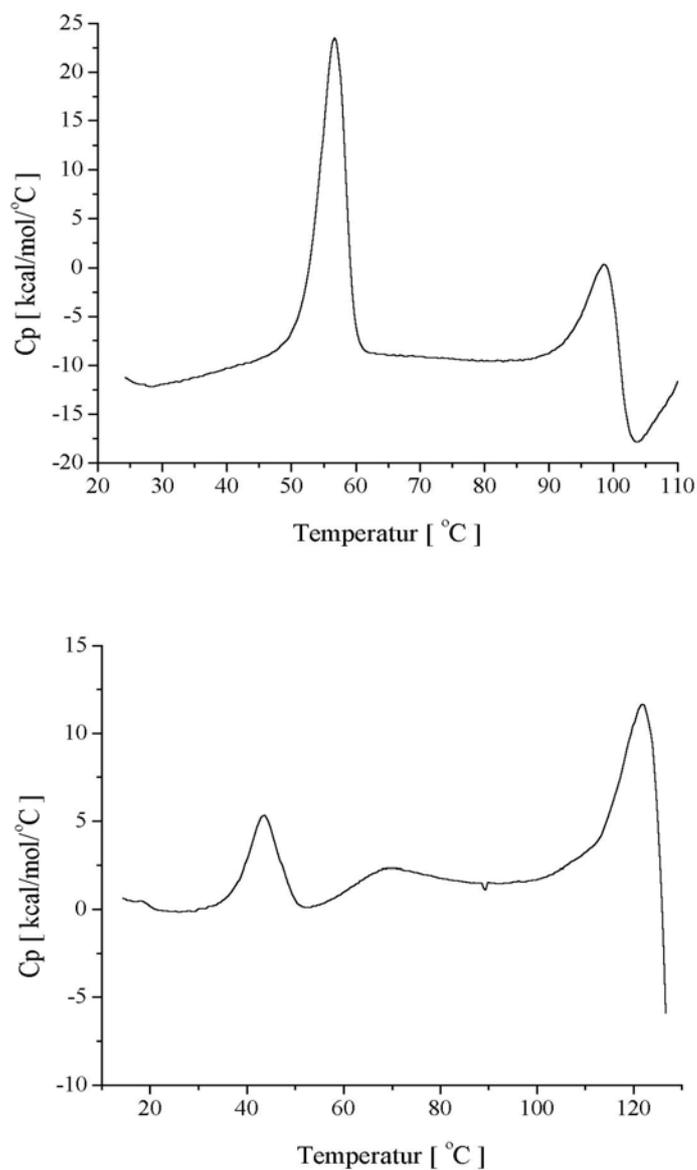


Abb. 20: DSC-Schmelzkurven von D-HicDH Wildtyp (oben) und Mutante D202F (Fraktionen 70-76, unten).

Tabelle 12: Mit DSC bestimmte Schmelzpunkte von D-HicDH Wildtyp und Mutanten, ausgewertet nach dem *non-2-state* Modell der *non-linear least-square* Methode von Levenberg/Marquardt. Schmelzpunkte, die mehr als 3°C vom Wildtyp abweichen sind farbig gekennzeichnet (orange: Abweichung zu tieferen Werten; grün: Abweichung zu höheren Werten). T_m : mittlerer thermischer Übergangspunkt (Schmelzpunkt), ΔT_m : Differenz zwischen beiden Schmelzpunkten.

Mutante	MonoQ Fraktion	c_{Protein} [mg/ml]	T_{m1} [°C]	T_{m2} [°C]	ΔT_m [°C]
wt		0.47	56.5	98.3	41.8
E12I		0.21	56.0	-	-
L51F		0.50	55.8	98.3	42.5
G78A		0.58	52.9	93.2	40.3
Y100F		0.61	52.1	97.2	45.1
D112I	52-56	0.44	57.9	104.9	47.0
	60-67	0.50	56.4	104.2	47.8
	76-78	0.60	-	-	-
T113M		0.56	55.1	101.2	46.1
G136W		0.51	42.8	97.7	54.9
D202F	61-68	0.50	46.6	116.9	70.3
	70-76	2.0	44.2	120.9	76.7
	84-88	1.0	44.0	-	-
D202I	60-62	0.50	45.1	116.4	71.3
	64-65	1.50	44.8	118.6	73.8
	68-70	0.50	45.2	-	-
	75-77	0.50	-	-	-
E263D		0.50	54.7	91.1	36.4
E263Q		0.58	55.5	92.1	36.6
S293H		1.20	40.1	-	-
Y298A		0.50	55.9	-	-
Y298R		0.50	43.1	98.1	55.0
M307V		0.50	49.0	-	-
M307Q		0.53	56.2	93.4	37.2

Tabelle 13: Mit DSC bestimmte Schmelzenthalpien von D-HicDH Wildtyp und Mutanten, ΔH : kalorimetrische Schmelzenthalpie (Wärmekapazität pro Mol Monomer), ΔH_v : van't Hoffsche Schmelzenthalpie (Wärmekapazität pro Mol kooperativer Entfaltungseinheit), $\Delta H / \Delta H_v$: Anzahl kooperativer Einheiten pro Mol.

Mutante	MonoQ Fraktion	ΔH_1 [kcal/mol]	ΔH_{v1} [kcal/mol]	ΔH_2 [kcal/mol]	ΔH_{v2} [kcal/mol]	$\Delta H / \Delta H_v$ (1)	$\Delta H / \Delta H_v$ (2)
wt		154	176	83	187	0.88	0.44
E12I		273	44	-	-	6.22	-
L51F		134	176	84	201	0.76	0.3
G78A		91	124	19	166	0.73	0.11
Y100F		132	116	80	165	1.14	0.48
D112I	52-56	86	215	13	230	0.40	0.06
	60-67	121	171	32	194	0.71	0.16
	76-78	-	-	-	-	-	-
T113M		137	167	96	195	0.82	0.50
G136W		127	113	58	216	1.12	0.27
D202F	61-68	75	146	103	123	0.51	0.84
	70-76	44	103	71	155	0.43	0.46
	84-88	30	106	-	-	0.29	-
D202I	60-62	108	140	15	295	0.77	0.52
	64-65	37	124	-	-	0.30	-
	68-70	110	132	-	-	0.83	-
	75-77	-	-	-	-	-	-
E263D		180	163	21	-	1.10	-
E263Q		141	162	12	197	0.87	0.06
S293H		12	121	-	-	0.1	-
Y298A		98	160	-	-	0.62	-
Y298R		144	187	126	178	0.77	0.71
M307V		116	127	-	-	0.91	-
M307Q		154	161	39	184	0.96	0.21

Für den ersten Schmelzpunkt wird bei fast allen Mutanten ein Verhältnis der Wärmekapazitäten von etwa eins gefunden. Das entspricht einem Entfaltungsmechanismus, wonach sich jedes Monomer unabhängig entfaltet. Am zweiten Schmelzpunkt ist das Wärmekapazitätsverhältnis mit etwa 0.5 deutlich kleiner. Somit ist diese Entfaltung stark von der umgebenden Restproteinstruktur abhängig. Die Mutanten E12I und S293H lassen sich nicht in dieses Schema eingliedern. Bei ihnen scheinen andere Faltungsmechanismen vorzuliegen.

4.1.4.5.2 Circular-Dicroismus (CD)

In den Abbildungen 21 und 22 sind diese Schmelzkurven und das abgeleitete Spektrum zur Ermittlung des Schmelzpunktes abgebildet.

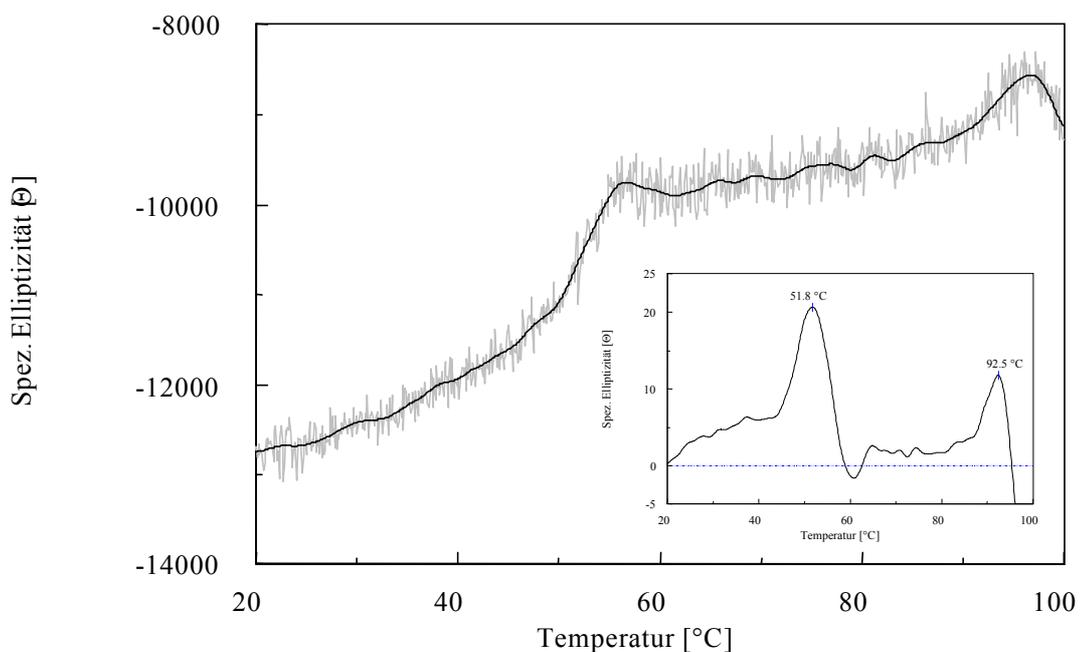


Abb. 21: CD-Schmelzkurve von D-HicDH Wildtyp 0.5 mg/ml in 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 bei 222 nm. Die gemessene Kurve ist grau gezeichnet, die geglättete Kurve wird schwarz hervorgehoben. Zusätzlich ist in der rechten unteren Bildhälfte verkleinert die abgeleitete Schmelzkurve mit den Schmelzpunkten dargestellt.

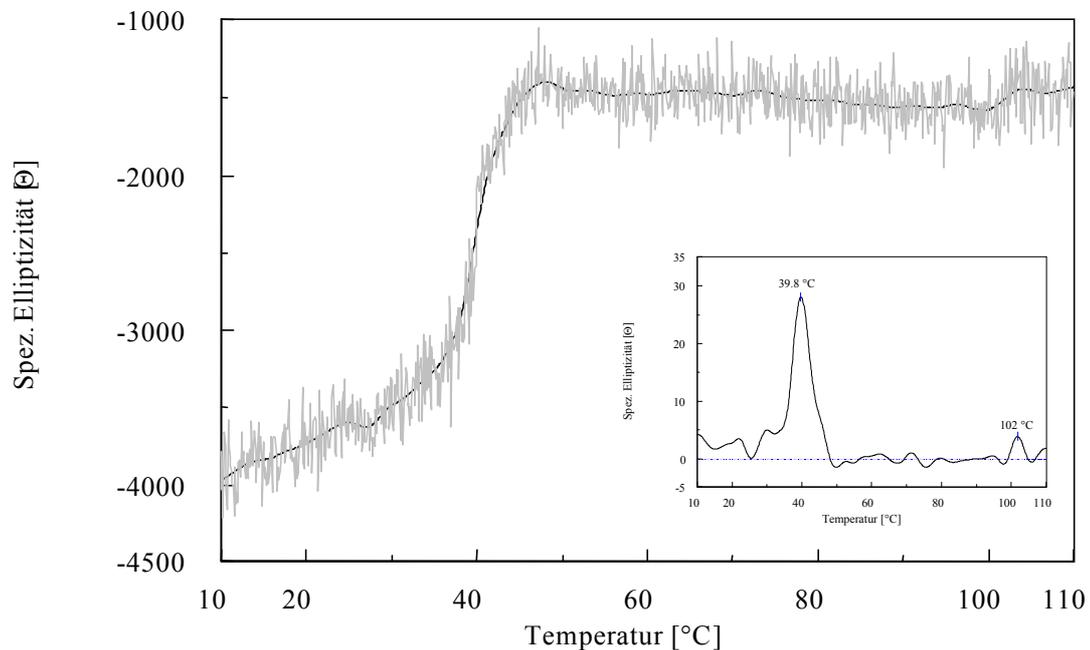


Abb. 22: CD-Schmelzkurve von D202I (Fraktion 64/65) 0.3 mg/ml in 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 bei 222 nm. Die gemessene Kurve ist grau gezeichnet, die geglättete Kurve wird schwarz hervorgehoben. Zusätzlich ist in der rechten unteren Bildhälfte verkleinert die abgeleitete Schmelzkurve mit den Schmelzpunkten dargestellt.

4.1.4.5.3 Abhängigkeit der Sekundärstrukturzusammensetzung von der Temperatur

Die CD-Spektren bei 10-100°C zeigen deutliche Unterschiede in der Sekundärstrukturzusammensetzung, besonders im Bereich zwischen 30-60°C (Abb. 23).

Am zweiten Schmelzpunkt konnten keine Analysen erfolgen, da es sich bei dem Messsystem um ein wässriges offenes System handelt. Für genaue Sekundärstrukturuntersuchungen am Schmelzpunkt wird eine Proteinprobe mit geringerer Proteinkonzentration vermessen, um Signale noch bis 190 nm zu detektieren (Abb. 24).

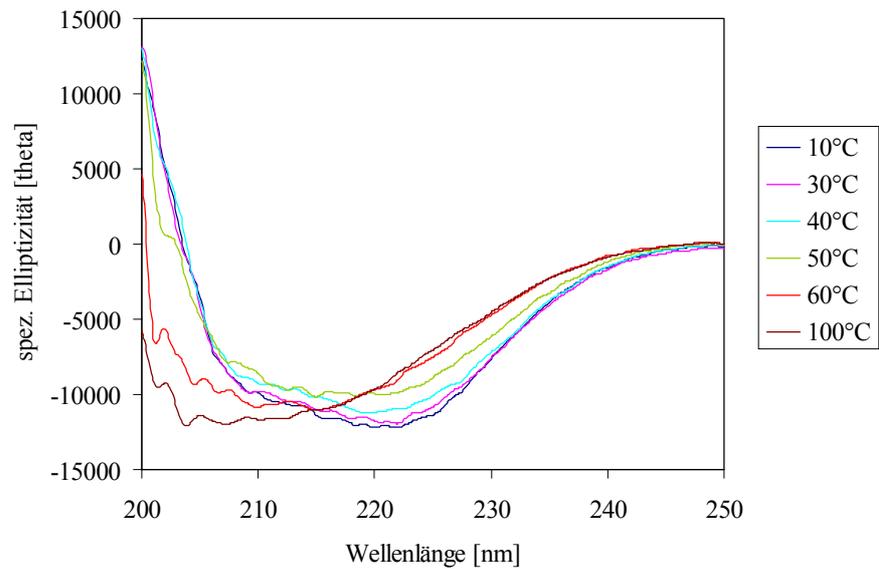


Abb. 23: CD-Wellenlängen-Scans in 10°C Schritten während des Schmelzvorgangs. 0.2 mg/ml Wildtyp D-HicDH in 5 mM Kaliumphosphatpuffer werden in 2 mm dicker Quarzküvette vermessen.

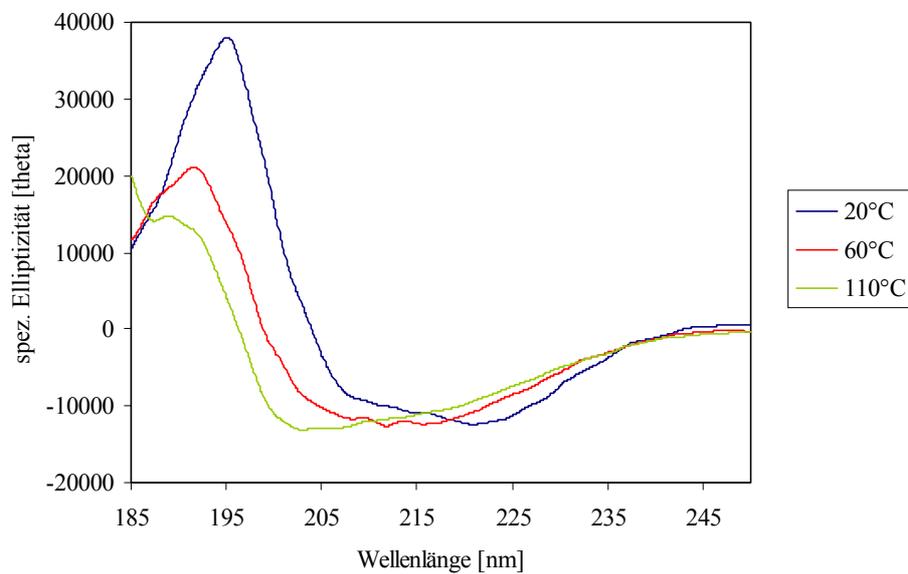


Abb. 24: CD-Wellenlängen-Scans bei 20°C (natives Protein), 60°C (am ersten Schmelzpunkt) und 110°C (am zweiten Schmelzpunkt) während des Schmelzvorgangs. Das Wildtyp D-HicDH Protein weist eine Proteinkonzentration von 0.14 mg/ml in 5 mM Kaliumphosphatpuffer auf und wird in einer 1 mm dicker Quarzküvette vermessen. 10 Spektren werden jeweils übereinander gelegt.

In Tabelle 14 sind die Sekundärstrukturanteile der D-HicDH aus der Röntgenstrukturanalyse und die Berechnung mit dem Programm K2D aus den Spektren in Abb. 24 aufgeführt.

Tabelle 14: Sekundärstrukturanteile der D-HicDH aus der Struktur und mit dem Programm K2D aus CD-Messungen bei verschiedenen Temperaturen berechnet.

	α -Helix	β -Faltblatt	<i>random</i>
Struktur 1DXY	41.2 %	14.8 %	44 %
20°C wt, K2D	39 %	6 %	55 %
60°C wt, K2D	26 %	15 %	59 %
100°C wt, K2D	27 %	26 %	47 %

Die Werte zeigen, dass am ersten Schmelzpunkt der D-HicDH ein Teil der α -Helix-Sekundärstruktur verloren geht. Die Werte für β -Faltblatt liegen im Rahmen der Meßgenauigkeit. Bei 100°C scheint der zweite Schmelzpunkt in der CD-Messeinrichtung noch nicht erreicht zu sein.

4.1.4.6 Aktivitätsbestimmung

Die Enzymaktivitäten sind von D-HicDH Wildtyp und den Mutanten L51F, G78A, Y100F, G136W, Y298A, Y298R, M307V und M307Q mit verschiedenen Substraten untersucht worden. Die Substrate werden unter Angabe ihres Restes (siehe Tab. 3) angegeben. In den folgenden Tabellen 15-23 sind die Auswertungen der Enzymaktivitäten aufgeführt. Die angegebenen Fehler geben die Abweichungen bei der Regressionsrechnung an. Messfehler sind dabei nicht berücksichtigt worden. Weder beim Wildtyp noch bei den Mutanten konnte mit folgenden Substraten eine Reaktion beobachtet werden:

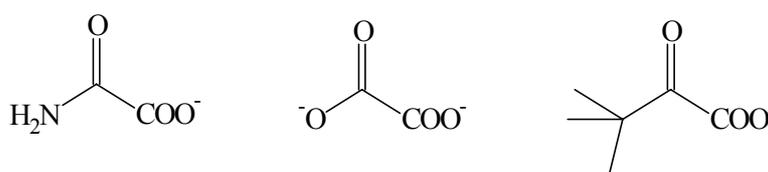


Tabelle 15: Aktivitätstest D-HicDH **Wildtyp** (wt), $M_w = 36893$ g/mol, $E_0 = 5.4$ mg/ml (E_0 : Anfangsenzymkonzentration)

Substrat	V_{max} [U/ml]	K_M [mM]	$\log K_M$	k_{cat} [s ⁻¹]	$\log k_{cat}$	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ M ⁻¹]	$\log k_{cat}/K_M$
CH ₃ -	640 ± 3	340 ± 20	2.5315	7.3·10 ⁴ ± 3.4·10 ²	4.8633	2.1·10 ⁵	5.322
C ₂ H ₅ -	310 ± 5	27 ± 2	1.4314	1.6·10 ⁵ ± 2.6·10 ³	5.2041	5.8·10 ⁶	6.763
C ₃ H ₇ -	690 ± 31	3.5 ± 0.9	0.5441	3.5·10 ⁵ ± 1.6·10 ⁴	5.5441	9.9·10 ⁷	7.996
n-C ₄ H ₉ -	690 ± 27	4.1 ± 0.7	0.6128	3.4·10 ⁵ ± 1.2·10 ⁴	5.5315	8.3·10 ⁷	7.919
C ₆ H ₁₃ -	3020 ± 120	4.0 ± 0.1	0.6021	3.4·10 ⁵ ± 1.3·10 ⁴	5.5315	9.4·10 ⁷	7.973
4i-C ₄ H ₉ -	1780 ± 70	10.8 ± 0.1	1.2742	2.0·10 ⁵ ± 8.0·10 ³	5.3010	1.9·10 ⁷	7.279
3i-C ₄ H ₉ -	250 ± 10	47 ± 6	1.6721	7.1·10 ⁴ ± 2.6·10 ³	4.8513	1.6·10 ⁶	6.204
Ph-	160 ± 4	27 ± 2	1.4314	2.6·10 ⁴ ± 4.0·10 ²	4.4150	1.2·10 ⁶	6.079
Ph-CH ₂ -	8460 ± 190	2.5 ± 0.6	0.3979	1.3·10 ⁶ ± 3.9·10 ⁴	6.1139	4.5·10 ⁸	8.653
HO-Ph-CH ₂ -	4600 ± 37	6.2 ± 0.6	0.7924	8.2·10 ⁵ ± 1.3·10 ⁴	5.9138	1.4·10 ⁸	8.146
Indol-CH ₂ -	2870 ± 63	7.0 ± 0.4	0.8451	1.5·10 ⁶ ± 3.2·10 ⁴	6.1761	3.0·10 ⁷	7.477
HO-CH ₂ -	30 ± 1	40 ± 5	1.6021	3.4·10 ³ ± 1.2·10 ²	3.5315	9.3·10 ⁴	4.968
HOOC-	0.3 ± 0.1	2.4·10 ⁵ ± 6.9·10 ³	5.3802	3.5·10 ¹ ± 9.1·10 ⁰	1.5441	1.8	0.255
HOOC-CH ₂ -	12 ± 1	64 ± 10	1.8062	5.9·10 ³ ± 1.5·10 ²	3.7709	9.0·10 ⁴	4.954
HOOC-(CH ₂) ₂ -	2.3 ± 0.4	4300 ± 800	3.6335	4.6·10 ² ± 8.0·10 ¹	2.6628	1.1·10 ²	2.041

Tabelle 16: Aktivitätstest D-HicDH Mutante **Y298A**, $M_w = 36801$ g/mol, $E_0 = 7.4$ mg/ml

Substrat	v_{\max} [U/ml]	K_M [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ M ⁻¹]	$\frac{\text{Mut}(k_{\text{cat}} / K_M)}{\text{wt}(k_{\text{cat}} / K_M)}$	$\lg \frac{\text{Mut}(k_{\text{cat}} / K_M)}{\text{wt}(k_{\text{cat}} / K_M)}$
n-C ₄ H ₉ -	77 ± 2	1130 ± 39	1.0 · 10 ⁴ ± 2.3 · 10 ²	9.2 · 10 ³	1.1 · 10 ⁻⁴	-3.959
C ₆ H ₁₃ -	93 ± 4	124 ± 26	9.5 · 10 ³ ± 3.6 · 10 ²	8.8 · 10 ⁴	9.4 · 10 ⁻⁴	-3.027
4i-C ₄ H ₉ -	86 ± 2	1510 ± 140	8.3 · 10 ³ ± 2.4 · 10 ²	5.5 · 10 ³	2.9 · 10 ⁻⁴	-3.538
3i-C ₄ H ₉ -	4 ± 0.1	800 ± 11	3.3 · 10 ² ± 1	4.2 · 10 ²	3.2 · 10 ⁻⁴	-3.495
Ph-	21 ± 1.4	1010 ± 93	1.7 · 10 ³ ± 1.2 · 10 ²	1.7 · 10 ³	1.4 · 10 ⁻³	-2.854
Ph-CH ₂ -	211 ± 0.3	201 ± 2	2.9 · 10 ⁴ ± 3.4 · 10 ¹	1.4 · 10 ⁵	3.1 · 10 ⁻⁴	-3.509

Tabelle 17: Aktivitätstest D-HicDH Mutante **Y298R**, $M_w = 36886$ g/mol, $E_0 = 23$ mg/ml. Weitere Substrate konnten mit diesem Enzym nicht vermessen werden. Die Enzymaktivitäten wurden so schwach, dass keine Kinetikkurven mehr registriert werden konnten.

Substrat	v_{\max} [U/ml]	K_M [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ M ⁻¹]	$\frac{\text{Mut}(k_{\text{cat}} / K_M)}{\text{wt}(k_{\text{cat}} / K_M)}$	$\lg \frac{\text{Mut}(k_{\text{cat}} / K_M)}{\text{wt}(k_{\text{cat}} / K_M)}$
n-C ₄ H ₉ -	3.6 · 10 ⁷ ± 3.0 · 10 ⁷	1.1 · 10 ⁹ ± 9.0 · 10 ⁸	9.6 · 10 ⁸ ± 8.0 · 10 ⁸	8.8 · 10 ²	1.1 · 10 ⁻⁵	-4.959
C ₆ H ₁₃ -	75 ± 1	186 ± 3	2.0 · 10 ³ ± 5	1.1 · 10 ⁴	1.2 · 10 ⁻⁴	-3.921
4i-C ₄ H ₉ -	3.4 ± 0,2	780 ± 160	90 ± 7	1.2 · 10 ²	6.3 · 10 ⁻⁶	-5.201
Ph-CH ₂ -	18 ± 1.5	58 ± 15	4.7 · 10 ² ± 39	8.2 · 10 ³	1.8 · 10 ⁻⁵	-4.745

Tabelle 18: Aktivitätstest D-HicDH Mutante **L51F**, $M_w = 36927$ g/mol, $E_0 = 9.3$ mg/ml

Substrat	v_{\max} [U/ml]	K_M [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ M ⁻¹]	$\frac{\text{Mut}(k_{\text{cat}} / K_M)}{\text{wt}(k_{\text{cat}} / K_M)}$	$\lg \frac{\text{Mut}(k_{\text{cat}} / K_M)}{\text{wt}(k_{\text{cat}} / K_M)}$
CH ₃ -	2030 ± 3	27 ± 0.5	1.3 · 10 ⁵ ± 2.0 · 10 ²	4.9 · 10 ⁶	2.4 · 10 ¹	2.380
C ₂ H ₅ -	750 ± 3	41 ± 3	4.2 · 10 ⁴ ± 1.2 · 10 ²	1.3 · 10 ⁶	2.2 · 10 ⁻¹	-0.658
C ₃ H ₇ -	1320 ± 70	190 ± 13	8.7 · 10 ⁴ ± 4.3 · 10 ³	4.5 · 10 ⁵	4.5 · 10 ⁻³	-2.347
n-C ₄ H ₉ -	350 ± 5	130 ± 6	2.3 · 10 ⁴ ± 3.3 · 10 ²	1.8 · 10 ⁵	2.2 · 10 ⁻³	-2.658
4i-C ₄ H ₉ -	162 ± 1	350 ± 21	1.1 · 10 ⁴ ± 5.3 · 10 ¹	3.0 · 10 ⁴	1.6 · 10 ⁻³	-2.796
3i-C ₄ H ₉ -	215 ± 8	140 ± 50	1.4 · 10 ⁴ ± 5.3 · 10 ²	1.0 · 10 ⁵	6.4 · 10 ⁻²	-1.194
Ph-	0.15 ± 0.01	60 ± 23	9.9 ± 0.7	1.7 · 10 ²	1.4 · 10 ⁻⁴	-3.854
Ph-CH ₂ -	4040 ± 150	39 ± 16	2.7 · 10 ⁵ ± 9.9 · 10 ³	6.8 · 10 ⁶	1.5 · 10 ⁻²	-1.824
HO-CH ₂ -	130 ± 1	18 ± 1	8.6 · 10 ³ ± 6.6	4.8 · 10 ⁵	5.1	0.708
HOOC-CH ₂ -	1655 ± 3	20 ± 0.4	1.1 · 10 ⁵ ± 1.5 · 10 ²	5.4 · 10 ⁶	6.0 · 10 ¹	1.778

Tabelle 19: Aktivitätstest D-HicDH Mutante **G136W**, $M_w = 37022$ g/mol, $E_0 = 8.7$ mg/ml

Substrat	v_{\max} [U/ml]	K_M [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ M ⁻¹]	$\frac{\text{Mut}(k_{\text{cat}} / K_M)}{\text{wt}(k_{\text{cat}} / K_M)}$	$\lg \frac{\text{Mut}(k_{\text{cat}} / K_M)}{\text{wt}(k_{\text{cat}} / K_M)}$
CH ₃ -	1850 ± 45	734 ± 80	1.3 · 10 ⁵ ± 3.2 · 10 ³	1.8 · 10 ⁵	8.6 · 10 ⁻¹	-0.066
n-C ₄ H ₉ -	3240 ± 110	2.8 ± 0.4	2.3 · 10 ⁵ ± 7.9 · 10 ³	8.2 · 10 ⁷	1.0	0
4i-C ₄ H ₉ -	144 ± 30	1.2 ± 0.5	1.0 · 10 ⁵ ± 2.0 · 10 ³	8.6 · 10 ⁷	4.5	0.653
3i-C ₄ H ₉ -	1140 ± 3	57 ± 2	8.1 · 10 ⁴ ± 2.1 · 10 ²	1.4 · 10 ⁶	1.1	0.041
Ph-	550 ± 33	78 ± 7	3.9 · 10 ⁴ ± 2.3 · 10 ³	5.0 · 10 ⁵	4.2 · 10 ⁻¹	-0.377
Ph-CH ₂ -	11030 ± 280	1.8 ± 0.8	7.8 · 10 ⁵ ± 2.0 · 10 ⁴	4.4 · 10 ⁸	1.0	0

Tabelle 20: Aktivitätstest D-HicDH Mutante **Y100F**, $M_w = 36877$ g/mol, $E_0 = 10.8$ mg/ml

Substrat	v_{\max} [U/ml]	K_M [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ M ⁻¹]	$\frac{\text{Mut}(k_{\text{cat}} / K_M)}{\text{wt}(k_{\text{cat}} / K_M)}$	$\lg \frac{\text{Mut}(k_{\text{cat}} / K_M)}{\text{wt}(k_{\text{cat}} / K_M)}$
n-C ₄ H ₉ -	354 ± 12	2.9 ± 0.3	2.0·10 ⁴ ± 6.8·10 ²	6.9·10 ⁶	8.3·10 ⁻²	-1.081
4i-C ₄ H ₉ -	127 ± 2	1.4 ± 0.2	7.2·10 ³ ± 1.1·10 ²	5.2·10 ⁶	2.7·10 ⁻¹	-0.569
3i-C ₄ H ₉ -	152 ± 3	66 ± 4	8.6·10 ³ ± 1.4·10 ²	1.3·10 ⁵	1.0·10 ⁻¹	-1.0
Ph-	48 ± 1	45 ± 2	2.7·10 ³ ± 35	6.0·10 ⁴	5.0·10 ⁻²	-1.301
Ph-CH ₂ -	1430 ± 30	3.9 ± 0.4	8.1·10 ⁴ ± 1.6·10 ³	2.1·10 ⁷	4.7·10 ⁻²	-1.328

Tabelle 21: Aktivitätstest D-HicDH Mutante **M307V**, $M_w = 36861$ g/mol, $E_0 = 14.7$ mg/ml

Substrat	v_{\max} [U/ml]	K_M [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ M ⁻¹]	$\frac{\text{Mut}(k_{\text{cat}} / K_M)}{\text{wt}(k_{\text{cat}} / K_M)}$	$\lg \frac{\text{Mut}(k_{\text{cat}} / K_M)}{\text{wt}(k_{\text{cat}} / K_M)}$
n-C ₄ H ₉ -	617 ± 2	300 ± 13	2.6·10 ⁴ ± 8.4·10 ¹	8.6·10 ⁴	1.0·10 ⁻³	-3.0
4i-C ₄ H ₉ -	307 ± 1	218 ± 26	1.3·10 ⁴ ± 3.1·10 ¹	5.9·10 ⁴	3.1·10 ⁻³	-2.509
3i-C ₄ H ₉ -	40 ± 4	1290 ± 260	1.9·10 ³ ± 1.7·10 ²	1.5·10 ³	1.2·10 ⁻³	-2.921
Ph-	6.6 ± 0.4	250 ± 90	2.8·10 ² ± 16	1.1·10 ³	9.2·10 ⁻⁴	-3.036
Ph-CH ₂ -	1080 ± 10	184 ± 6	4.5·10 ⁴ ± 4.0·10 ²	2.6·10 ⁵	5.8·10 ⁻⁴	-3.237

Tabelle 22: Aktivitätstest D-HicDH Mutante **M307Q**, $M_w = 36890$ g/mol, $E_0 = 4.3$ mg/ml

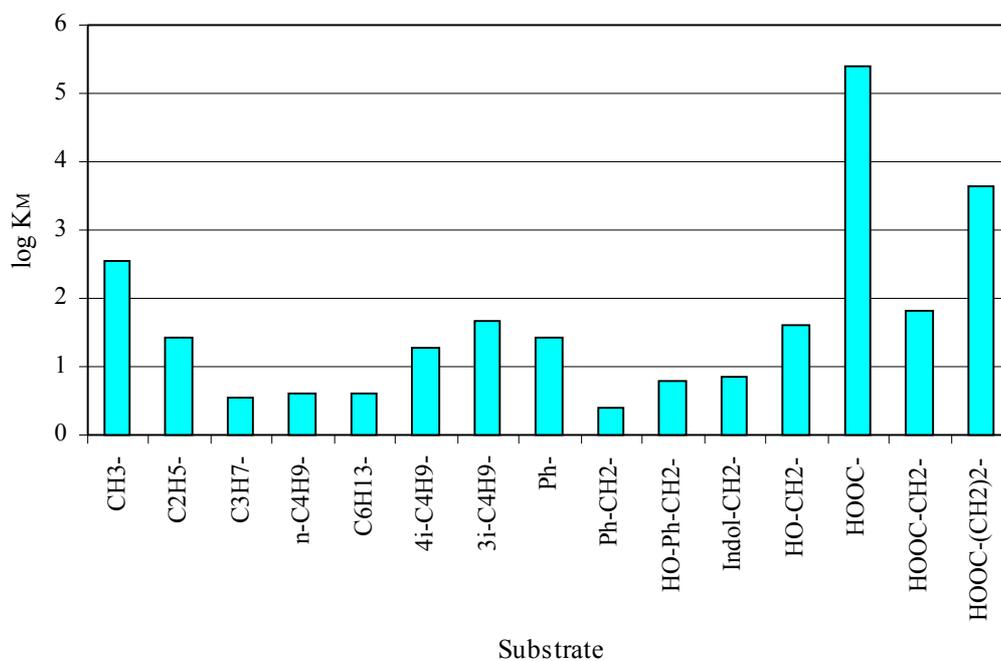
Substrat	v_{\max} [U/ml]	K_M [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ M ⁻¹]	$\frac{\text{Mut}(k_{\text{cat}} / K_M)}{\text{wt}(k_{\text{cat}} / K_M)}$	$\lg \frac{\text{Mut}(k_{\text{cat}} / K_M)}{\text{wt}(k_{\text{cat}} / K_M)}$
n-C ₄ H ₉ -	935 ± 2	160 ± 3	1.3·10 ⁵ ± 2.9·10 ²	8.3·10 ⁵	1.0·10 ⁻²	-2.0
4i-C ₄ H ₉ -	300 ± 7	76 ± 4	4.3·10 ⁴ ± 5.4·10 ²	5.9·10 ⁵	3.1·10 ⁻²	-1.509
3i-C ₄ H ₉ -	104 ± 1	580 ± 12	1.5·10 ⁴ ± 39	2.6·10 ⁴	2.0·10 ⁻²	-1.699
Ph-	53 ± 2	310 ± 52	7.5·10 ³ ± 2.0·10 ²	2.4·10 ⁴	2.0·10 ⁻²	-1.699
Ph-CH ₂ -	1500 ± 52	60 ± 8	2.1·10 ⁵ ± 7.4·10 ³	3.6·10 ⁶	8.0·10 ⁻³	-2.097

Tabelle 23: Aktivitätstest D-HicDH Mutante **G78A**, $M_w = 36907$ g/mol, $E_0 = 3.6$ mg/ml

Substrat	v_{\max} [U/ml]	K_M [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [s ⁻¹ M ⁻¹]	$\frac{\text{Mut}(k_{\text{cat}} / K_M)}{\text{wt}(k_{\text{cat}} / K_M)}$	$\lg \frac{\text{Mut}(k_{\text{cat}} / K_M)}{\text{wt}(k_{\text{cat}} / K_M)}$
n-C ₄ H ₉ -	170 ± 8	84 ± 9	2.9 · 10 ⁴ ± 1.4 · 10 ³	3.5 · 10 ⁵	2.4 · 10 ⁻²	-1.620
4i-C ₄ H ₉ -	47 ± 3	59 ± 24	8.1 · 10 ³ ± 3.6 · 10 ²	1.4 · 10 ⁵	7.4 · 10 ⁻³	-2.131
Ph-CH ₂ -	350 ± 10	14 ± 3	5.9 · 10 ⁴ ± 1.4 · 10 ³	4.2 · 10 ⁶	9.3 · 10 ⁻³	-2.032

Weitere Substrate wurden bei dieser Mutante nicht untersucht. Die Aktivitäten waren noch stärker herabgesetzt. Das noch vorhandene Enzym wurde für Kristallisationsansätze und zur Schmelzpunktbestimmung verwendet.

Zum besseren Vergleich der Enzymaktivitäten von Wildtyp und Mutanten werden in den folgenden Abbildungen die Werte graphisch dargestellt. Es wird die Auftragung der Logarithmen gewählt, da sich alle Werte in dieser Form besser zusammen darstellen lassen.

Abb. 25: Darstellung der logarithmischen K_M -Werte verschiedener Substrate der D-HicDH Wildtyp.

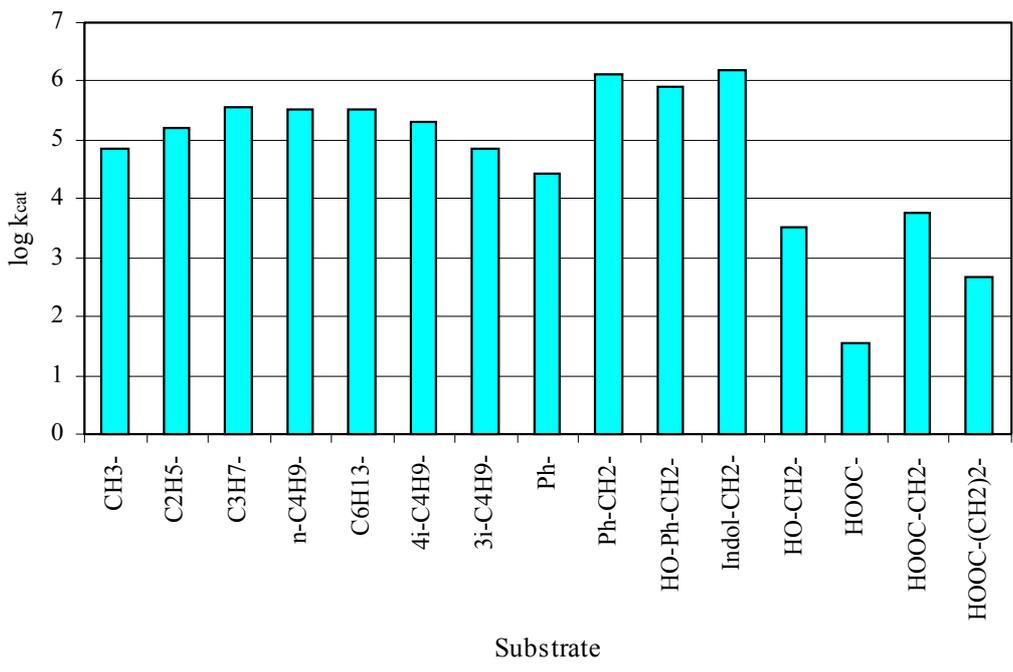


Abb. 26: Darstellung der logarithmischen k_{cat} -Werte verschiedener Substrate der D-HicDH Wildtyp.

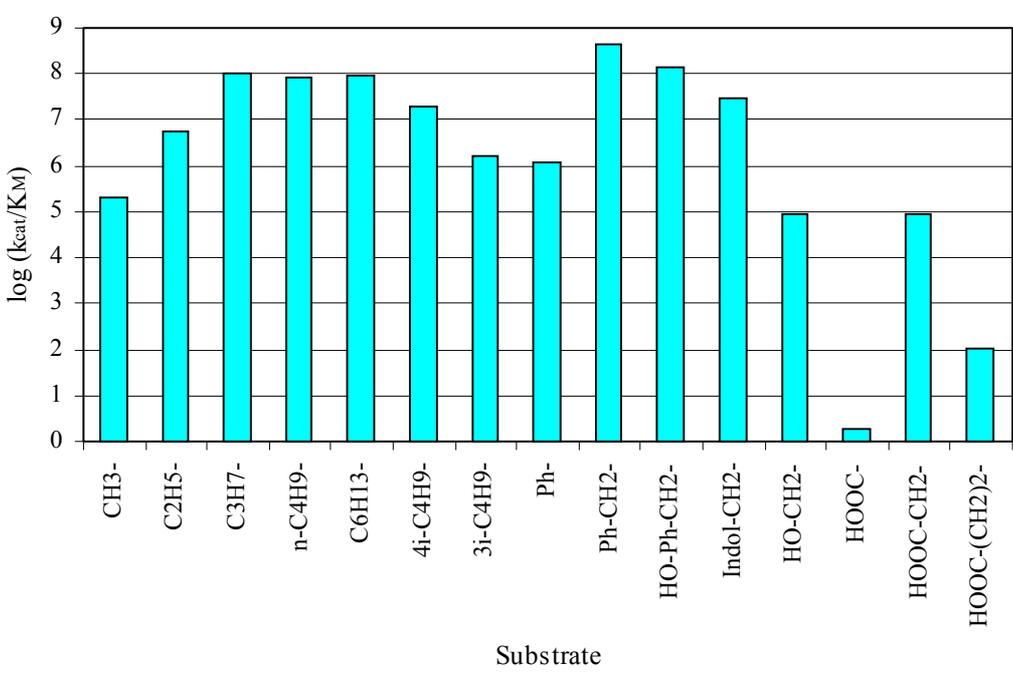


Abb. 27: Darstellung der logarithmischen k_{cat}/K_M -Werte verschiedener Substrate der D-HicDH Wildtyp.

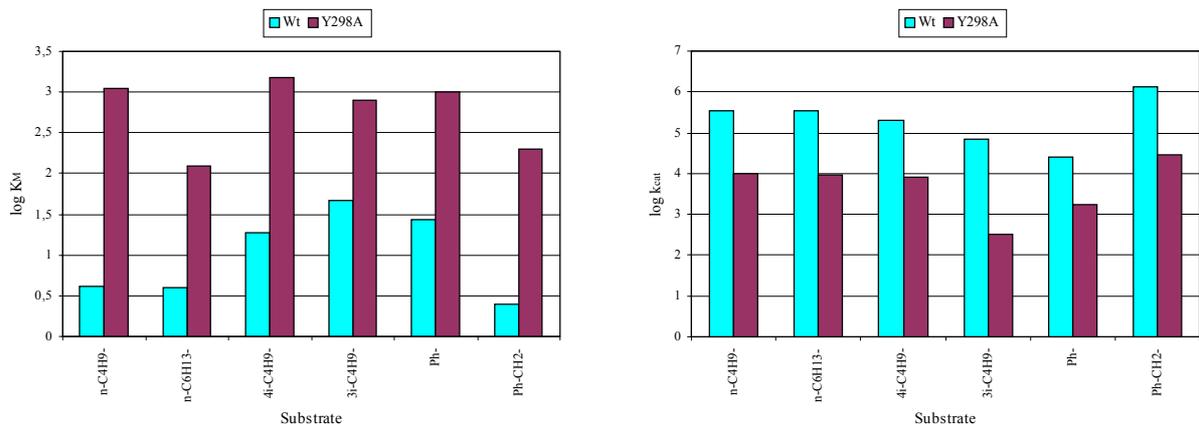


Abb. 28: Darstellung der logarithmischen k_{cat} - bzw. K_M -Werte verschiedener Substrate der D-HicDH Mutante **Y298A**.

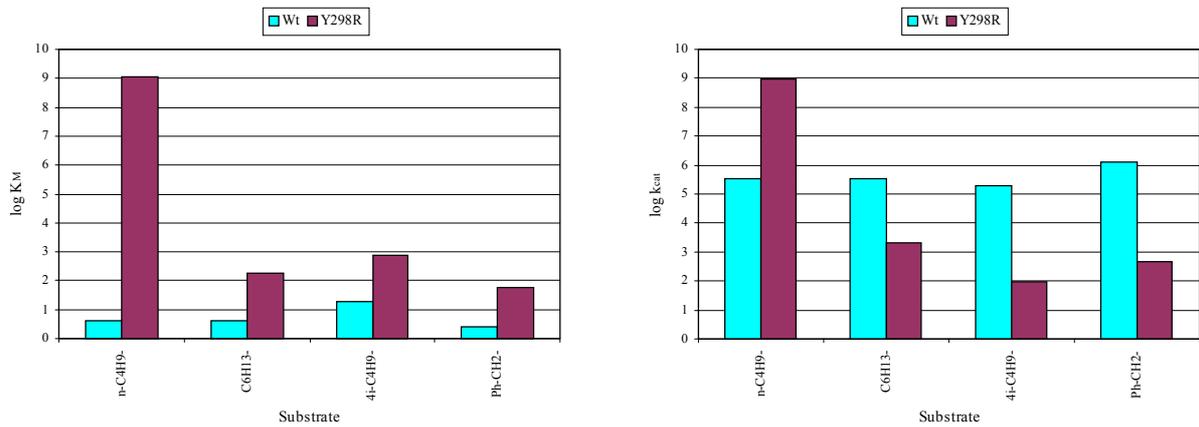


Abb. 29: Darstellung der logarithmischen k_{cat} - bzw. K_M -Werte verschiedener Substrate der D-HicDH Mutante **Y298R**.

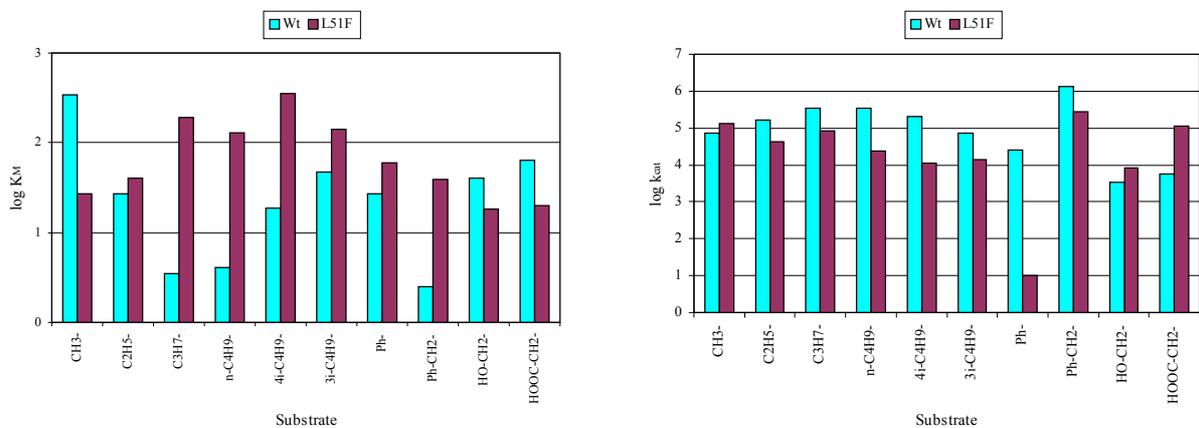


Abb. 30: Darstellung der logarithmischen k_{cat} - bzw. K_M -Werte verschiedener Substrate der D-HicDH Mutante **L51F**.

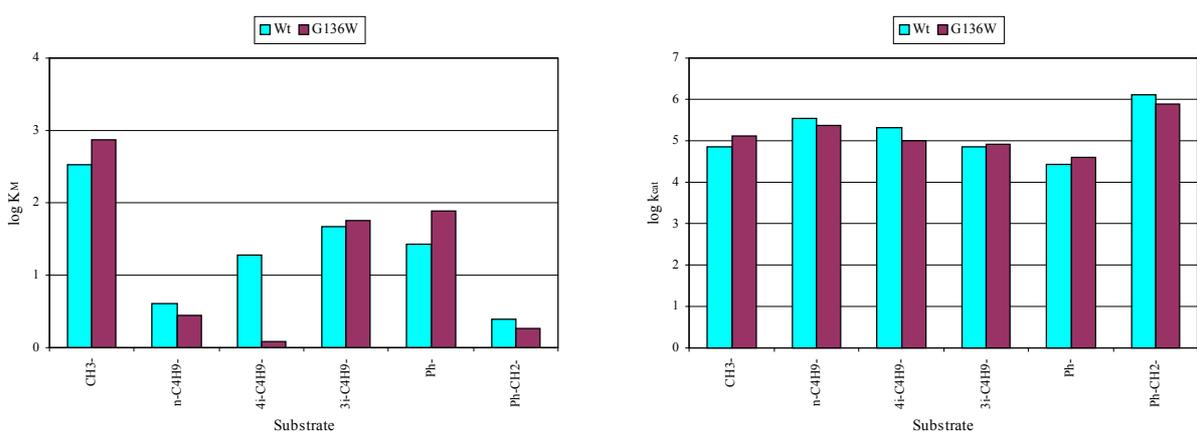


Abb. 31: Darstellung der logarithmischen k_{cat} - bzw. K_M -Werte verschiedener Substrate der D-HicDH Mutante **G136W**.

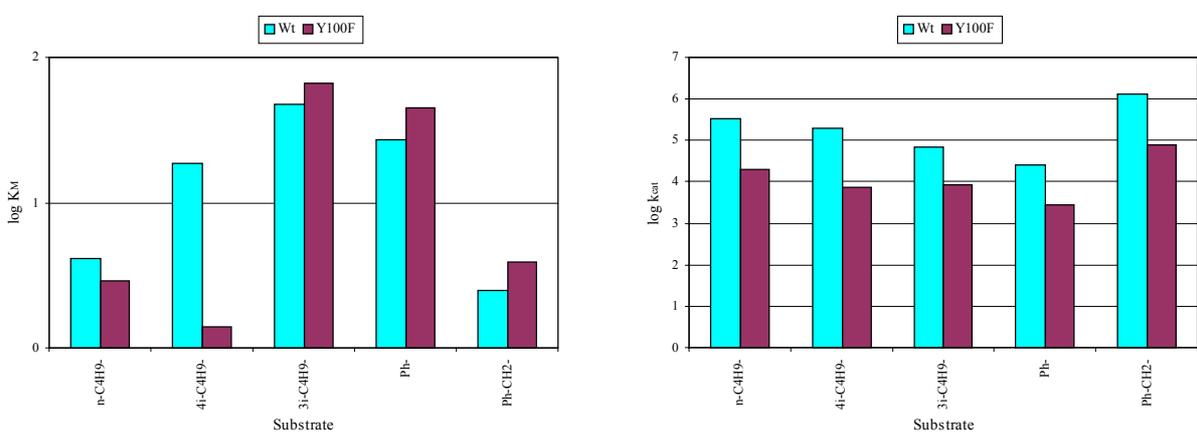


Abb. 32: Darstellung der logarithmischen k_{cat} - bzw. K_M -Werte verschiedener Substrate der D-HicDH Mutante **Y100F**.

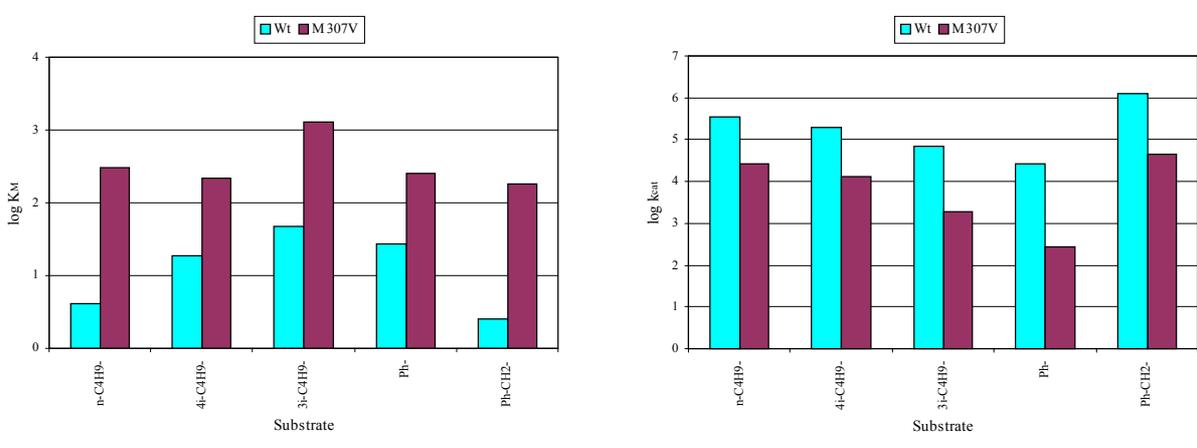


Abb. 33: Darstellung der logarithmischen k_{cat} - bzw. K_M -Werte verschiedener Substrate der D-HicDH Mutante **M307V**.

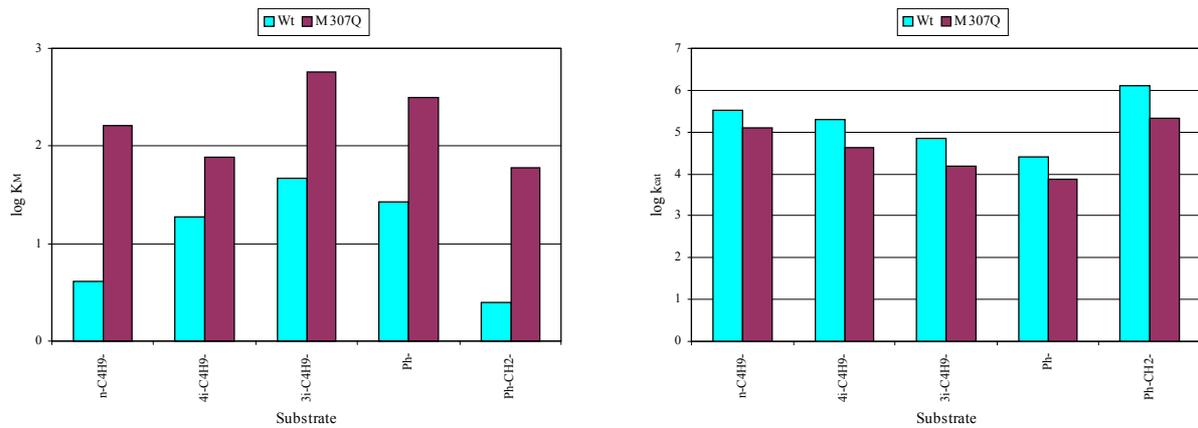


Abb. 34: Darstellung der logarithmischen k_{cat} - bzw. K_M -Werte verschiedener Substrate der D-HicDH Mutante **M307Q**.

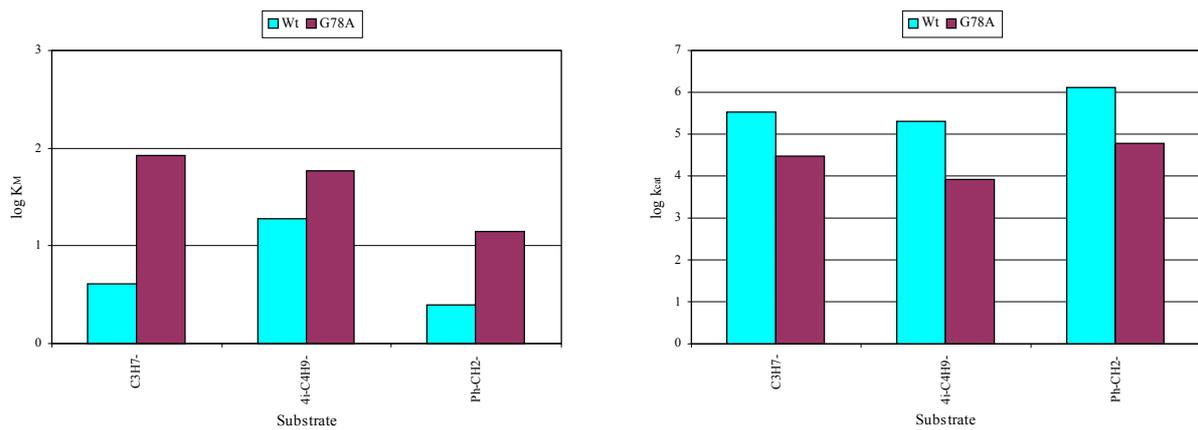


Abb. 35: Darstellung der logarithmischen k_{cat} - bzw. K_M -Werte verschiedener Substrate der D-HicDH Mutante **G78A**.

In der Abbildung 36 sind die Auftragungen der logarithmischen effektiven Aktivitäten k_{cat}/K_M von der jeweiligen Mutante im Verhältnis zum Wildtyp dargestellt.

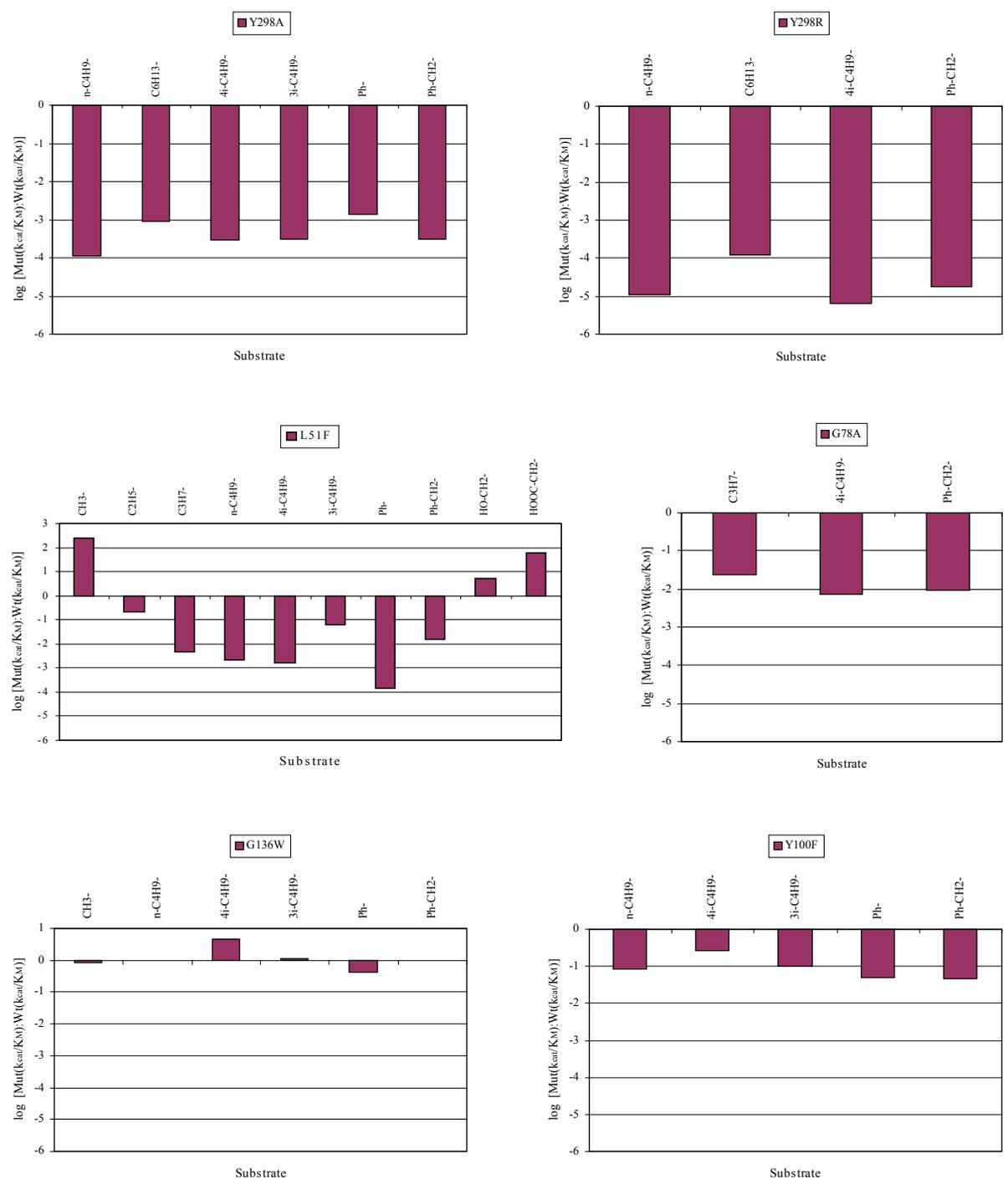


Abb. 36: Auftragungen der logarithmischen effektiven Aktivitäten k_{cat}/K_M jeder Mutante im Verhältnis zum Wildtyp.

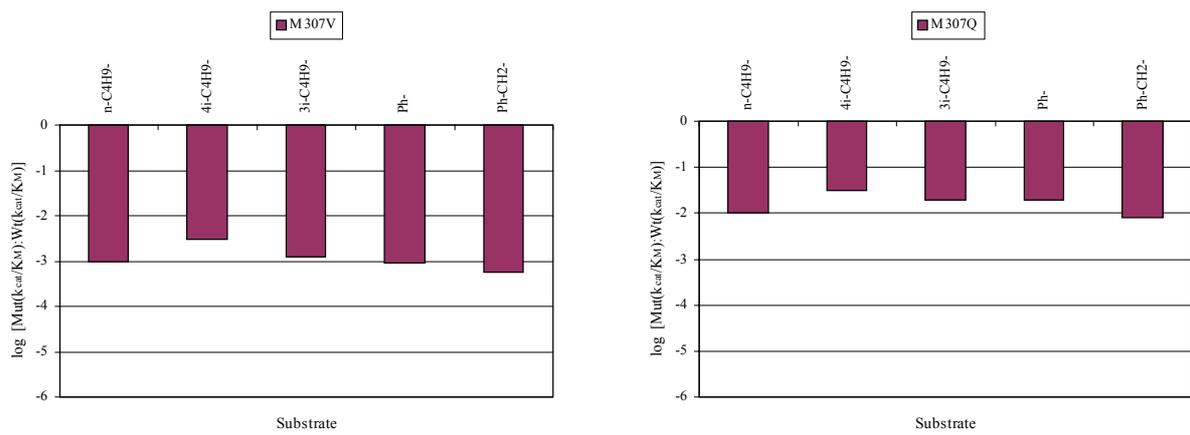
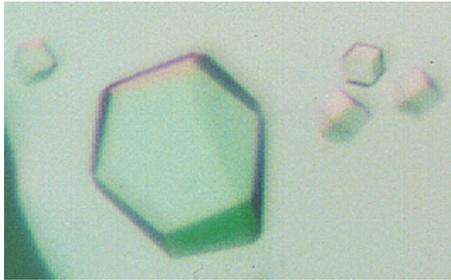


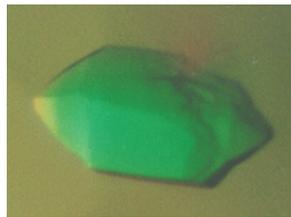
Abb. 36: Auftragungen der logarithmischen effektiven Aktivitäten k_{cat}/K_M jeder Mutante im Verhältnis zum Wildtyp (Fortsetzung).

4.1.5 Kristallisation

Kristalle der D-HicDH erhält man in unterschiedlichen Kristallformen und unter verschiedenen Kristallisationsbedingungen. Abbildung 37 zeigt einige Resultate exemplarisch, die bei 20°C mit dem Verfahren des hängenden Tropfen gewachsen sind.



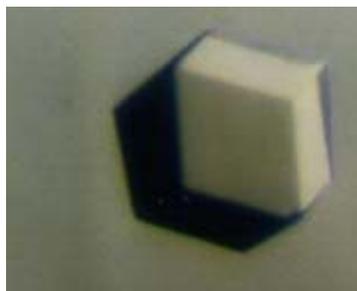
(a)
D-HicDH Wildtyp,
hexagonal, $0.3 \times 0.3 \times 0.1 \text{ mm}^3$,
kubisch verwachsene Kristalle,
2.0 M Ammoniumsulfat pH 6.8, 1 % 1,2,3-Hexantriol.



(b)
hexagonale Kristalle,
D-HicDH wt, $0.5 \times 0.1 \times 0.1 \text{ mm}^3$,
1.8 M Ammoniumsulfat pH 7.3.



(c)
D-HicDH-Mutante Y100F,
hexagonale Kristallform,
 $1.0 \times 0.5 \times 0.2 \text{ mm}^3$,
1.9 M Ammoniumsulfat pH 7.1



(d)
D-HicDH-Mutante Y100F,
kubische Kristallform,
 $0.3 \times 0.3 \times 0.2 \text{ mm}^3$ (links) und
 $0.6 \times 0.5 \times 0.3 \text{ mm}^3$ (rechts),
2.1 M Ammoniumsulfat,
pH 7.1 (links), pH 7.0 (rechts).

Abb. 37a-e: D-HicDH-Kristalle unter verschiedenen Kristallisationsbedingungen.



(e)
D-HicDH-Mutante Y100F,
hexagonale und kubische Kristallform nebeneinander,
 $0.3 \cdot 0.3 \cdot 0.2 \text{ mm}^3$ (kubisch) und
 $0.7 \cdot 0.2 \cdot 0.1 \text{ mm}^3$ (hexagonal),
2.0 M Ammoniumsulfat pH 7.1.

Abb. 37a-e: D-HicDH-Kristalle unter verschiedenen Kristallisationsbedingungen (Fortsetzung).

4.1.6 Röntgendiffraktionsmessung

Ein hexagonaler und ein kubischer Kristall wurden am DESY, Messplatz BW7B/EMBL, mit Synchrotronstrahlung vermessen. Jeweils ein niedrig- und ein hochauflösender Datensatz ergeben einen kompletten Datensatz für jeden Kristall. Die Abbildungen 38 und 39 zeigen je ein Beugungsbild des niedrig- und des hochauflösenden kubischen Datensatzes. In Tabelle 24 sind die Statistikwerte des hexagonalen und kubischen Datensatzes aufgeführt.

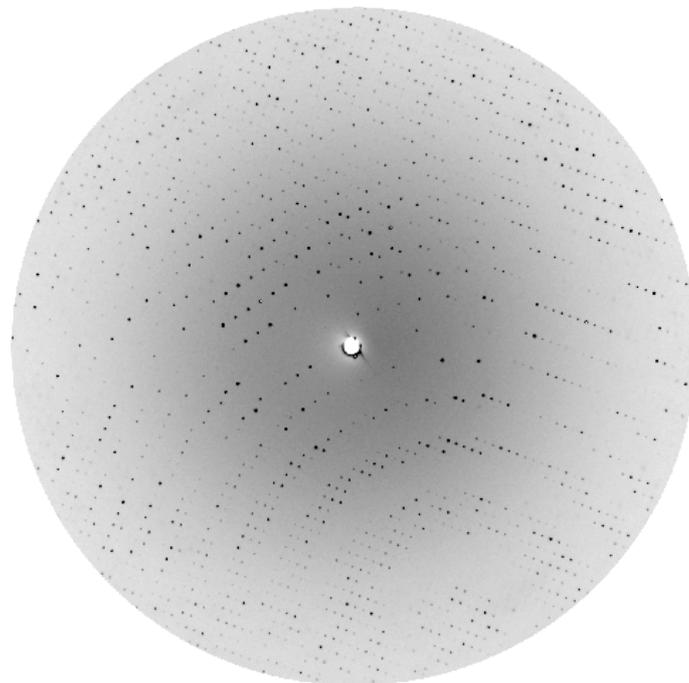


Abb. 38: Beugungsbild des niedrigauflösten kubischen Datensatzes (3.85-100 Å Auflösung).

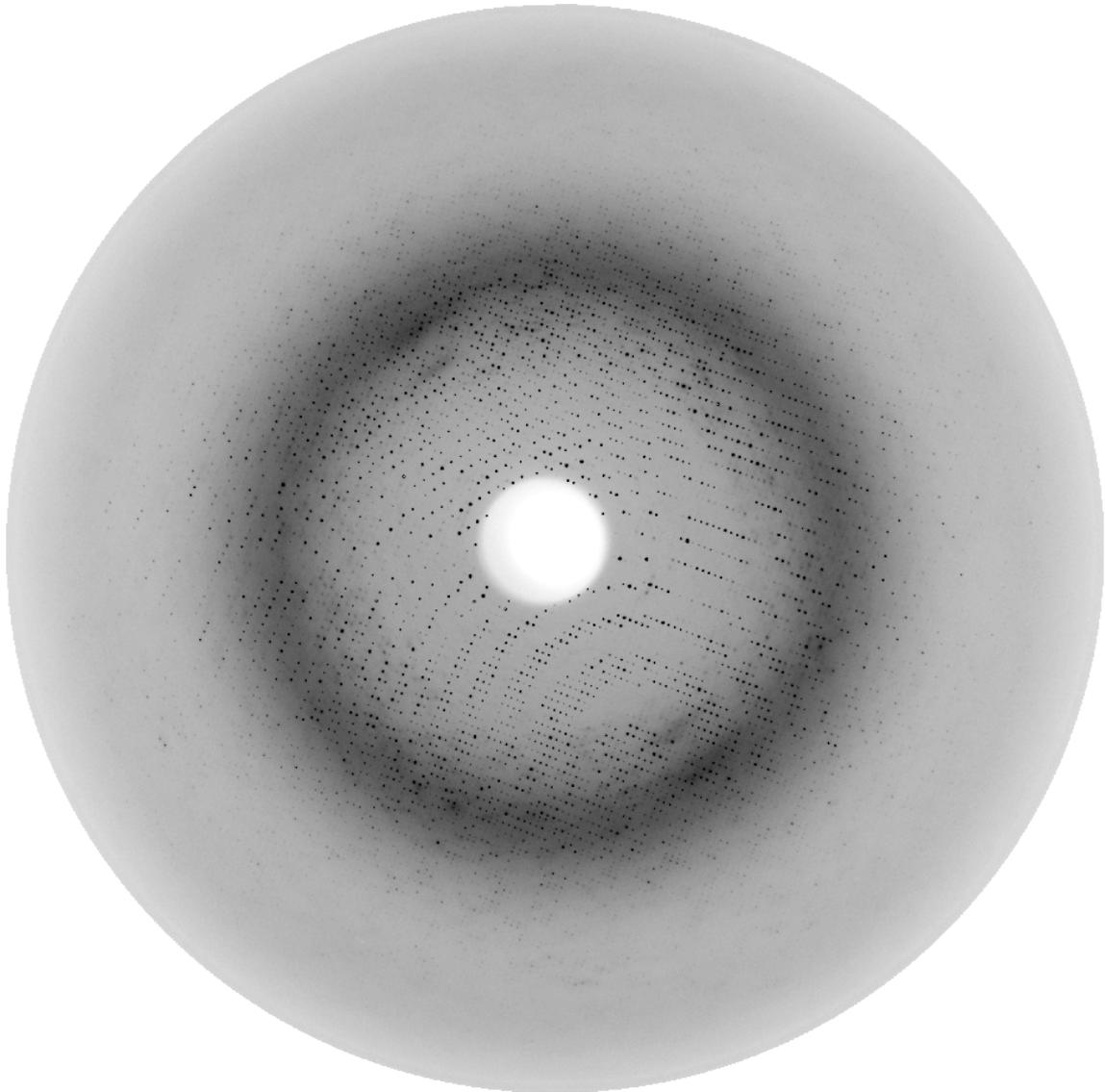


Abb. 39: Beugungsbild des hochaufgelösten kubischen Datensatzes (2.0-18.0 Å Auflösung).

Tabelle 24: Statistikwerte des hexagonalen und des kubischen Datensatzes der D-HicDH wt, h. A.: höchste Auflösungsschale, ASE: asymmetrische Einheit

Datensatz	hexagonal	kubisch
Raumgruppe	P6 ₃	P4 ₃ 2
Gesamtzahl Reflexe	335 357	314 848
unabhängige Reflexe	94 876	38 734
Multiplizität	3.5	8.1
Auflösung gesamt (h. A.) [Å]	1.87-100 (1.87-1.94)	2.0-60 (2.0-2.07)
I/σ gesamt (h. A.)	19.3 (2.0)	39.5 (4.5)
Vollständigkeit gesamt (h. A.) [%]	93.3 (80.3)	99.3 (98.6)
R _{sym} gesamt (h. A.) [%]	6.3 (43.9)	4.4 (43.3)
Zellkonstanten	a, b = 131.32 Å, c = 125.59 Å α, β = 90°, γ = 120°	a, b, c = 149.33 Å α, β, γ = 90°
Anzahl Monomere in ASE	1	2
Matthews Koeffizient V _M [Å ³ Da ⁻¹]	4.24	3.76
Lösungsmittelgehalt im Kristall [%]	70.8	67.0
Wilson B-Faktor	27.125	26.018
Reflexe in Testdatensatz	1898 (2 %)	1549 (4 %)
Suchmodell D-HicDH (PDB: 1DXY)	Monomer	NAD-Domäne
Rotationswinkel zum Suchmodell	18.92, 40.19, 171.47	166.36, 64.90, 146.05
Translationsvektoren z. Suchmodell	0.4198, 0.8790, 0.3911	0.7077, 0.7645, 0.5237

Aus dem Programm TRUNCATE (CCP4) erhält man die Auftragung der kumulativen Intensitätsverteilung, die einen ersten Hinweis auf eine Verzwilligung des Kristalls liefern kann. In Abbildung 40 kann man deutlich erkennen, dass der Kurvenverlauf zwischen theoretischer und berechneter Intensitätsverteilung beim hexagonalen Datensatz stark voneinander abweichen. Beim kubischen Datensatz liegen die Kurven dagegen gut übereinander.

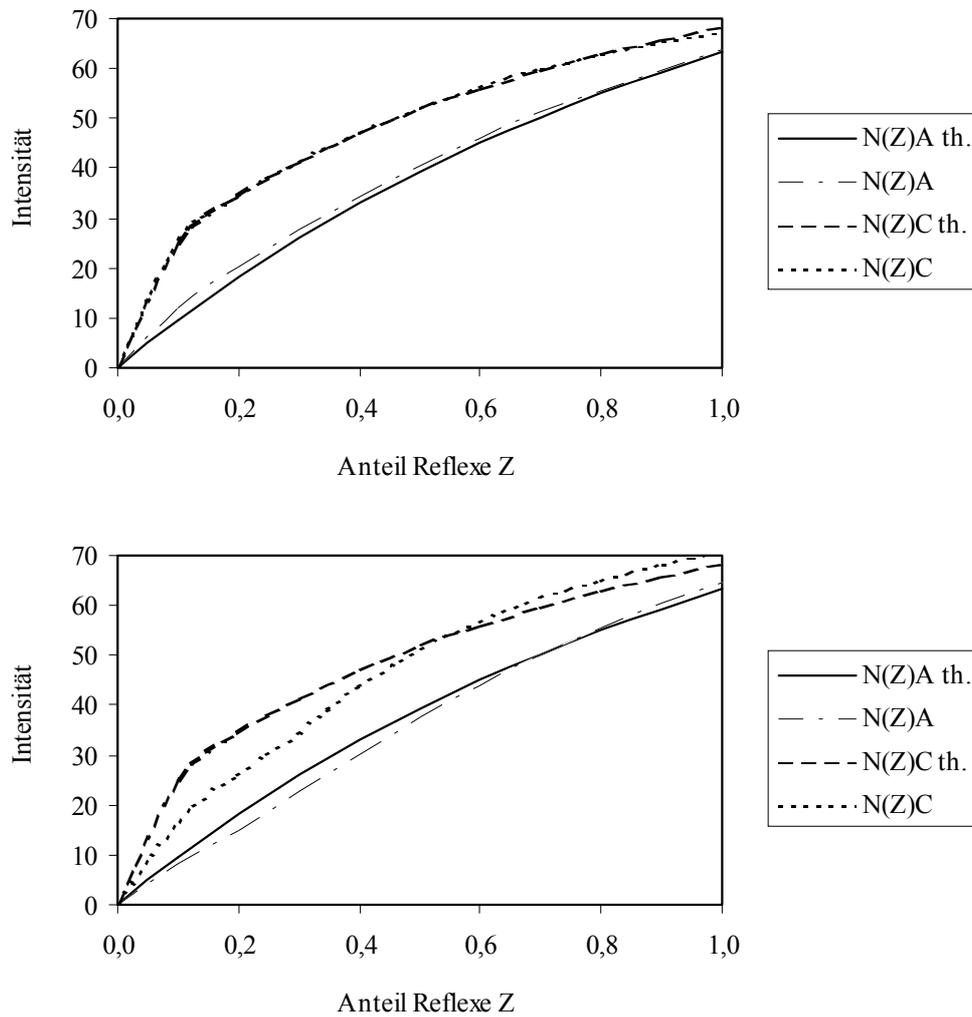


Abb. 40: Kumulative Intensitätsverteilung der azentrischen (A) und zentrischen (C) Reflexe des kubischen (oben) und des hexagonalen (unten) Datensatzes aus TRUNCATE im Vergleich zu theoretisch (th.) berechneten Verteilungen.

Ein Verzwilligungstest des Datensatzes erfolgt mit dem Programm DETECT_TWANNING aus CNS. In Tabelle 25 befinden sich die berechneten Werte für beide Datensätze.

Tabelle 25: Verzwillingungstest des kubischen und des hexagonalen Datensatzes mit dem Programm DETECT_TWIDDLING aus CNS, I: Intensität, F: Strukturfaktor, der Index m steht für die entsprechenden Mittelwerte.

	theoretisch	theor. für Zwilling	kub. Datensatz	hex. Datensatz
$*I^{*2} : *I_m^{*2}$	2.0	1.5	2.1018	2.1608
$*F^{*2} : 2 *F_m^{*2}$	0.785	0.865	0.7724	0.8027

Für den hexagonalen Datensatz wird eine Verzwillingung von 50 % gefunden mit dem Zwillingoperator: h, -h, -k, -l.

Für den kubischen Datensatz sind die Verfeinerungsschritte der Struktur (mit CNS) unter Angabe der R-Werte des Test- (R_{test}) und Arbeitsdatensatzes (R_{work}) in Tabelle 26 angegeben.

Tabelle 26: Strukturverfeinerungsschritte des kubischen Datensatzes mit CNS, R_{test} : freier R-Wert, R_{work} : R-Wert des Arbeitsdatensatzes, AS: Aminosäuren, PY: Phenylpyruvat, GOL: Glycerin.

Verfeinerungsprogramm	R_{test} [%]	R_{work} [%]	Moleküle in Struktur
refine	30.5	28.3	330 AS
refine, water_pick	27.7	25.3	330 AS, PY, NAD, 144 H ₂ O
minimize	25.0	22.1	331 AS, PY, NAD, 5 GOL, 254 H ₂ O
refine ohne annealing	24.3	21.7	331 AS, PY, NAD, 6 GOL, 242 H ₂ O, AS-Reste* ohne Dichte aus der Verfeinerung genommen

* die Seitenketten folgender AS-Reste sind aus der Verfeinerung genommen worden:

Lysine 2, 21, 43, 70, 88, 180, 272, 277, 321 und Glutamate 209 und 323.

Der hexagonale Datensatz wurde erst in der Raumgruppe P6₃22 verfeinert, bis die R-Werte konstant blieben. Diese Struktur dient für die Auswertung der Beugungsdaten in der Raumgruppe P6₃ als Modell. In Tabelle 27 sind die Verfeinerungsschritte der Struktur aus dem hexagonalen Datensatzes aufgeführt.

Tabelle 27: Strukturverfeinerungsschritte des hexagonalen Datensatzes mit CNS, R_{test} : R-Wert des Testdatensatzes, R_{work} : R-Wert des Arbeitsdatensatzes, AS: Aminosäuren, OCA: 2-Ketocaproat, SO4: Sulfat, GOL: Glycerin, UE: Untereinheit

Verfeinerungsprogramm	R_{test} [%]	R_{work} [%]	Moleküle in Struktur
refine (P6 ₃ 22)	31.4	29.3	330 AS
refine, water_pick (P6 ₃ 22)	28.9	27.0	332 AS, OCA, NAD, 3 GOL, 178 H ₂ O
minimize (P6 ₃ 22)	29.0	25.1	330 AS, OCA/SO4 (0.8:0.2), NAD, 4 GOL, 212 H ₂ O
refmac (CCP4) (P6 ₃ 22)	28.1	24.6	s.o.
refine (P6 ₃), w_a : 0.5	26.3	23.1	s.o.
anneal/minimize/bindividual P6 ₃ -Zwilling	25.5	20.4	2x 331 AS, 2x OCA/SO4 (0.75:0.25), 2x NAD, 2x 4 GOL, 443 H ₂ O (UE-a: 222, UE-b: 221)

4.1.7 Strukturvergleiche

4.1.7.1 Die Strukturen der D-HicDH

Die Monomerstrukturen des kubischen, der beiden P6₃-Zwillings-Untereinheiten und des bekannten P6₃22 (1DXY) Datensatzes werden miteinander verglichen.

4.1.7.1.1 Vergleich der Gesamtstrukturen

Unterschiedliche Verläufe der Peptidketten (AS 1-330) zwischen jeweils zwei Monomerstrukturen werden mit dem Programm PROFIT ermittelt. Die mittlere Abweichungen sind in Tabelle 28 aufgeführt. Graphisch sind die Abweichungen exemplarisch für die Strukturpaare P4₃32/P6₃22 (1DXY) und die beiden Untereinheiten des P6₃-Zwillings in Abbildung 41 dargestellt. Die beiden symmetrischeren Datensätze sind sich sehr ähnlich, unterscheiden sich nur in den beiden großen Loop-Regionen der NAD-Domäne (AS 180-190,

260-280), dem C-Terminus und in der Substratdomäne (AS 1-100), die etwas verschoben ist. Die beiden Untereinheiten des P₆₃-Zwillings dagegen unterscheiden sich im gesamten Peptidbereich stärker voneinander. Nur die b-Untereinheit ähnelt der Struktur der symmetrischeren hexagonalen Raumgruppe (Abb. 42).

Tabelle 28: Mit PROFIT ermittelte mittlere Abweichungen (RMS in Å) der vier D-HicDH-Strukturen. UE: Untereinheit.

Datensätze	P ₆ ₃ 22	P ₆ ₃ -Zw. UE a	P ₆ ₃ -Zw. UE b
P ₄ ₃ 32	0.615	0.953	0.820
P ₆ ₃ 22	-	0.866	0.642
P ₆ ₃ UE a	-	-	1.022

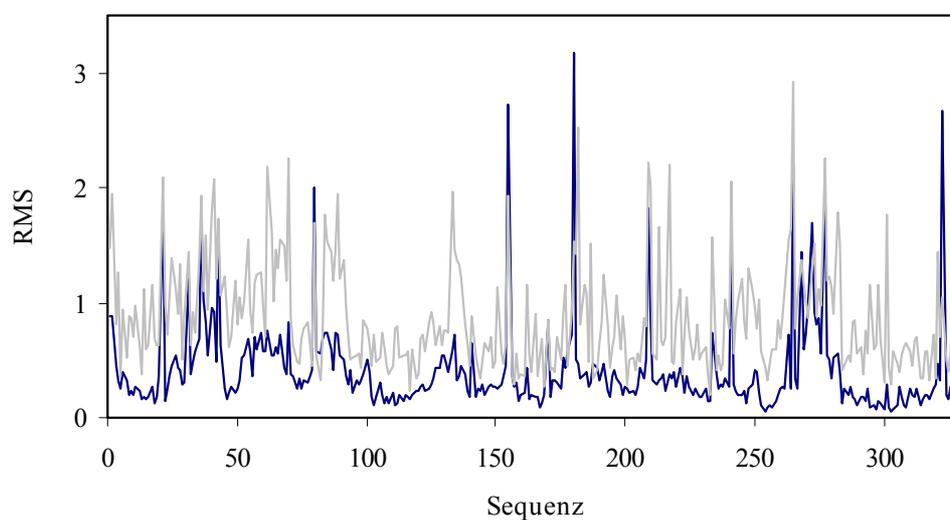


Abb. 41: Mit PROFIT ermittelte Abweichungen (RMS in Å) der D-HicDH Strukturen voneinander. Vergleich der Strukturpaare P₄₃32/P₆₃22 (1DXY) (schwarz) und der beiden Untereinheiten des P₆₃-Zwillings (grau).

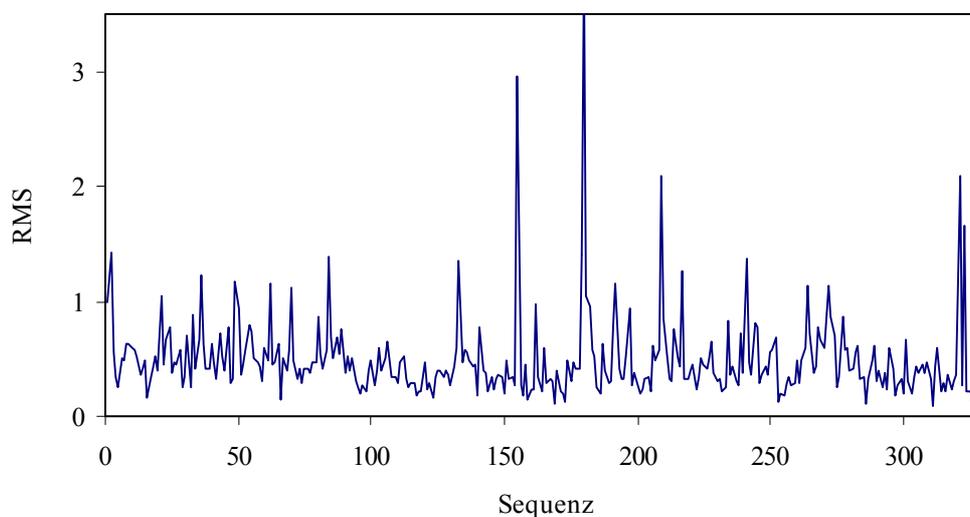


Abb. 42: Mit PROFIT ermittelte Abweichungen (RMS in Å) der D-HicDH Strukturen voneinander. Vergleich des Strukturpaares P6₃22 (1DXY)/b-Untereinheit des P6₃-Zwillings.

4.1.7.1.2 Öffnungswinkel zwischen den Domänen

Die Öffnungswinkel zwischen der Substrat- und der NAD-Domäne werden mit dem Programm DYNDOM (aus CCP4) ermittelt. Als Referenzstruktur dient die Struktur der Formiat Dehydrogenase (2NAD). Die ermittelten Werte in Tabelle 29 zeigen, dass sich die Winkel zwischen den Domänen nicht wesentlich voneinander unterscheiden. In Abbildung 43 sind die C α -Atome der vier Strukturen dargestellt. Die jeweiligen NAD-Domänen (AS 110-295) sind übereinander gelegt.

Tabelle 29: Öffnungswinkel der D-HicDH-Strukturen zwischen der Substrat- und der NAD-Domäne, ermittelt mit dem Programm DYNDOM (aus CCP4). Referenzstruktur: Formiat-Dehydrogenase (2NAD). UE: Untereinheit.

Struktur	Öffnungswinkel vgl. mit 2NAD	Öffnungswinkel vgl. mit 1DXY
P4 ₃ 32 (kubisch)	45.6°	0.3°
P6 ₃ 22 (1DXY)	45.3°	-
P6 ₃ -Zwilling UE-a	48.4°	3.1°
P6 ₃ -Zwilling UE-b	48.2°	2.9°

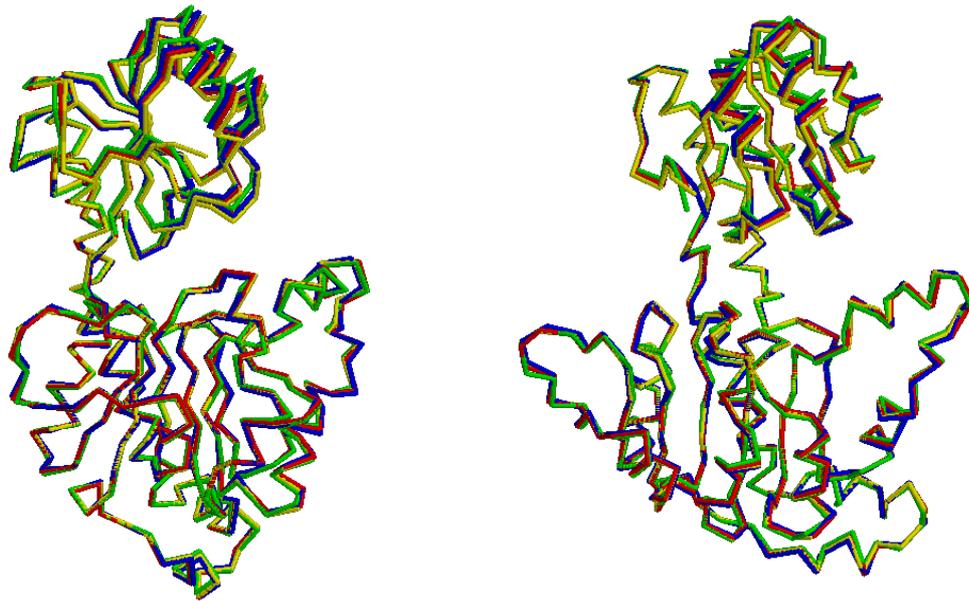


Abb. 43: Die vier Strukturen der D-HicDH Monomere. Die NAD-Domänen (AS 110-295) sind jeweils übereinander gelegt. Die Strukturen sind mit ihrer Raumgruppe bezeichnet. P₆₃,22 (1DXY): rot, P₄₃,32: gelb, P₆₃-Zwilling Untereinheit a: grün, P₆₃-Zwilling Untereinheit b: blau.

4.1.7.1.3 Das aktive Zentrum

Die aktiven Zentren aller drei D-HicDH Strukturen, die jeweils verschiedene Substrate gebunden haben, werden miteinander verglichen. Dabei werden Effekte vernachlässigt, die durch die unterschiedlichen Raumgruppen der Struktur bedingt sein könnten. Abbildung 44 zeigt verschiedene Perspektiven der übereinander gelegten aktiven Zentren mit den drei Substraten. Die verschiedenen Atomabstände der Substrate zu den nächsten Aminosäureresten sind in Tabelle 30 aufgeführt. Die Nummerierung der Substratome erfolgt analog Abbildung 45.

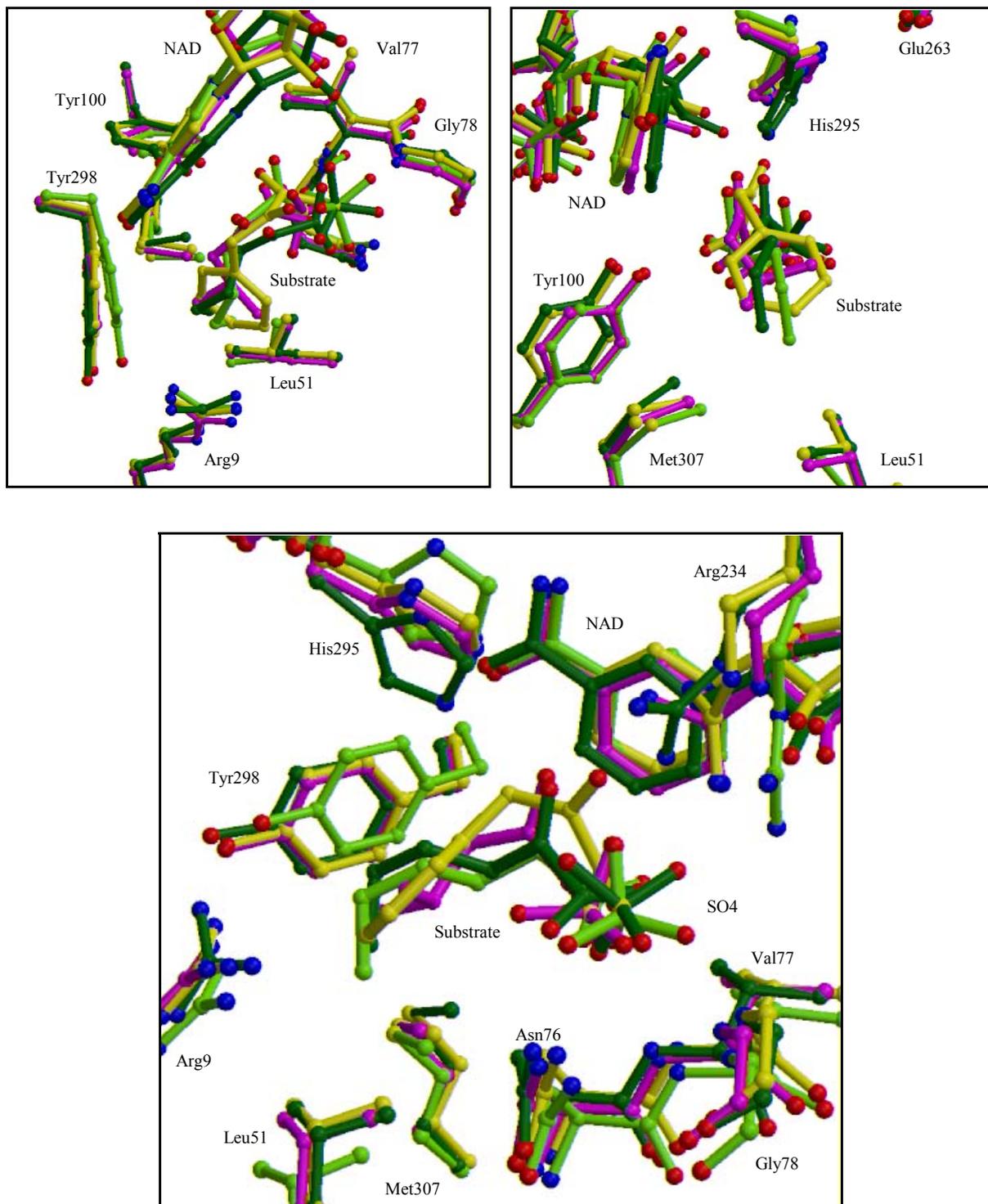


Abb. 44: Das aktive Zentrum der vier D-HicDH-Monomere aus drei Perspektiven (oben links: Blick aus der NAD-Domäne von oben auf das aktive Zentrum, oben links: Blick aus dem aktiven Spalt von hinten auf die Substrate, unten: Blick seitlich auf das aktive Zentrum mit NAD-Domäne oben und Substrat-Domäne unten). Die NAD-Domänen (AS 110-295) sind jeweils übereinander gelegt (BRAGI). P₆₃22 (1DXY): pink, P₄32: gelb, P₆₃-Zwilling Untereinheit a: hellgrün, P₆₃-Zwilling Untereinheit b: dunkelgrün.

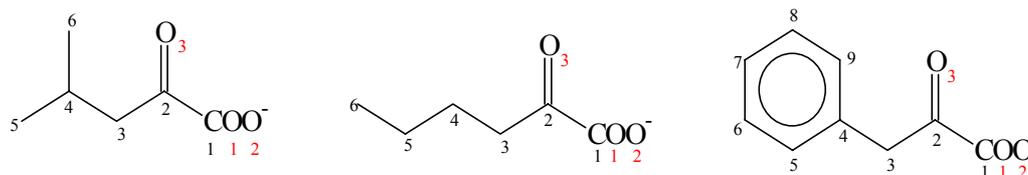


Abb. 45: Nummerierung der Substratome, links: 2-Ketoisocaproat (OIC), mitte: 2-Ketocaproat (OCA), rechts: Phenylpyruvat (PY).

Tabelle 30: Atomabstände Substrat-Aminosäurereste in den vier aktiven Zentren der D-HicDH in Å. Abstände unter 3 Å sind fett gedruckt.

Substratom	Aminosäurereste	P6 ₃ 22 (1DXY)	P4 ₃ 32	P6 ₃ UE a	P6 ₃ UE b
		OIC/SO ₄	PY	OCA/SO ₄	OCA/SO ₄
O ₁	Gly78 N	4.08	3.62	4.17	4.43
	Asn76 ND2	3.74	3.51	3.52	2.56
	Val77 N	4.16	3.75	3.68	4.10
O ₂	Tyr100 OH	2.75	3.18	2.78	5.67
	Val77 N	3.45	3.75	4.14	3.67
	Val77 CG2	-	3.64	3.46	3.56
	Arg234 NH2	4.63	-	4.21	2.94
C ₁	Tyr100 OH	3.57	4.23	3.08	5.72
	C4	2.99	3.07	3.74	3.76
	Arg234 NH2	4.11	-	4.61	2.67
	His295 NE2	5.22	-	6.14	2.87
C ₂	Tyr100 OH	3.54	4.71	3.04	4.89
	NAD NC4	3.58	3.95	3.86	3.82
O ₃	His295 NE2	3.08	3.73	3.82	2.87
	NAD C4N	3.20	4.37	3.24	3.44
	Arg234 NH1	3.40	2.69	6.55	3.80
	Arg234 NH2	4.04	2.99	5.50	2.67
C ₃	Tyr100 OH	3.40	4.44	3.26	4.14
	His295 NE2	4.29	3.35	5.45	3.17
C ₄	C1	2.99	3.07	3.74	3.76
C ₅	Arg9 NH2	4.47	3.12 (C7)	3.73	3.69
	Arg9 NH1	-	-	3.58	3.83
	Y298 CE1	-	-	3.42	-
C ₆	Met307 CE	3.50	4.26 (C7), 3.59 (C5)	3.47	3.41
	Arg9 NH1	3.71	3.46 (C7), 3.83 (C5)	3.26	3.70
	Arg9 NH2	4.44	-	3.13	3.11

Tabelle 30: Atomabstände Substrat-Aminosäurereste in den vier aktiven Zentren der D-HicDH in Å. Abstände < 3 Å sind fett gedruckt. In eckigen Klammern sind die entsprechenden Nummerierungen der Wassermoleküle angegeben.

Substratom	Aminosäurereste	P6,22 (1DXY)	P4,32	P6 ₃ UE a	P6 ₃ UE b
SO ₁₋₄	Arg234 NH2	2.81 (O ₁), 3.89 (O ₂)		2.88 (O2)	2.45 (O4), 2.99 (O3)
	Asn76 ND2	3.08 (O3), 3.43 (O ₂)		2.88 (O1)	3.14 (O1)
	Gly78 N	2.68 (O3)		2.70 (O2)	2.82
	Val77 N	2.76 (O4)		3.27 (O3)	2.59 (O2)
	Ala99 N	2.97 (O1)		-	-
	Tyr100 OH	3.30 (O4)		3.72 (O3)	5.38 (O2)
	Arg234 NH1	3.44 (O1)		-	-
	Arg234 NH2	-		2.88 (O2), 3.35 (O4)	3.83 (O3)
	H2O O	3.43 [515]		3.04 (O1) [414]	3.36 [433]
	H2O O	2.98 [492]		3.31 (O4) [414]	4.10 [390]
	H2O O	3.30 [515]		2.86 (O2) [427]	-
	H2O O	-		2.89 (O1) [427]	-

Analog zu den Substraten im aktiven Zentrum werden in Tabelle 31 die Abstände der Cosubstratome zu den nächstliegenden Aminosäureresten aufgeführt. Die Nummerierung der NAD-Atome ist in Abbildung 46 dargestellt. Dabei werden zwei Atom-Nomenklaturen verwendet, je nach vorangegangenen Struktur-Verfeinerungsprogramm.

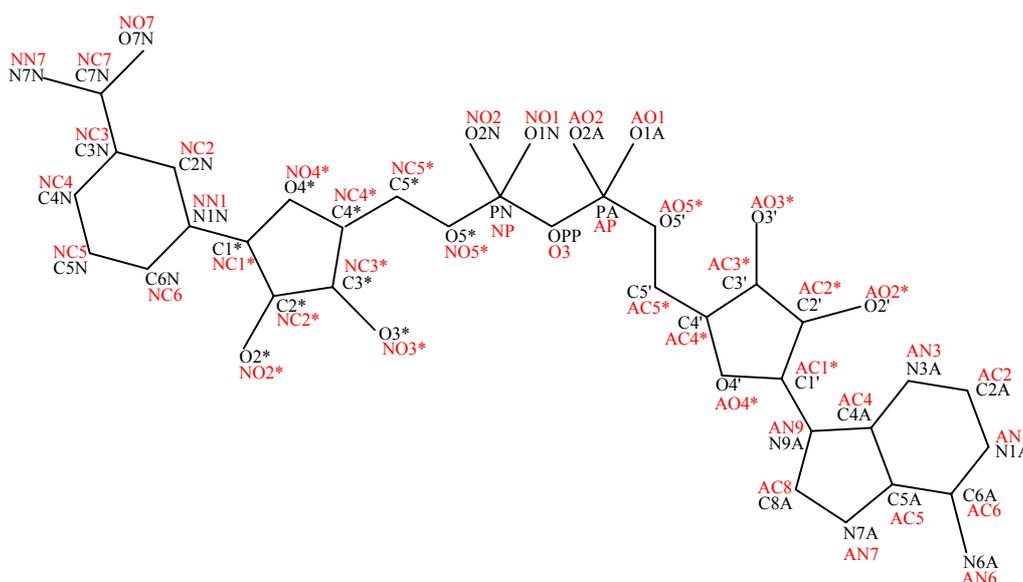


Abb. 46: Nummerierung der NAD-Atome. P6,22 (1DXY): rot, P4,32 und P6₃-Zwilling: schwarz.

Tabelle 31: Atomabstände NAD-Aminosäurereste in den vier aktiven Zentren der D-HicDH in Å. Abstände < 3 Å sind fett gedruckt. In eckigen Klammern sind die entsprechenden Nummerierungen der Wassermoleküle angegeben.

NAD ⁺ -Atom	Aminosäurereste	P6 ₃ 22 (1DXY)	P4 ₃ 32	P6 ₃ UE a	P6 ₃ UE b
		OIC/SO ₄	PY	OCA/SO ₄	OCA/SO ₄
N7N NN7	Thr232 O	2.77	2.98	2.71	2.71
	Asp258 OD2	3.29	3.11	3.66	3.02
	His295 NE2	3.64	3.49	3.37	4.05
	Thr259 CG2	3.69	3.35	3.54	3.18
O7N NO7	His295 CD2	3.40	3.53	3.66	3.45
	His295 NE2	3.68	3.94	3.55	3.44
	Tyr298 CB	3.64	3.39	3.32	3.85
	Tyr298 N	-	3.06	3.27	3.45
	Tyr298 CD1	4.08	-	2.31	3.81
C4N NC4	Tyr100 OH	3.32	3.30	3.45	3.18
	O3	3.20	4.37	3.24	3.44
	C2	3.58	3.95	3.86	3.82
C5N NC5	Tyr100 OH	3.15	3.20	3.18	3.10
O2* NO2*	Arg234 NH2	2.79	2.68	3.16	2.70
	Arg234 NE	3.26	3.85	2.61	2.81
	Arg234 NH1	4.32	3.29	4.59	4.31
	H2O O	3.40 [442]	2.99 [423]	3.36 [413]	2.99 [419]
O3* NO3*	Val205 O	3.01	2.54	2.47	2.97
	H2O O	3.49 [442]	3.38 [423]	-	3.22 [419]
O4* NO4*	H ₂ O O	2.98 [343]	2.77 [365]	-	3.51 [529]
O1N NO1	Ile156 N	2.96	2.90	2.51	3.33
	H ₂ O O	2.78 [341]	2.63 [360]	3.10 [559]	3.19 [554]
O2N NO2	H ₂ O O	2.75 [419]	2.78 [456]	-	2.72 [557]
	H ₂ O O	2.98 [420]	3.00 [372]	-	
	NAD O2A		3.49	3.28	3.65
O2A AO2	His 155 N	2.98	3.02	3.36	2.73
	His 155 ND1	3.03	3.11	3.89	3.26
	H ₂ O O	2.77 [468]	2.92 [560]	5.15 [560]	4.22 [554]
O5' AO5*	Gly154 CA	3.19	3.56	3.69	3.60
	H ₂ O O	3.42 [341]	3.29 [360]	4.23 [560]	2.99 [554]
O3' AO3*	Asp175 OD2	2.85	2.77	2.80	3.12
	H ₂ O O	3.69 [360]	2.79 [559]	2.91 [368]	3.95 [369]
	H ₂ O O	-	3.45 [377]	-	-

Tabelle 31: Fortsetzung.

NAD ⁺ -Atom	Aminosäurereste	P6 ₃ 22 (1DXY)	P4 ₃ 32	P6 ₃ UE a	P6 ₃ UE b
O2' AO2*	Asp175 OD1 H2O O	2.65 3.88 [521]	2.85 3.71 [590]	2.87 -	3.01 -
N3A AN3	Pro176 CD Val205 CG1 Gly152 CA	3.22 3.24 3.48	3.41 3.37 3.40	3.24 3.92 3.68	3.18 3.26 3.56
N6A AN6	Asn211 OD1 Ile214 CD1 H2O O	2.76 3.22 4.24 [512]	2.88 3.22 3.08 [482]	2.40 3.91 3.61 [426]	2.54 4.20 -
N7A AN7	Asn211 ND2 H2O O	3.02 3.67 [512]	3.22 -	3.66 3.27 [426]	3.09 4.18 [432]

4.1.7.2 Die Strukturen der D-Hydroxycarboxylat-Dehydrogenase-Familie

Ein Vergleich mit strukturähnlichen Enzymen, die alle mehrere Monomere in der asymmetrischen Einheitszelle besitzen, zeigt Familienähnlichkeiten und spezifische Unterschiede der D-HicDH. Mit dem Programm PROFIT sind die beiden Untereinheiten jedes ähnlichen Enzyms über den gesamten Sequenzbereich übereinander gelegt worden. Die Abweichungen der D-LDH und der FDH sind exemplarisch in Abbildung 47 aufgetragen. Während sich die beiden FDH-Untereinheiten (mittlere RMS: 0.471 Å) nur kaum voneinander unterscheiden, sind bei D-LDH (mittlere RMS: 1.268 Å) und D-PGDH (mittlere RMS: 1.733 Å, hier nicht abgebildet) erhebliche Unterschiede zwischen den Untereinheiten erkennbar. Bei der D-LDH sind die größten Abweichungen in der Substratdomäne und im C-Terminus zu beobachten.

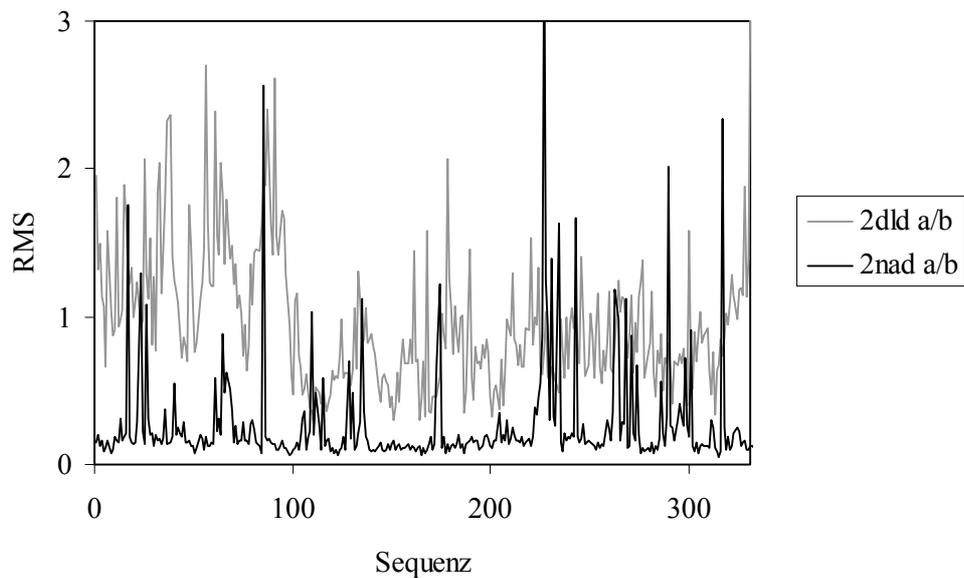


Abb. 47: Mit PROFIT ermittelte Abweichungen (RMS in Å) der beiden Untereinheiten ähnlicher D-HicDH-Strukturen. Vergleich der D-LDH-Untereinheiten (2DLN) (grau) und der FDH-Untereinheiten (2NAD) (schwarz).

Da die D-LDH der D-HicDH sowohl von der Sequenz als auch von der Struktur (z.B. Öffnungswinkel zwischen den beiden Domänen) am ähnlichsten ist, werden die D-HicDH-Strukturen mit den Strukturen der beiden D-LDH-Untereinheiten verglichen (Abb.48). Die drei Außenloops der NAD-Domäne zeigen bei der D-LDH Abweichungen, das restliche Peptidgerüst liegt genau auf den D-LDH-Strukturen. Die Substratdomäne der D-LDH ist etwas verdreht gegenüber der D-HicDH, aber ihr Öffnungswinkel zwischen den beiden Domänen ist etwa genau so groß.

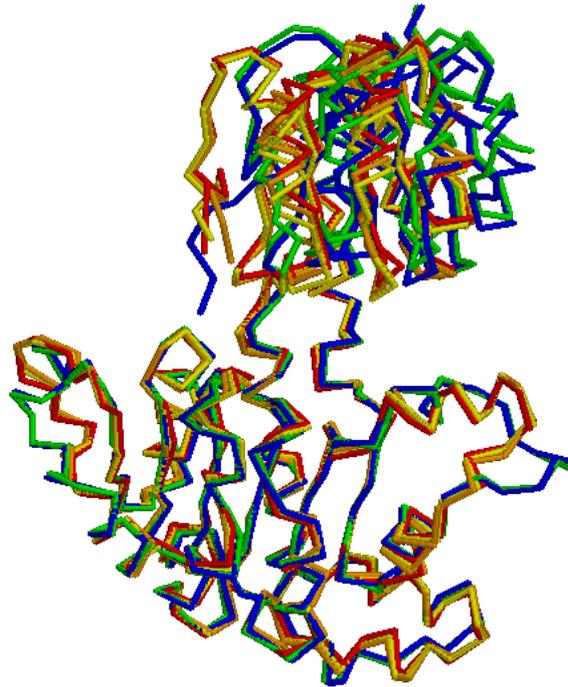


Abb. 48: Die Strukturen der D-HicDH und der D-LDH Monomere. Die NAD-Domänen (AS 110-295, D-HicDH und AS 112-297, D-LDH (2DL)) sind jeweils übereinander gelegt. D-HicDH-Strukturen: P4₃32 (gelb), P6₃-Zwilling Untereinheit a (rot), P6₃-Zwilling Untereinheit b (orange). D-LDH-Strukturen: Untereinheit a (blau), Untereinheit b (grün).

4.2 Phytochrom

4.2.1 Aufreinigung

Die Aufreinigung der beiden Phytochromfragmente erfolgt nach dem Schema in Abbildung 49.

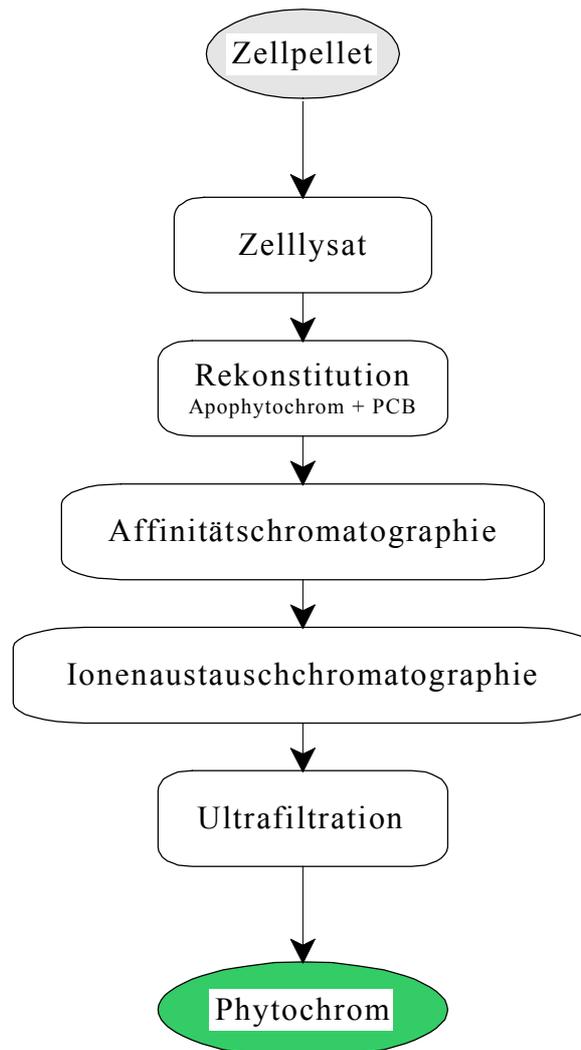


Abb. 49: Aufreinigungsschema von Phytochrom.

Das rekonstituierte Phytochrom wird auf eine Anionenaustauschersäule gegeben, um nicht rekonstituiertes Apoprotein von dem restlichen Holoprotein abzutrennen. In den Abbildungen 50 a und b sind die Ionenaustauschchromatogramme des 59 kDa- und 65 kDa-Phytochroms abgebildet mit den Extinktionen bei 280 nm (Holo- und Apoprotein) und 654 nm (Holoprotein,

P_r -Form). Die Phytochromlösung wird vor dem Auftrag auf die Säule dunkelrot belichtet und liegt so in der einheitlicheren P_r -Form vor. Die Fraktionen mit dem höchsten A_{654}/A_{280} -Verhältnis werden photometrisch bestimmt. Nach gelelektrophoretischer Analyse werden die einheitlichen Fraktionen vereinigt und für weitere Charakterisierungen und die Kristallisation entsprechend durch Ultrafiltration umgepuffert bzw. aufkonzentriert.

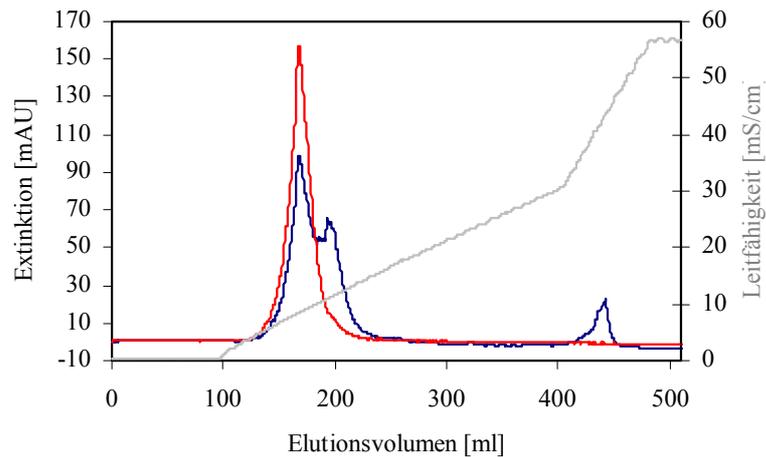


Abb. 50 a: Ionenaustauschchromatogramm des 59 kDa-Phytochroms A auf einer Mono Q HR 10/10-Säule von Pharmacia, Laufmedium: 20 mM Bis-Tris pH 7.0, 1 mM DTT, 0-1.0 M NaCl-Gradient, Flußgeschwindigkeit: 1 ml/min, 10°C. Rot: A_{654} , blau: A_{280} , grau: Leitfähigkeit.

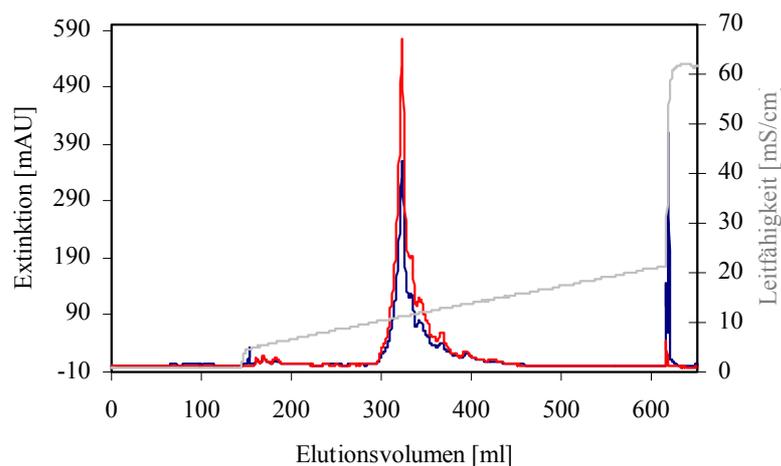


Abb. 50 b: Ionenaustauschchromatogramm des 65 kDa-Phytochroms A auf einer Mono Q HR 10/10-Säule von Pharmacia, Laufmedium: 25 mM Bis-Tris pH 6.7, 1 mM DTT, 0-1.0 M NaCl-Gradient, Flußgeschwindigkeit: 2 ml/min, 10°C. Rot: A_{654} , blau: A_{280} , grau: Leitfähigkeit.

In Tabelle 32 sind die Ausbeuten der Proteinaufreinigungen aufgeführt. Der Reinigungseffekt kann nur anhand des Absorptionsverhältnisses A_{654}/A_{280} festgestellt werden. Je größer dieses wird, desto weniger Apoproteinreste sind in der Holoproteinlösung vorhanden.

Tabelle 32: Proteinausbeuten bei der Aufreinigung des 59 und 65 kDa Phytochroms. Die Proteinkonzentrationen sind durch P_r/P_{fr} -Differenzspektren ermittelt worden. In Klammern ist hinter den Proteinausbeuten das Absorptionsverhältnis A_{654}/A_{280} angegeben.

Protein	59 kDa Phytochrom	65 kDa Phytochrom
Expressionsorganismus	<i>Pichia pastoris</i>	<i>Hansenula polymorpha</i>
Zellpellet	500 g	180 g
Rekonstitution	90 mg	42 mg
Affinitätschromatographie	45 mg (1.06)	31 mg (1.17)
Ionenaustauschchromat.	19 mg (1.62)	14 mg (1.59)
Ultrafiltration	15 mg (1.6)	11 mg (1.5)

Durch die Ionenaustauschchromatographie kann die Reinheit der Proteinprobe deutlich durch Abtrennung von Apoprotein gesteigert werden.

4.2.2 Charakterisierung von Phytochrom

4.2.2.1 Absorptionsspektren

Die saubersten Fraktionen nach der Ionenaustauschchromatographie zeigen ein A_{654}/A_{280} -Absorptionsverhältnis von etwa 1.6. In Abbildung 51 ist beispielhaft das P_r -Spektrum vom 65 kDa Phytochrom A Fragment mit einem Absorptionsverhältnis von 1.59 abgebildet.

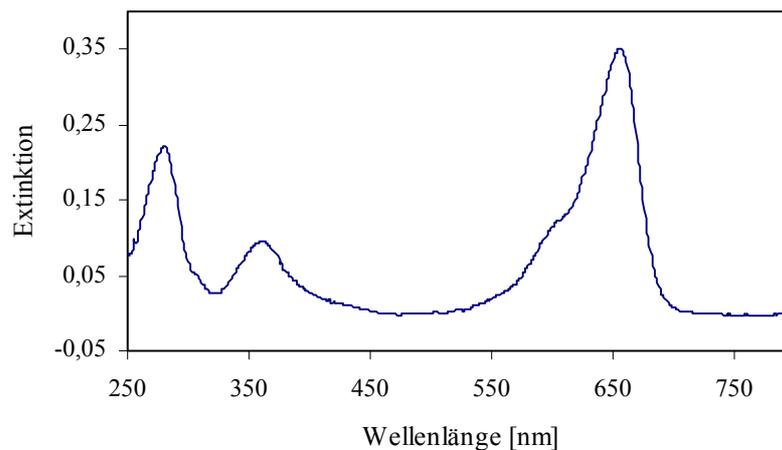


Abb. 51: Absorptionsspektrum vom 65 kDa Phytochrom A Fragment in der P_r -Form mit einem Absorptionsverhältnis A_{654}/A_{280} von 1.59 bei einer Proteinkonzentration von etwa 0.2 mg/ml (aus P_r/P_{fr} -Differenzspektren).

4.2.2.2 Gelelektrophorese

In SDS-Gelen kann man bei beiden Proteinen eine breite Proteinbande ohne Nebenbanden erkennen (Abb. 52). Das Apoprotein dagegen zeigt bei gleicher Proteinkonzentration eine schmalere saubere Bande. Die Proteinbanden sehen im SDS-Gel identisch aus nach Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie. Ein Aufreinigungseffekt des Proteins durch den letzteren Chromatographieschritt ist weder in denaturierenden SDS-Gelen noch in nativen Gelen (Abb. 53) zu erkennen. In nativen Gelen zeigen die P_r - und P_{fr} -Form ein unterschiedliches Laufverhalten, doch sind bei beiden Proteinen keine klaren Bandenmuster zu erkennen. Bei der P_{fr} -Form ist auch eine schwache P_r -Bande zu sehen. Das Apoprotein präzipitiert bereits größtenteils am Auftragungspunkt und führt im elektrischen Feld zu einem *Tailing*.

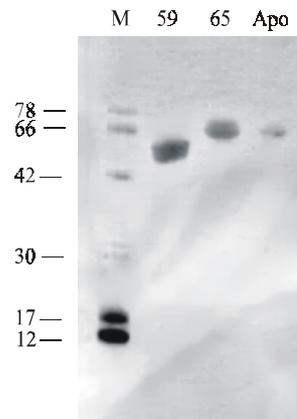


Abb. 52: SDS-PHAST-Gel von 65 kDa Phytochrom. Die Proteinkonzentration beträgt jeweils 0.1 mg/ml (A_{280} -Bestimmung).

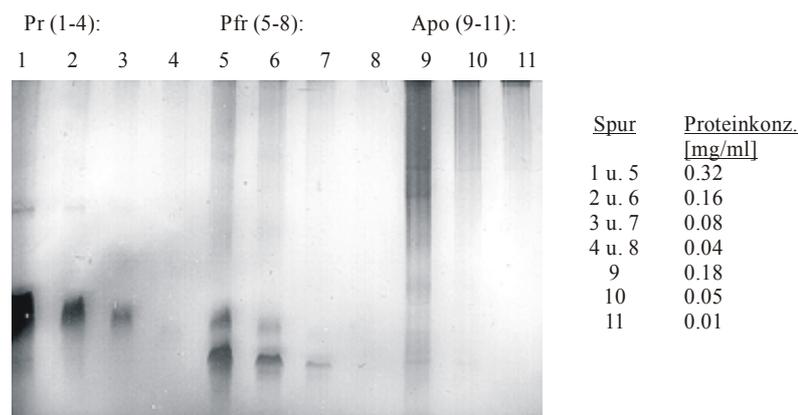


Abb. 53: Natives PHAST-Gel von 65 kDa Phytochrom. Es sind jeweils Konzentrationsreihen von der P_r - (Spur 1-4), der P_{fr} -Form (Spur 5-8) und dem Apoprotein (Spur 9-11) aufgetragen. Proteinkonzentration : A_{280} -Bestimmung.

Die IEF-Gele (Abb. 54) zeigen ein unterschiedliches Bandenmuster der hellrot absorbierenden P_r - und der dunkelrot absorbierenden P_{fr} -Form. Die P_r -Form hat eine Hauptbande bei pH 6.3 und weitere Nebenbanden bei etwa pH 6.1 und 6.6-6.8. Die Hauptbanden der P_{fr} -Form liegen bei etwas niedrigerem pH, ca. pH 6.1-6.2. Diese Form hat noch mehr Nebenbanden im Bereich von pH 6.3-5.9, die Banden bei pH 6.6-6.8 sind etwas schwächer ausgeprägt. Die P_r -Hauptbande ist auch bei dieser Form zu erkennen. Der Auftragspunkt ist bei beiden Formen deutlich zu erkennen, da hier auch Protein präzipitiert ist. Das Apoprotein fällt auch in stark verdünnten

Lösungen bei IEF-Gelen am Auftragspunkt aus. Daraus kann man schließen, dass in der Holoproteinlösung noch etwas Apoprotein vorhanden sein muß. Die Banden von 65 kDa und 59 kDa Phytochrom in IEF-Gelen unterscheiden sich kaum, lediglich der isoelektrische Punkt liegt für das kürzere Proteinfragment zu höherem pH verschoben (pH 6.5).

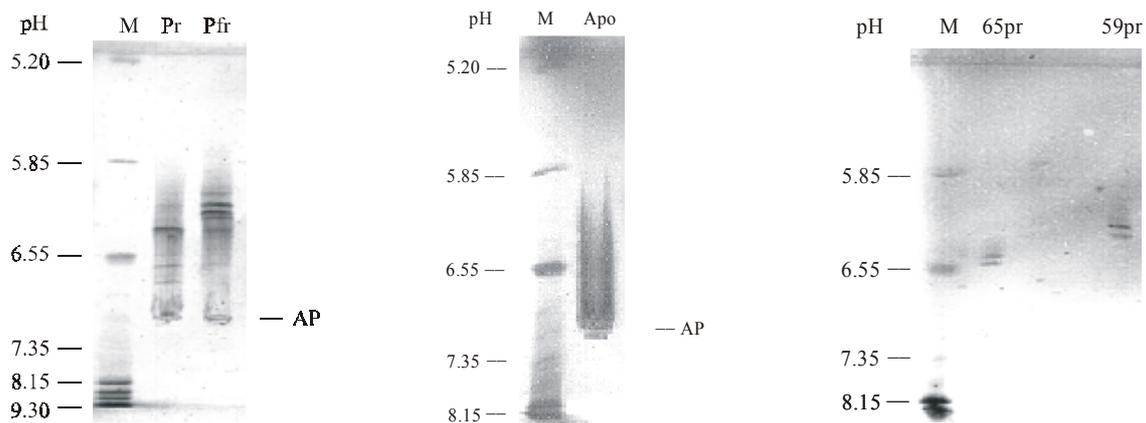


Abb. 54: Isoelektrische Fokussierungen von 65 kDa Phytochrom in der P_r -/ P_{fr} -Form (Proteinkonzentration: 0.15 mg/ml P_r / P_{fr} -Differenzspektrum), 65 kDa Apoprotein (mitte) und 65 kDa/59 kDa Phytochrom in der P_r -Form (rechts), jeweils 0.1 mg/ml (A_{280} -Bestimmung). Als pH-Marker dient der pI 5-10-Standard von Pharmacia, AP: Auftragspunkt.

Abbildung 55 zeigt exemplarisch den Reinigungsschritt von 65 kDa Phytochrom mit der Ionenaustauschchromatographie. Alle Fraktionen sind in der P_r -Form belichtet. Es zeigt sich, dass die Proteinprobe aus mehreren Proteinformen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten besteht, die durch diesen Schritt teilweise voneinander getrennt werden können. Nur die sauberste Fraktion zeigt nur eine Bande (Spur 2). Am Auftragspunkt präzipitiert nicht mehr so viel (Apo)protein.

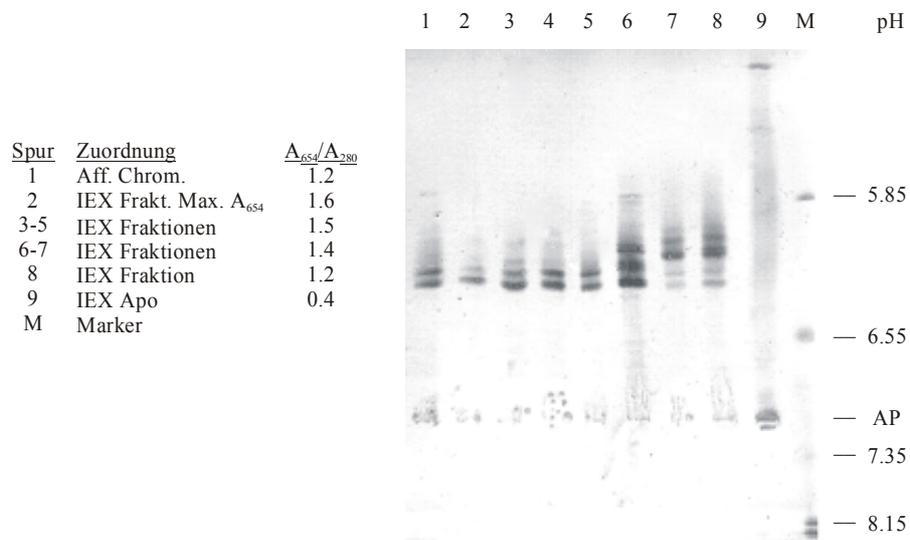


Abb. 55: IEF-Analyse der Fraktionen nach Ionenaustauschchromatographie von 65 kDa Phytochrom in der P_r -Form. Die Proteinkonzentration (A_{280} -Bestimmung) jeder Fraktion beträgt etwa 0.1 mg/ml, AP: Auftragspunkt.

Eine mit dem PHAST-System erstellte Titrationskurve zwischen pH 5 und 8 (Abb. 56) zeigt eine verbreiterte Kurve von etwa pH 7 - 8, jedoch sind keine weiteren Kurven erkennbar.

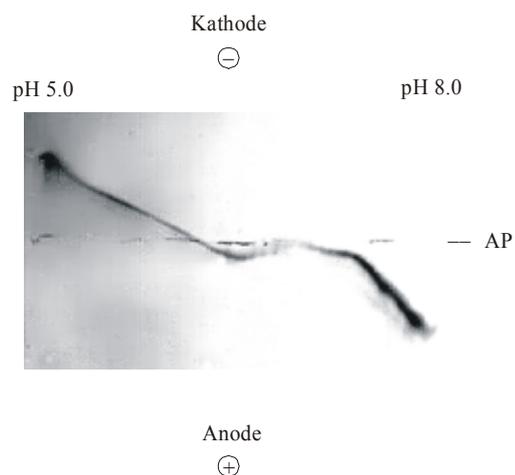


Abb. 56: Titrationskurve von 65 kDa Phytochrom, P_r -Form, pH 5-8. Proteinkonzentration: 0.1 mg/ml. AP: Auftragspunkt.

4.2.2.3 Massenspektrometrie

Die Proteinlösungen wurden nach einzelnen Reinigungsstufen mit MALDI-TOF-MS analysiert. Nach der Affinitätschromatographie erhält man ein Spektrum (Abb. 57), das durch Aufspaltung des zweifach geladenen Molekülpeaks auf nicht rekonstituiertes Apoprotein in der Proteinlösung hinweist. Nach der Ionenaustauschchromatographie ist kein Apoprotein in der Lösung massenspektroskopisch nachweisbar (Abb. 58). Das 59 kDa und 65 kDa Phytochrom liegen in reiner Form in der Proteinlösung vor. In Tabelle 33 befinden sich die Peakzuordnungen aus den Abbildungen 57-59.

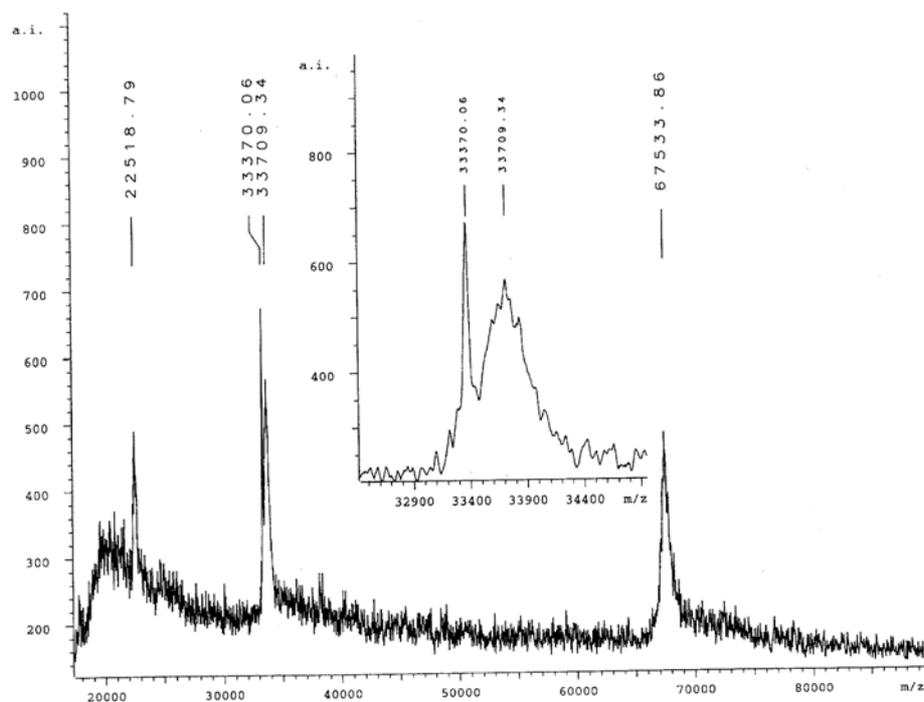


Abb. 57: MALDI-TOF-MS-Spektrum von 65 kDa Phytochrom nach Reinigung durch Affinitätschromatographie. Der zweifach geladene Molekülionenpeak ist aufgespreizt dargestellt. Die Kalibrierung erfolgte mit Trypsinogen ($[M+H]^+$: 23981 Da) und Trypsinogen-Dimer ($[2M+H]^+$: 47963 Da).

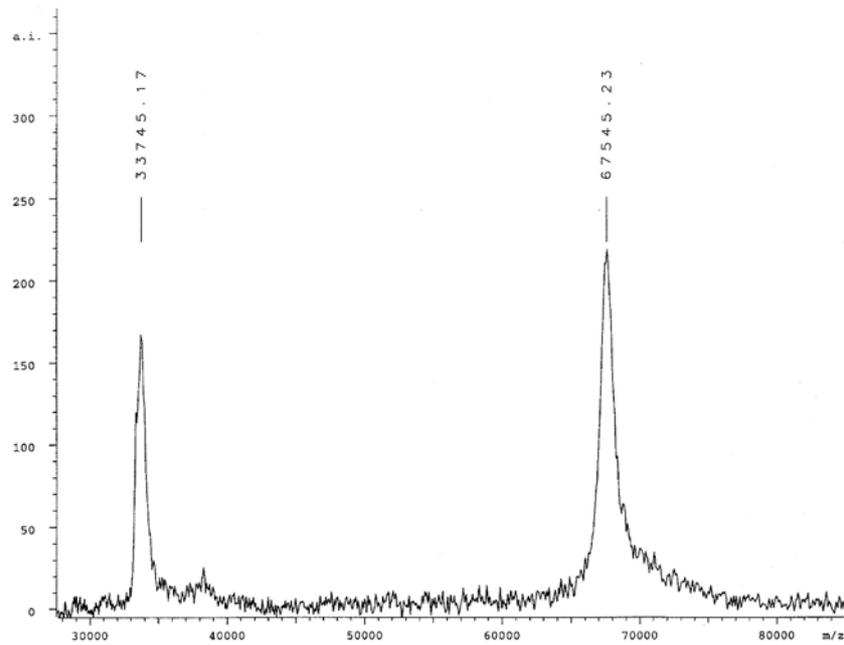


Abb. 58: MALDI-TOF-MS-Spektrum von 65 kDa Phytochrom nach Ionenaustauschchromatographie. Die Kalibrierung erfolgte mit BSA ($[M+H]^+$: 67234 Da) und Trypsinogen-Dimer ($[2M+H]^+$: 47963 Da).

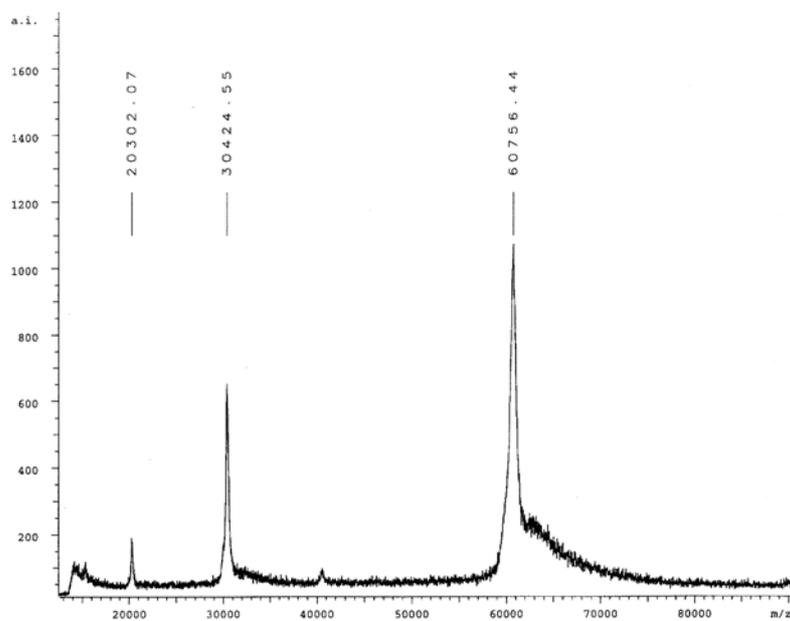


Abb. 59: MALDI-TOF-Massenspektrum von 59 kDa Phytochrom nach Ionenaustauschchromatographie. Die Kalibrierung erfolgte mit BSA ($[M+H]^+$: 67234 Da) und Trypsinogen-Dimer ($[2M+H]^+$: 47963 Da).

Tabelle 33: Peakzuordnung zu den MALDI-TOF-Massenspektren aus den Abbildungen 57-59 mit Angabe der Proteinmassen in Da.

	59 kDa Phytochrom	65 kDa Phytochrom	65 kDa Apophytochrom
th. Masse [Da]	60 765	67 380	66 793
Abb. 57	-	22 519 [M+3H] ³⁺ 33 709 [M+2H] ²⁺ 67 534 [M+H] ⁺	33 370 [M+2H] ²⁺
Abb. 58 und 59	20 302 [M+3H] ³⁺ 30 425 [M+2H] ²⁺ 60 756 [M+H] ⁺	33 745 [M+2H] ²⁺ 67 545 [M+H] ⁺	-

Abbildung 60 zeigt ein ESI-Massenspektrum von monomerem 65 kDa Holophytochrom mit einer Masse von 67434 Da.

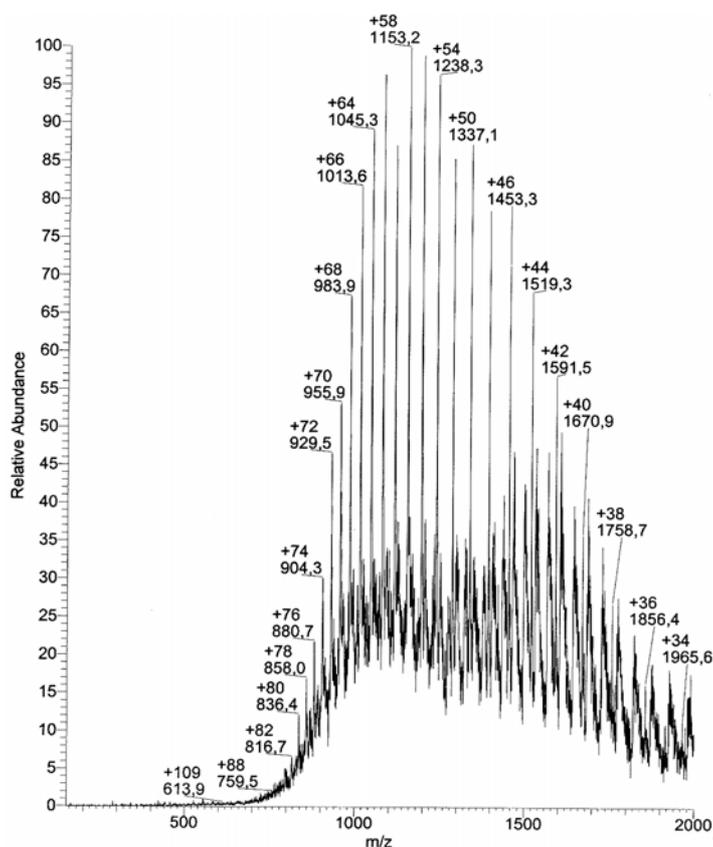


Abb. 60: ESI-Massenspektrum von 65 kDa Phytochrom.

4.2.2.4 Gelfiltration

Eine verdünnte und eine konzentrierte 65 kDa-Phytochromprobe wurden einer Gelfiltration unterworfen (Abbildung 61 a und b). Dabei zeigte sich, dass das Protein eine nahezu einheitliche Zusammensetzung mit einem Hauptpeak bei einer Masse von 135 kDa aufweist. Diese Masse entspricht genau der dimeren Proteinmasse. Jedoch kann man am Fuße des Peaks zu höheren Proteinmassen hin bereits einen Anstieg der 280 nm-Absorption beobachten. In der konzentrierten Proteinlösung ist dieser Anstieg deutlicher zu erkennen, was für eine unspezifische Aggregation des Proteins beim Aufkonzentrieren spricht.

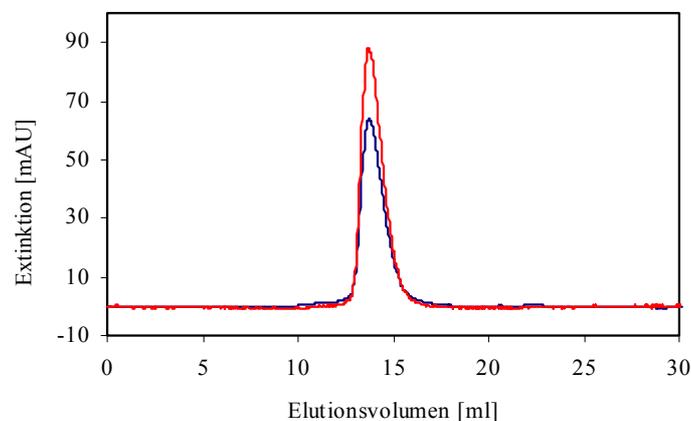


Abb. 61 a: Gelfiltration des 65 kDa-Phytochroms auf einer Sephadex 200 HR 10/30-Säule von Pharmacia. Proteinkonzentration: 0.8 mg/ml (aus P_r/P_f -Differenzspektren), Laufmedium: 50 mM Tris /HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, Flußrate: 0.3 ml/min, 10°C. Blau: A_{280} , rot: A_{654} .

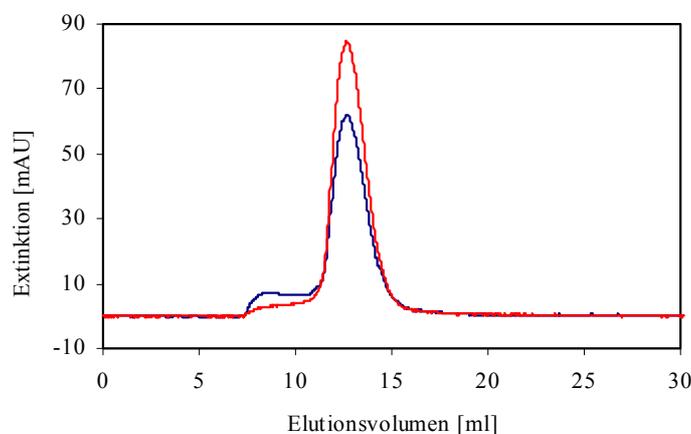


Abb. 61 b: Gelfiltration des 65 kDa-Phytochroms auf einer Sephadex 200 HR 10/30-Säule von Pharmacia. Proteinkonzentration: 3.0 mg/ml (aus P_r/P_f -Differenzspektren). Bedingungen wie Abb. 61 a.

Das 59 kDa-Phytochrom zeigt bei einer Proteinkonzentration von 3 mg/ml das gleiche Elutionsverhalten wie das verdünnte 65 kDa-Phytochrom (Abb. 61 a) bei der Gelfiltration.

4.2.2.5 Dynamische Lichtstreuung (DLS)

In Tabelle 34 sind die gemessenen hydrodynamischen Radien R_H exemplarisch für die 59 kDa und 65 kDa Phytochromfragmente aufgeführt. Die daraus berechneten Molekulargewichte sind unter der Annahme einer globulären Proteingestalt (M_w glob.) und für ein *Volume-Shape-Hydration*-Modell (M_w VSH) mit dem Massenbereich 24-110 kDa aufgeführt. Der Diffusionskoeffizient (D_i) wurde jeweils über 20 Messungen gemittelt.

Tabelle 34: Ermittlung der Molekülgröße und -verteilung von je 1 mg/ml 59 kDa und 65 kDa Phytochrom in 20 mM Tris pH 8.0 mit Hilfe der DLS am DynaPro-801 bei einer Laserwellenlänge von 829.6 nm. D_i : translationaler Diffusionskoeffizient, *SOS-Error*: Summe der Fehlerquadrate.

Protein	Filter [μm]	D_i [$10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$]	R_H [nm]	M_w glob. [kDa]	M_w VSH [kDa]	<i>Baseline</i>	<i>SOS-Error</i>
65 kDa	0.2	107	21.2 ± 17.0	4800	-	1.047	63
65 kDa	0.02	522	4.2 ± 0.8	94	131	1.000	2.274
59 kDa	0.02	565	4.0 ± 0.6	83	111	1.000	0.561
59 kDa	0.2	553	4.1 ± 0.6	88	120	1.002	0.595

Es wurde bis auf die 0.2 μm filtrierte 65 kDa-Phytochromlösung jeweils eine monomodale Verteilung der Phytochromfragmente in Lösung gefunden. Das Molekulargewicht lag dabei zwischen dem Monomer und dem Dimer bis hin zum Dimeren. Das 65 kDa Phytochromfragment aggregierte in Lösung. Die Stärke der Aggregation hing von der Proteinkonzentration ab. Konzentrierte Phytochromlösungen ließen sich nicht mehr filtrieren.

Auch die Zugabe von Salzen (NaCl, Ammoniumsulfat) und Detergenzien (Octylglycosid, Triton X-100, Tween 80, Glycerin) in verschiedenen Konzentrationen beim Aufkonzentrieren der Phytochromlösung konnte die Aggregatbildung nicht verhindern. Unterschiede in der Proteingröße der P_r - und P_{fr} -Phytochromformen lagen im Bereich der Messgenauigkeit.

4.2.3 Sekundärstrukturanalyse

4.2.3.1 Sekundärstrukturvorhersage

Die Sekundärstrukturvorhersage erfolgt für das 59, 65 und 124 kDa Phytochrom A mit mehreren Programmen. Die Vorhersagen für das N-terminale 6 kDa-Phytochromfragment sind in Abbildung 62 dargestellt. Die komplette Sekundärstrukturvorhersage für das Vollängenphytochrom befindet sich im Anhang dieser Arbeit. Die jeweiligen Sekundärstrukturanteile aller Vorhersagemethoden sind in Tabelle 35 aufgeführt. Der α -Helix-Anteil überwiegt im Protein, doch ist ein β -Faltblattanteil von mindestens 10 % wahrscheinlich. Für das N-terminale 6 kDa Proteinfragment wird ein leicht erhöhter α -Helix-Anteil gefunden.

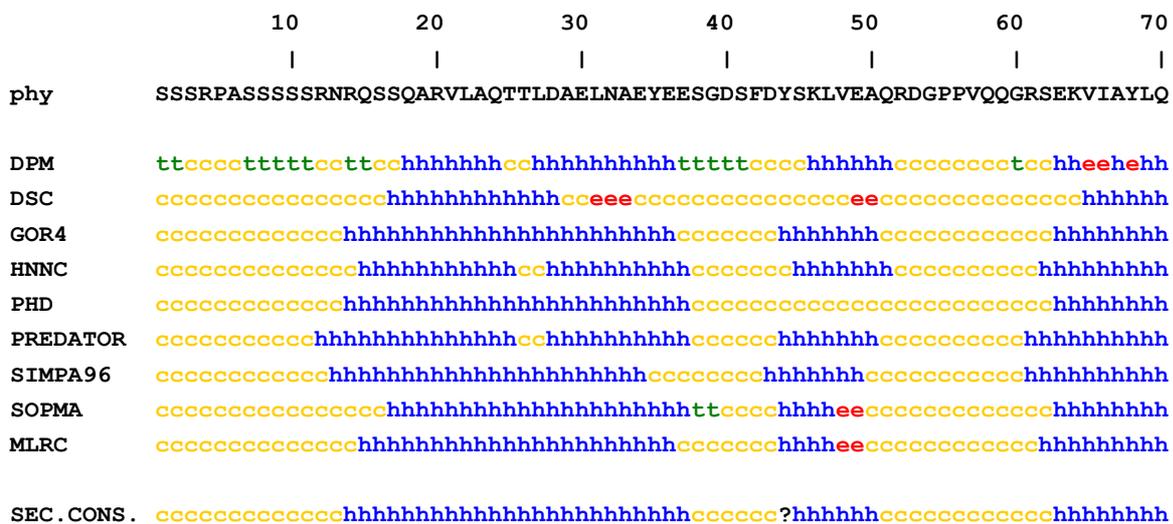


Abb. 62: Sekundärstrukturvorhersage des N-terminalen 6 kDa Phytochromfragments (phy) mit verschiedenen Programmen. SEC.CON.S.: Sekundärstruktur-Konsensus, **h**: α -Helix, **e**: β -Faltblatt, **t**: β -turn, **c**: coil

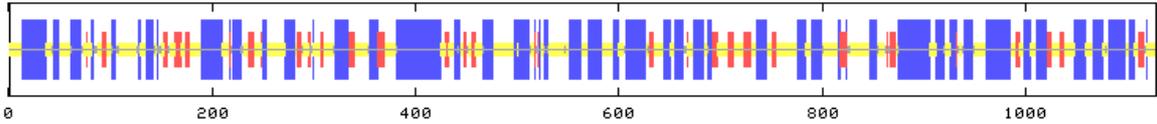


Abb. 63: Schematische Darstellung der Sekundärstrukturelemente, vorhergesagt mit Sekundärstruktur-Konsensus (s.o.). Blau: α -Helix, rot: β -Faltblatt, gelb: coil.

Tabelle 35: Sekundärstrukturanteile der Vorhersageprogramme für das 59, 65 und 124 kDa Phytochrom A aus Hafer.

Fragment	Programm	α -Helix [%]	β -Faltblatt [%]	β -turn [%]	coil [%]	Sonstiges [%]
59 kDa	DPM	39.4	10.3	1.1	49.3	
	DSC	41.9	7.0		51.1	
	GOR IV	34.1	18.5		47.4	
	HNNC	43.3	15.6		41.1	
	PHD	44.8	13.5		41.7	
	PREDATOR	32.4	16.3		51.3	
	SIMPA 96	43.2	11.3		45.6	
	SOPMA	39.3	17.8	5.9	37.0	
	MLRC	39.7	17.2		43.1	
	KONSENSUS	37.6	10.1		44.9	7.3
65 kDa	DPM	41.0	9.2	3.4	46.4	
	DSC	39.3	8.1		52.6	
	GOR IV	37.0	16.3		46.7	
	HNNC	44.2	14.1		41.7	
	PHD	45.4	13.1		41.5	
	PREDATOR	35.3	14.8		49.9	
	SIMPA 96	44.5	10.3		45.2	
	SOPMA	39.0	16.3	5.4	39.3	
	MLRC	40.7	16.0		43.4	
	KONSENSUS	39.8	9.8		45.6	4.9
124 kDa	DPM	40.7	11.6	3.7	44.0	0.1
	DSC	36.9	10.8		52.2	
	GOR IV	41.1	17.7		41.2	
	HNNC	45.6	14.2		40.3	
	PHD	46.1	13.8		40.1	
	PREDATOR	41.1	12.8		46.2	
	SIMPA 96	44.9	12.1		43.1	
	SOPMA	46.5	14.2	4.8	34.6	
	MLRC	44.2	14.8		41.1	
	KONSENSUS	41.6	11.3		42.4	4.8

4.2.3.2 CD

4.2.3.2.1 UV-Bereich

Mit CD-Spektroskopie wird der Sekundärstrukturgehalt experimentell ermittelt. Die Proteinkonzentration spielt bei der Auswertung eine wichtige Rolle. So erfolgt die Auswertung pro Fragment zweimal, wobei die Proteinkonzentration einmal aus der A_{280} -Bestimmung und einmal über P_r/P_{fr} -Differenzspektren erhalten wird. In Abbildung 68 finden sich nur die Spektren, die mit der A_{280} -Proteinkonzentrationsbestimmung evaluiert wurden. Im Vergleich sind auch die Spektren der Apoproteine mit aufgeführt.

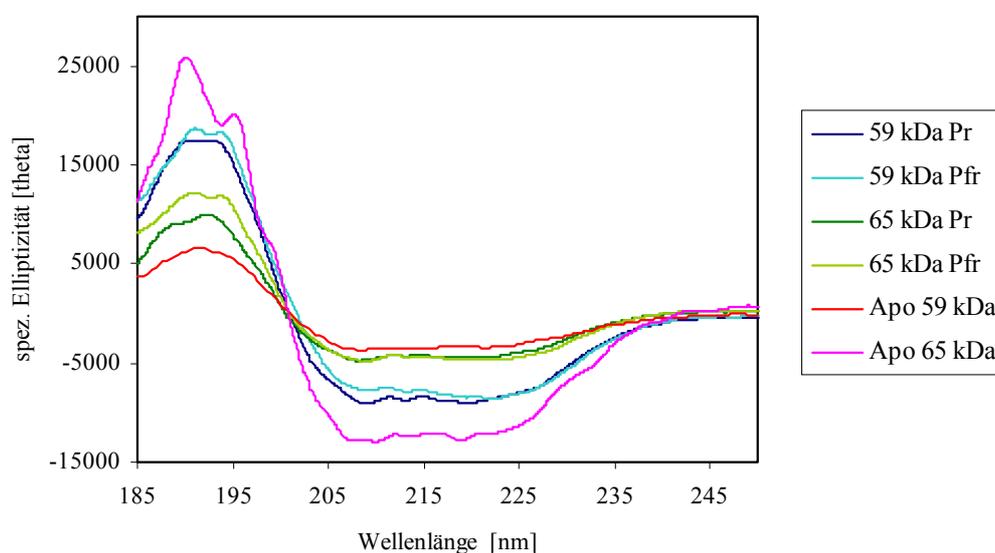


Abb. 64: CD-Spektren zur Sekundärstrukturanalyse von 59 und 65 kDa Phytochrom. Proteinkonzentration: A_{280} -Bestimmung: 0.05 mg/ml (59 kDa) und 0.1 mg/ml (65 kDa), Pr/Pfr-Differenzspektrum: 0.03 mg/ml (59 kDa) und 0.04 mg/ml (65 kDa), 20°C, 2 mm Schichtdicke in Küvette. Apophytochrom: 0.14 mg/ml (59 kDa) und 0.05 mg/ml).

In Tabelle 36 sind die Mittelwerte der aus den Spektren berechneten Sekundärstrukturanteile aufgeführt. Alle experimentellen Kurven werden 3 Auswertungsprogrammen (CONTIN, K2D, SELCON) unterworfen. Die unterschiedlichen Konzentrationen zur Berechnung der spezifischen Elliptizitäten haben dabei den größten Einfluß auf die Auswertung.

Tabelle 36: Sekundärstrukturanteile des 59 und 65 kDa Phytochroms aus CD-Spektren. Berechnung mit den Programmen CONTIN, K2D und SELCON. Proteinkonzentration jeweils über A_{280} -Bestimmung und aus P_r/P_{fr} -Differenzspektren ermittelt. Apo: Apoprotein.

CONTIN

Protein	Konz.	α -Helix [%]	β -Faltblatt [%]	β -turn [%]	<i>random</i> [%]
Apo 59 kDa	A_{280}	9	57	28	6
Apo 65 kDa	A_{280}	32	22	18	28
59 kDa P_r	A_{280}	19	43	18	20
59 kDa P_r	P_r/P_{fr}	38	26	6	30
59 kDa P_{fr}	A_{280}	18	47	25	10
59 kDa P_{fr}	P_r/P_{fr}	33	34	14	19
65 kDa P_r	A_{280}	7	58	31	4
65 kDa P_r	P_r/P_{fr}	20	51	21	8
65 kDa P_{fr}	A_{280}	7	57	32	4
65 kDa P_{fr}	P_r/P_{fr}	22	50	22	6

K2D

Protein	Konz.	α -Helix [%]	β -Faltblatt [%]	<i>random</i> [%]
Apo 59 kDa	A_{280}	31	11	58
Apo 65 kDa	A_{280}	38	18	44
59 kDa P_r	A_{280}	31	11	58
59 kDa P_r	P_r/P_{fr}	51	14	35
59 kDa P_{fr}	A_{280}	30	15	55
59 kDa P_{fr}	P_r/P_{fr}	45	15	40
65 kDa P_r	A_{280}	18	30	52
65 kDa P_r	P_r/P_{fr}	25	18	57
65 kDa P_{fr}	A_{280}	23	25	52
65 kDa P_{fr}	P_r/P_{fr}	32	17	51

SELCON

Protein	Konz.	α -Helix [%]	β -Faltblatt [%]	β -turn [%]	<i>random</i> [%]
Apo 59 kDa	A ₂₈₀	-	-	-	-
Apo 65 kDa	A ₂₈₀	35	19	17	29
59 kDa P _r	A ₂₈₀	25	25	20	30
59 kDa P _r	P _r /P _{fr}	39	18	16	27
59 kDa P _{fr}	A ₂₈₀	27	19	18	36
59 kDa P _{fr}	P _r /P _{fr}	40	17	15	28
65 kDa P _r	A ₂₈₀	7	36	19	38
65 kDa P _r	P _r /P _{fr}	33	19	17	31
65 kDa P _{fr}	A ₂₈₀	25	22	21	32
65 kDa P _{fr}	P _r /P _{fr}	41	17	16	26

4.2.3.2.2 VIS-Bereich

Das CD-Spektrum im nahen UV- und Chromophorabsorptionsbereich (Abb. 65) zeigt eine ähnliche Umgebung für beide Phytochromfragmente, jedoch große Unterschiede im Protein zwischen der P_r - und P_{fr} -Form.

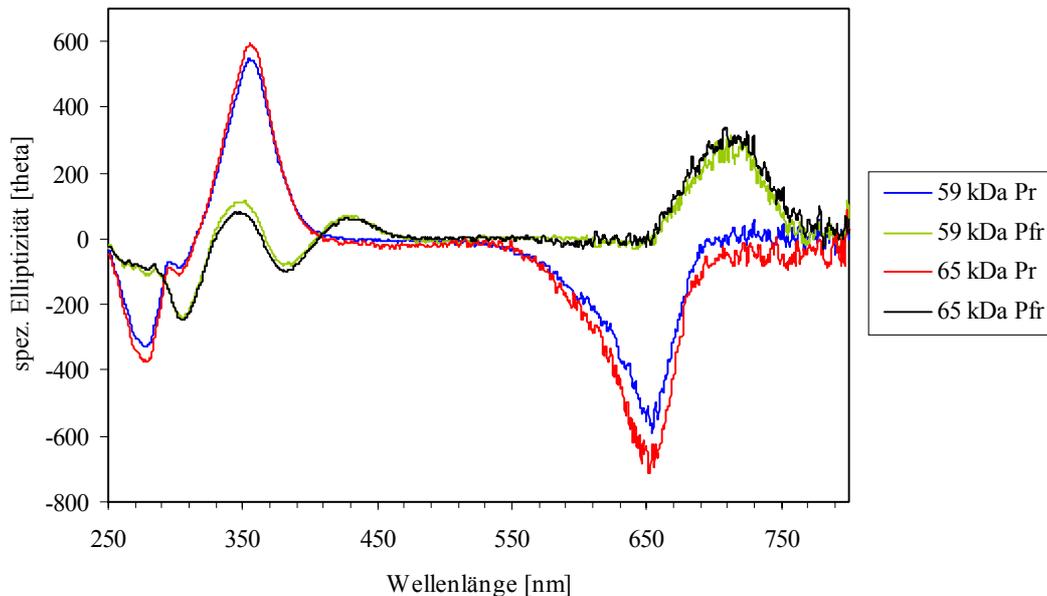


Abb. 65: CD-Spektren von 59 und 65 kDa Phytochrom A in der P_r - und P_{fr} -Form im VIS-Bereich. Proteinkonzentration (A_{280} -Bestimmung): 0.39 mg/ml (59 kDa) und 0.31 mg/ml (65 kDa), Küvette mit 1 cm Schichtdicke, 10 Spektren.

4.2.4 Schmelzpunktbestimmung mit CD

Abbildung 66 zeigt die CD-spektroskopisch aufgenommenen Schmelzkurven vom 59 kDa und 65 kDa Holophytochrom. Die geglätteten Kurven sind zusätzlich eingezeichnet. Beide Schmelzkurven zeigen etwa identischen Verlauf. Die Derivativspektren weisen auf einen Schmelzpunkt um 47°C hin. Abweichungen von beiden Spektren können durch die Glättung aufgetreten sein. Das Apoprotein beider Fragmente zeigt dagegen keinen diskreten Schmelzbereich, sondern ein kontinuierliches Ansteigen des CD-Signals.

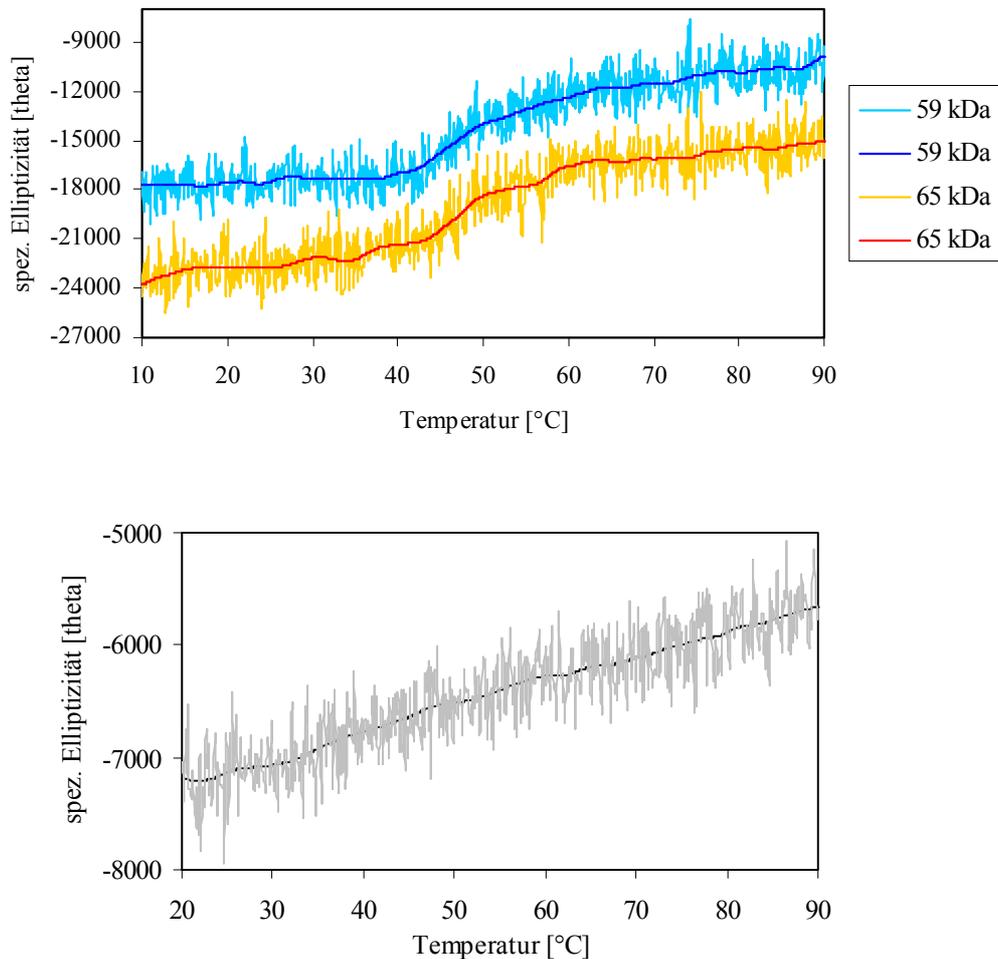


Abb. 66: Schmelzkurven von 59 und 65 kDa Phytochrom (oben) und 59 kDa Apoprotein (unten) in 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8.0, Proteinkonzentration (A_{280} -Bestimmung): 0.1 mg/ml (59 kDa) und 0.09 mg/ml (65 kDa), 207 nm, Küvette mit 2 mm Schichtdicke.

Wellenlängenabhängige CD-Spektren (Abb. 67) sind alle 20°C (Holoprotein) bzw. 10°C (Apoprotein) aufgenommen worden, um Veränderungen der Sekundärstruktur besser erkennen zu können. Das Apoprotein zeigt ein kontinuierliches Auffalten der Sekundärstruktur, während man im Holoprotein eine gewisse Stabilität, zumindest bis 30°C, erkennen kann.

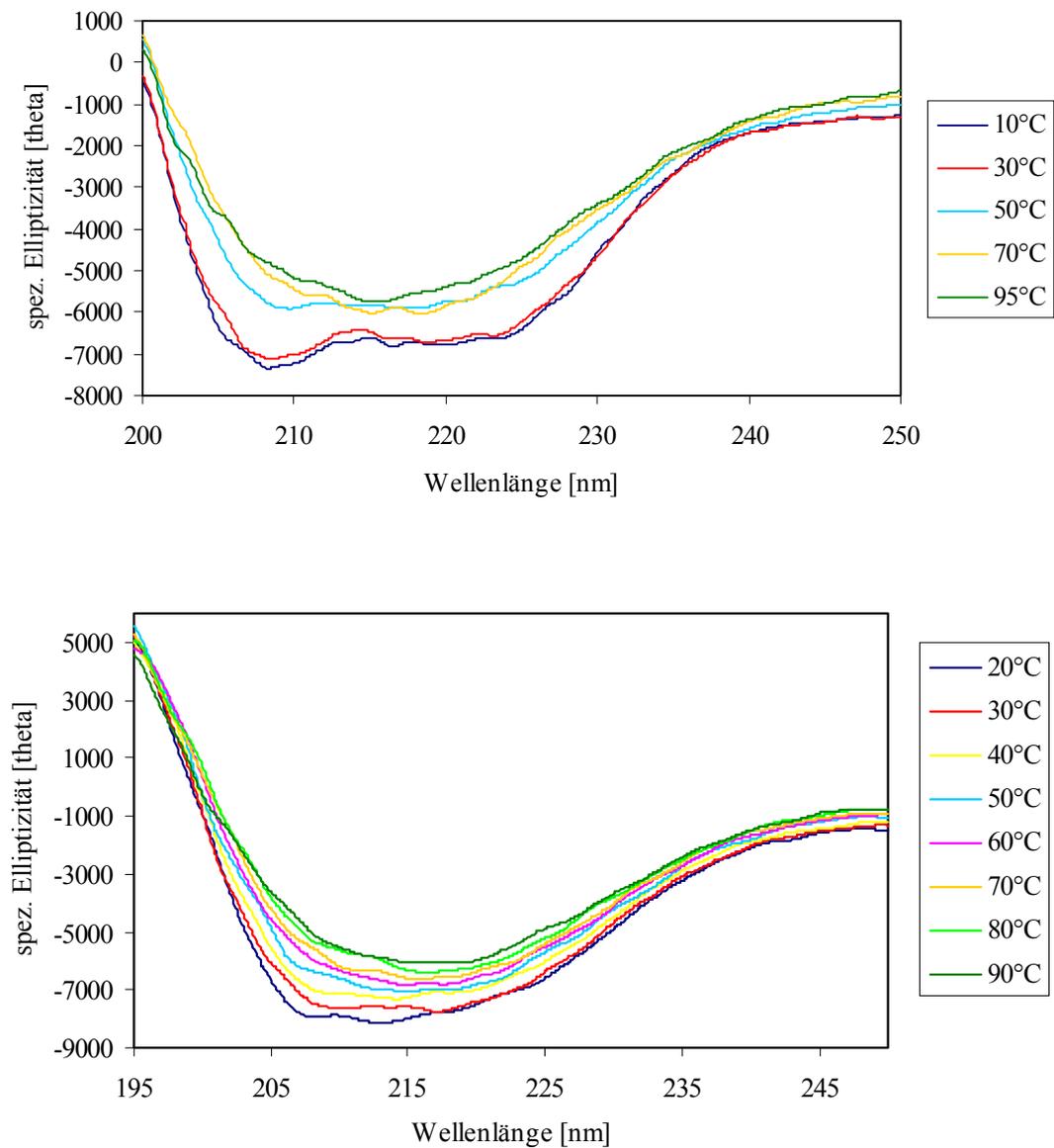


Abb. 67: Wellenlängenabhängiges CD-Spektrum beim Schmelzvorgang des 65 kDa Holophytochroms (oben) und 59 kDa Apoprotein in 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8,0, Proteinkonzentration (A_{280} -Bestimmung): 0.11 mg/ml (Holoprotein) und 0.17 mg/ml (Apoprotein), Küvette mit 1 mm Schichtdicke.

Sekundärstrukturanalysen von den Kurven bei 10/20°C und 95/90°C (Tabelle 37) zeigen, dass vor allem der α -Helix-Anteil beim Schmelzvorgang zurück geht. Dies ist beim Apoprotein in verstärktem Maße der Fall.

Tabelle 37: Sekundärstrukturanalyse mit K2D beim Schmelzvorgang von Phytochrom Apo- (59 kDa) und Holoprotein (65 kDa).

	α -Helix [%]	β -Faltblatt [%]	Sonstiges [%]
Apoprotein, 59 kDa, 20°C	31	11	58
Apoprotein, 59 kDa, 90°C	23	22	54
Holoprotein, 65 kDa, 10°C	26	17	57
Holoprotein, 65 kDa, 95°C	23	24	53

Von beiden Holoproteinen wurden auch Abkühlungskurven aufgenommen, die hier nicht abgebildet sind. Sie zeigten beide Male keine Rückfaltung in die aktive Proteinform.

4.2.5 Kristallisation von Phytochrom

Das 65 kDa Phytochrom präzipitiert nicht bis zu folgenden Fällungsmittelkonzentrationen: 1.4 M Ammoniumsulfat (AMS) bei pH 6.5 - 8.5, 10 %igem Isopropanol, 15 % PEG 200, 15 % Jeffamine M600, 15 % 1,6-Hexandiol, 5 % MPD, 5 % PEG > 200 (pH 7.5 - 9.0) und 3.5 M NaCl. Die Additive 50 mM EDTA, 5 % Glycerin und 1% 1,2,3-Hexantriol haben bei 1.2 M AMS keinen Einfluß auf das Löslichkeitsverhalten des Phytochroms. Die Detergenzien 0.01 % Triton X 100 und 0.01 % Tween 80 führen bei 1.2 M AMS zum leichten Aggregieren des Proteins. Dagegen präzipitiert das Protein sehr schnell bei Zugabe von 1 %iger Octylglycosid-Lösung und 0.1 M CdCl₂. Bei 5 %igen Lösungen einiger organischer Reagenzien hat der Zusatz von 0.7 M AMS bzw. 1.0 M NaCl keinen Einfluß auf die Löslichkeit der Phytochromlösung. Bei modifizierten Ansätzen des *Crystalscreen* I und II von Hampton Research (nur PEG 200, PEG MME 550, pH 6.5 - 8.5 und alle organischen Reagenzien stark verdünnt eingesetzt) ist das Phytochrom in allen Kristallisationstropfen sofort präzipitiert, wenn die Reservoirlösungen Cadmiumsulfat, Zinkacetat oder Hydrogenphosphatsalze enthielten.

Kristallisationsansätze mit Ammoniumsulfat und Natriumchlorid zeigten auch nach mehreren Wochen Lagerung noch die phytochromtypische Blaufärbung. Danach scheinen diese Fällungsmittel eine gewisse stabilisierende Wirkung auf das Phytochrom auszuüben. Man kann sie in einem breiten pH-Bereich zur Kristallisation einsetzen.

Kristallisationstests von 59 kDa Phytochromfragment mit organischen Fällungsmitteln und Salzen in unterschiedlichen Konzentrationen weisen auf ein ähnliches Proteinstabilitätsverhalten im Kristallisationstropfen hin wie beim 65 kDa Phytochromfragment. Modifizierte Kristallisations-*Screens* nach Jancarik und Kim (1991) mit verdünnten Zusätzen aus den Additiv- und Detergenzien-*Screens* von Hampton Research führten bei beiden Phytochromfragmenten nicht zur Bildung von Proteinkristallen. Durch Zusatz kleinster Glassplitter als Kristallisationskeime konnten in zwei Kristallisationstropfen Mikrokristalle gefunden werden. Dabei handelt es sich jeweils um das 59 kDa und das 65 kDa Phytochromfragment, die unter sehr ähnlichen Bedingungen kristallisierten. Nadelförmige Kristalle des 65 kDa Phytochroms mit dem Fällungsmittel Ammoniumsulfat konnten nicht reproduziert werden.

Abbildung 68 zeigt einige kristalline Strukturen in Kristallisationsansätzen, die nicht reproduziert werden konnten, und weitere typische Kristallisationstropfen vergrößert unter dem Mikroskop.

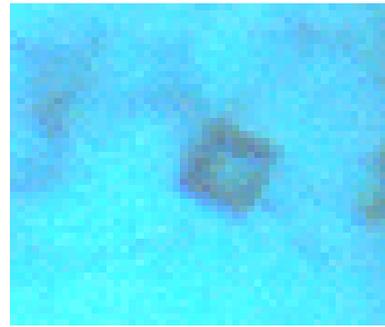
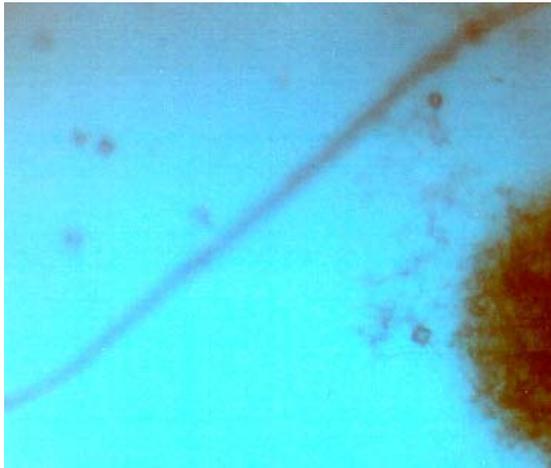


(a)

65 kDa Phytochrom, 10 mg/ml, 1.0 M Ammoniumsulfat pH 5.5,
Mikrostifte nach 2 Monaten entstanden, 20°C.

Rechts: Ausschnittsvergrößerung

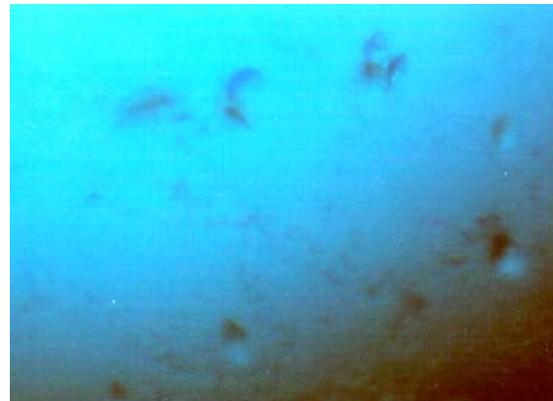
Abb. 68 a-g: Kristallisationstropfen von Phytochrom.



(b)

59 kDa Phytochrom, 5 mg/ml, 11.2 % PEG 200, 0.1 M HEPES pH 7.5, 0.2 M CaCl₂,
Kristallisationskeime zugesetzt, Mikrokristalle nach 2 Jahren entstanden, 20°C.

Rechts: Ausschnittsvergrößerung.

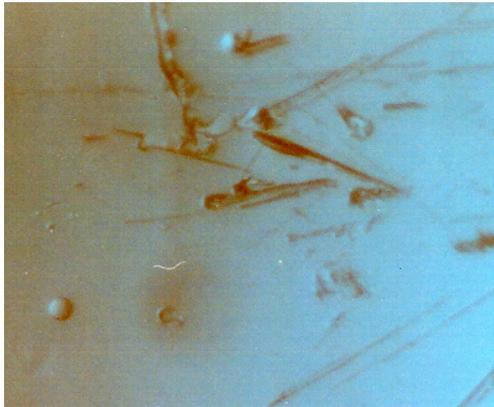


(c)

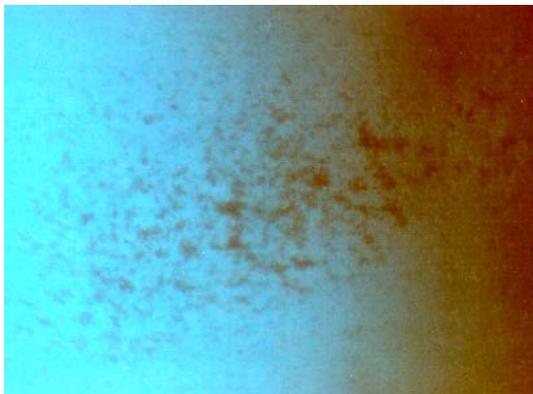
65 kDa Phytochrom, 10 mg/ml, 12 % PEG 200, 0.1 M HEPES pH 7.5, 0.2 M MgCl₂,
Kristallisationskeime zugesetzt, Mikrokristalle nach 2 Jahren entstanden, 20°C.

Links: Ausschnittsvergrößerung.

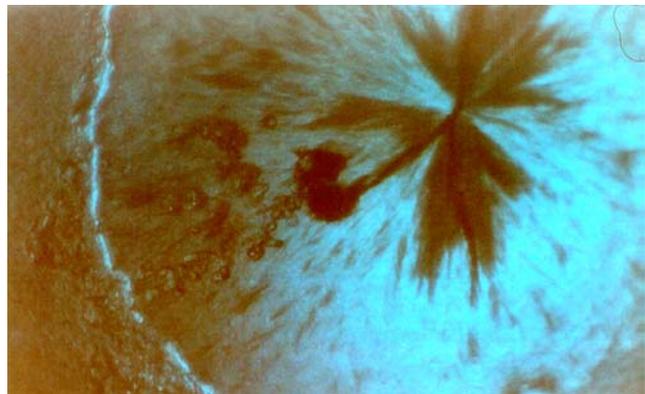
Abb. 68 a-g: Kristallisationstropfen von Phytochrom (Fortsetzung).



(d)
kristallähnliche Strukturen (links),
65 kDa Phytochrom, 10 mg/ml,
0.13 M Natriumcitrat, 20 % Isopropanol,
0.07 M Natriumcacodylat pH 6.5,
nach 3 Wochen, 20°C.



(e)
Unterschiedlich stark präzipitiertes Protein (e-f).



(f)



(g)
Phasentrennung.

5 Diskussion

5.1 D-HicDH

5.1.1 Proteinaufreinigung

Alle Mutanten lassen sich analog zum Wildtyp aus *Inclusion Bodies* aufreinigen. Die Denaturierung der *Inclusion Bodies* und die Renaturierung erfolgten bei den D-HicDH Mutanten E12I, S293H, Y298A und Y298R langsamer, so dass durch die Aminosäureaustausche die Proteinfaltung beeinträchtigt wurde. Bei allen diesen Mutanten gehen intramolekulare Wasserstoffbrücken durch die Aminosäureaustausche verloren. Das bedeutet, dass die Aminosäurereste Glu12, Ser293 und Tyr298 wichtig bei der Bildung von Faltungsintermediaten sind.

Abweichend vom Wildtyp zeigten drei Mutanten (D112I, D202I und D202F) im Ionenaustauschchromatogramm jeweils mehrere eng beieinander liegende Proteinpeaks (Abb. 13 und 14). In SDS- und nativen Gelen zeigten diese Fraktionen ein unterschiedliches Bandenmuster. Es handelt sich somit um verschiedene Isoformen eines Proteins. Die einzelnen Proteinisoformen konnten getrennt weiter charakterisiert werden (enzymatische Aktivität, Schmelzpunkt) und zeigten untereinander große Unterschiede, die unter 5.1.4 näher beschrieben werden.

5.1.2 Änderungen der Substratspezifität

Die enzymatische Aktivität des Wildtyps wurde für 18 verschiedene Substrate getestet. Mit drei Substraten konnten weder beim Wildtyp noch bei den Mutanten eine Umsetzung beobachtet werden. Dabei handelte es sich um Substrate mit starker Verzweigung an der C₃-Position bzw. mit geladenen Resten an der Carbonylgruppe in C₂-Position. Die Substratrete stehen dabei in zu großem sterischen Konflikt mit den Aminosäureresten Tyr298, Tyr100 und His295. Die geladenen Reste nehmen einen größeren Raum ein als der entsprechende Kohlenwasserstoffrest in C₃-Position beim Pyruvat, welches nur geringfügig umgesetzt wird. Es können aus sterischen Gründen keine Wasserstoffbrückenbindungen zu den umliegenden Aminosäureresten ausgebildet werden, durch die kurze geladene Substratrete fixiert werden könnten. Eine große negative Ladungswolke in unmittelbarer Nachbarschaft des aromatischen Rings von Tyr298 führt zur Abstoßung gleicher Ladungen. Eine positive Ladungswolke, die seitlich verschoben

zum aromatischen Ring in einem hydrophoben Bereich liegt, wird auch destabilisiert. Aufgrund dieser sterischen Wechselwirkungen und Ladungseffekte ist es wahrscheinlich, dass Substrate mit kurzen sperrigen oder geladenen Resten aus dem Substratbindungsbereich herausgedreht werden. Dadurch kann die für den katalytischen Prozess erforderliche Geometrie nicht mehr eingehalten werden. Das Sulfat im aktiven Zentrum der Kristallstruktur stellt ein ähnlich kleines geladenes Substratanalogon dar, das verschoben an der Anionenbindungsstelle (Asn76 ND2, Val77 N, Gly78 N) bindet. Dies erklärt auch, dass alle Mutanten keine Reaktion mit diesen drei verzweigten bzw. geladenen Substraten (s.o.) zeigten. Der Austausch Y298A zeigte, dass der Tyrosinrest nicht ausschließlich verantwortlich ist für sterische oder Ladungskonflikte in der C₃-Position des Substrats.

Das Hauptsubstrat der D-HicDH ist Phenylpyruvat, weil es vom Wildtyp am besten zum D-Phenyllactat reduziert wird. Substrate mit unterschiedlich substituierten aromatischen Resten in C₄-Position des Substrats wurden fast genau so gut umgesetzt wie auch aliphatische C₅-C₈ unverzweigte Reste. Substrate mit Verzweigungen in C₄-Position oder mit kürzeren aliphatischen Ketten wurden langsamer reduziert. Noch langsamer wurden Substrate mit einfachen Verzweigungen und negativ geladenen Gruppen in C₃-Position umgesetzt. Diese Abstufung der Reaktivitäten der verschiedenen Substrate konnte auch Kallwaß (1988) für die D-HicDH zeigen. Jedoch fand er beim Umsatz von α -Ketodicarbonsäuren andere Reaktivitäten in Abhängigkeit von der Länge der Substrat-Kohlenwasserstoffkette. In dieser Arbeit zeigte sich Oxalacetat als das am besten umgesetzte α -Ketodicarbonsäure-Substrat, während Kallwaß nur eine Reaktion mit 2-Ketomalonat beobachten konnte. Die Zahlenwerte seiner Aktivitätskonstanten lagen durchgehend bis zu zwei Dimensionen niedriger. Solche Differenzen könnten ihre Ursache in der Herkunft seines Proteins haben. Er reinigte die D-HicDH direkt aus dem Bakterium *L. casei* mit einem völlig anderen Reinigungsprotokoll auf, so dass andere „Fremdstoffe“ in der Proteinlösung vorhanden gewesen sein könnten. Die Berechnung der Aktivitätskonstanten wurden in beiden Fällen über nicht-lineare Regressionsrechnung ermittelt.

Beim Austausch des Aminosäurerestes **Tyr298** gegen Alanin oder Arginin wurde die Aktivität in beiden Mutanten mit allen getesteten Substraten drastisch herabgesetzt. Dies zeigt, dass dieser Rest wichtig für die Substratbindung ist. Der kleine Aminosäurerest Alanin kann die Substrate nicht in die hydrophobe Tasche drücken bzw. dort festhalten. Das größere Platzangebot im aktiven Zentrum wirkt sich auf alle getesteten Substrate gleich destabilisierend aus. Das lange, geladene und flexible Arginin an Stelle des Restes Tyr298 führte bei allen getesteten Substraten zu noch größerem Aktivitätsverlust als bei dem Austausch Y298A. Die K_M-Werte erhöhten sich auf mehr als das 50fache. Es konnte nur bei wenigen Substraten mit langkettigen, nahezu unverzweigten Resten eine Restaktivität gemessen werden. Das Arginin

ragt vermutlich in vielen Konformationen ins aktive Zentrum hinein, denn es findet in der hydrophoben Tasche keine Bindungspartner für Wasserstoff- oder Salzbrückenbindungen. Substrate müssen sich bei der katalytischen Reaktion an diesem beweglichen, geladenen Rest vorbei zu den Substratbindungsstellen bewegen. Zusätzlich kann Arginin auch nicht die Substratbindungstasche von hinten abschirmen und die Substratreste in der hydrophoben Tasche „einschließen“. Erstaunlicherweise wurde in beiden Mutanten Phenylpyruvat als eines der am besten umgesetzten Substrate gefunden. Da der sonst als stabilisierend angenommene aromatische Rest von Tyr298 fehlte, hat die restliche hydrophobe Tasche einen großen Anteil an der Substratbindung. Die Reste Met307 und Leu51 seitlich unterhalb vom Substrat sorgen für eine hydrophobe und unpolare Umgebung für den Substrat-Phenylring.

Der Austausch des Aminosäurerests **Met307** in der Substratdomäne gegen Valin oder Glutamin führte zu einer gleichmäßigen Aktivitätserniedrigung mit allen Substraten. Der polare Rest Glutamin wirkte sich dabei weniger deaktivierend auf die Substratbindung aus als der kleinere hydrophobe Rest Valin. Bei M307Q erhöhten sich die K_M -Werte um das 10-50fache und die Umsatzrate fielen auf etwa 20 %. Bei M307V stiegen die K_M -Werte um das 10-100fache und die Umsatzrate fiel auf 1-10 %. Somit scheint die Größe des Aminosäurerestes in dieser Position ein entscheidender Faktor für die feste Substratbindung zu sein. Die terminale Methylgruppe der Methionin-Seitenkette ist direkt unterhalb des Substrats ausgerichtet und drückt das hydrophobe Substrat von unten an die Bindungsstellen von His295 und Arg234. Ein kleinerer Rest kann diese Fixierung nicht gewährleisten. Da die Mutante M307Q nicht so aktiv ist wie der Wildtyp, könnte der polarere Rest Glutamin, dessen Seitenkette die gleiche Länge hat wie beim Methionin, anders zum Substrat ausgerichtet sein bzw. der Substratrest könnte sich von dem polaren Rest weggedreht haben, z. B. seitlich parallel zum Substrat.

Die zweite Aminosäure seitlich unterhalb vom Substratrest (**Leu51**) ist für die Größe der umgesetzten Substrate verantwortlich. Bei Austausch gegen den großen, sperrigen und unflexiblen Phenylalaninrest änderte sich die Substratspezifität. Kleine Substrate mit C_3 -Grundgerüst werden besser umgesetzt als vom Wildtyp. Dabei wird vor allem der K_M -Wert erniedrigt. Pyruvat ist das Hauptsubstrat. α -Ketobernsteinsäure wird fast ebenso gut umgesetzt, gefolgt von 3-Hydroxypyruvat. Damit konnte gezeigt werden, dass dieser aromatische Aminosäurerest im aktiven Zentrum für die Substratspezifität in den D-LDHs mitverantwortlich ist. In den D-LDHs befindet sich an dieser Stelle ein Tyrosin. Die Umsetzung von Phenylpyruvat wurde durch eine drastische Erhöhung des K_M -Wertes verringert. Trotz des geringen Platzangebots im aktiven Zentrum zeigte dieses Substrat noch Aktivität bedingt durch Stabilisierung des aromatischen Ringes durch die Aromaten in Tyr298 und L51F. Am stärksten ging die Aktivität beim Phenylglyoxylat auf 0.1 % der Wildtypaktivität zurück. Seine rigide

Geometrie scheint in das verkleinerte aktive Zentrum nicht hinein zu passen. Die D-LDH zeigt weder mit Phenylpyruvat noch mit Phenylglyoxylat enzymatische Aktivität. Hierfür scheint ein weiterer Aminosäurerest verantwortlich zu sein.

Ein Tryptophanrest versperrt in den D-LDHs großen Substraten den Zugang zum aktiven Zentrum. Analog sollte durch die Mutante **G136W** auch in der D-HicDH der Zugang zum aktiven Zentrum eingeengt sein. Diese Mutante zeigte das gleiche Aktivitätsprofil wie der Wildtyp. Eine noch durchzuführende Röntgenstruktur dieser Mutante muss Aufschluss darüber geben, ob sich der Tryptophanrest am Eingang des Interdomänenpaltes anders orientiert hat als bei den D-LDHs. Ist dies der Fall, kann diese Mutante gar nicht mit den D-LDHs und ihrer Substratspezifität verglichen werden. Hat sich das Tryptophan genau so orientiert wie in den D-LDHs, dann ist dieser große Aminosäurerest am Eingang zum aktiven Zentrum nicht für die Substratspezifität der D-LDHs verantwortlich, da selbst große Substrate ins aktive Zentrum gelangen können.

Der Austausch eines in der ganzen D-HDH-Familie konservierten Glycins **Gly78** gegen die nächstgrößere Aminosäure Alanin führte zu einem erheblichen Aktivitätsverlust. Der Stickstoff dieser Aminosäure im Peptidgerüst gehört zur Bindungsstelle der Substratcarboxylgruppe. Durch den Austausch mit Alanin wird die Peptidkette etwas rigider, wodurch die Substratbindung nicht mehr so fest ist.

Die Mutation **Y100F** führte zu einer inaktiveren D-HicDH-Mutante bei enzymatischen Tests mit verschiedenen Substraten. Dies verdeutlicht, dass Tyr100 einen großen Anteil an der Bindung der Substratcarboxylgruppe neben weiteren Bindungspartnern (Asn76, Val77 und Gly78) hat. Von unten fixiert das Tyrosin durch eine Wasserstoffbrückenbindung ein Sauerstoffatom der Substratcarboxylgruppe direkt neben dem Cofaktor NADH. In dieser Anordnung kann ein optimaler Hydridtransfer vom NADH bzw. ein Protonentransfer vom His295 auf das Substrat erfolgen. Fehlt diese stark stabilisierende Bindung, so ist das Substrat lockerer im aktiven Zentrum gebunden und der Protonentransfer kann nicht mit der gleichen Geschwindigkeit erfolgen.

5.1.3 Schmelzvorgang und Entfaltung der D-HicDH

Der bislang unbekannte Schmelzvorgang der D-HicDH. läßt sich nun schematisch, wie in Abbildung 69 dargestellt, beschreiben.



Abb. 69: Schematischer Schmelzvorgang der D-HicDH mit den Schmelzpunkten des Wildtyps.

Durch Temperaturerhöhung nimmt die thermische Bewegung der flexiblen Proteinteile zu. Die Gesamtstruktur bleibt jedoch erhalten und bei Temperaturniedrigung kann das Protein sich in diesem Temperaturbereich reversibel in die native Struktur zurückfalten. Bei weiterer Temperaturerhöhung nimmt die Flexibilität so stark zu, dass ein Teil der Struktur- und Faltungselemente durch Brüche von Wasserstoff- und Salzbrückenbindungen im Protein verloren geht.

Ab ca. 40°C lassen sich bei der D-HicDH Veränderungen der Sekundärstrukturanteile im CD-Spektrum feststellen. Beim ersten Schmelzpunkt wird ein Teil der α -helikalen-Sekundärstruktur irreversibel denaturiert. Es lassen sich Überlegungen anstellen, um welche α -Helices es sich hierbei handelt. Hierzu fällt bei Betrachtung der Temperaturfaktoren der Struktur (Abb. 70) auf, dass die Substrat-Domäne wesentlich flexibler ist als die NAD-Domäne. Es liegen ausgedehnte β -Faltblattstrukturen im Inneren der Domänen vor, die von α -Helices umgeben sind. In der größeren NAD-Domäne (200 Aminosäuren gegenüber 130 Aminosäuren in der Substratdomäne) sind die α -Helices stärker fixiert. Die NAD-Domäne ist durch die Dimerisierung des Proteins noch zusätzlich vergrößert und somit weniger solvenszugänglich. In der Substrat-Domäne ist nur die β -Faltblattstruktur rigide. Alle umgebenden Helices besitzen höhere Temperaturfaktoren. Alle Aminosäuren in den flexibleren Helices ($\alpha_{10}1$, $\alpha1$, $\alpha2$, $\alpha3$, $0.5 \times \alpha4$) zusammen ergeben einen Helixanteil von 12 %. Dieser würde genau dem gemessenen Anteil an Helixverlust am ersten Schmelzpunkt entsprechen. In der NAD-Domäne gibt es nur wenig Reste in Helices mit höheren Temperaturfaktoren (α , $3_{10}B$, αH , αI). Insgesamt hätte man dann einen Helixverlust von 20 %. Dies könnte auch noch im Rahmen der Messgenauigkeit der Auswertung der CD-Spektren liegen. Ob tatsächlich diese vermuteten Helices denaturieren oder z. B. nur anteilig in jeder Helix die äußersten Aminosäuren ihren Strukturverband aufgeben, kann mit den Methoden zur Strukturaufklärung noch nicht geklärt werden.

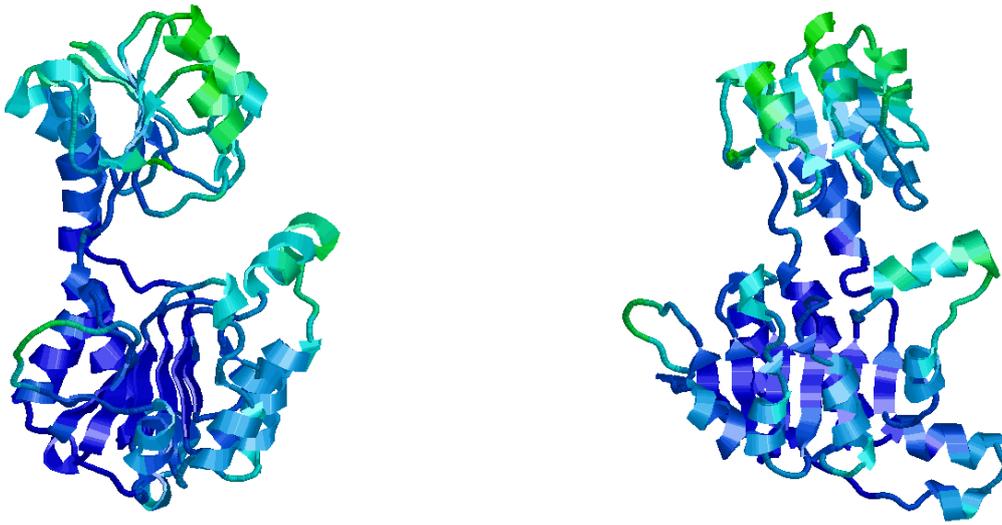


Abb. 70: Die D-HicDH-Struktur (1DXY) gefärbt nach Temperaturfaktoren in zwei Perspektiven. Niedrige Temperaturfaktoren: blau, hohe Temperaturfaktoren: hellgrün.

Rückfaltungsversuche bei 60°C durch Abkühlen der Probe analog zum Aufheizungsexperiment und auch dreifach langsamer ergaben weder DSC-kalorimetrisch noch CD-spektrometrisch aktives bzw. zurückgefaltetes Protein. Wenn sich am ersten Schmelzpunkt die Helices der Substratdomäne entfalten, dann löst sich die Grundstruktur der Substratdomäne auf und der Aktivitätsverlust ist irreversibel.

Der β -Faltblatt-Anteil der Proteinstruktur ist aus CD-Spektren nur schwer zu ermitteln, da sein Signal von dem für α -Helices überlagert wird (Greenfield, 1996). Im Rahmen der Messgenauigkeit stimmen die gemessenen Werte für das native Protein gut mit den aus der Struktur ermittelten Sekundärstrukturanteilen überein. Bis zum zweiten Schmelzpunkt verändern sich die CD-Signale nicht, so dass von einem stabilen Intermediat mit 70 % der nativen Helixstrukturen über einen Temperaturbereich von 40°C ausgegangen werden kann.

Da der zweite Schmelzpunkt bei 98°C liegt, war es nicht möglich mit CD-Spektrometrie die Sekundärstrukturgehalte über diesen Punkt hinaus zu verfolgen. Die Einstellung dieser Temperatur in der Messküvette des CD-Spektrometers ist bei dem offenen CD-System sehr fehlerhaft und kann auf diese Weise nicht weiter untersucht werden. Das DSC liefert exaktere Schmelzpunkte in diesem Bereich, da die Messkammern konstantes Volumen aufweisen und unter Druck bis fast 130°C arbeiten können. Oberhalb des zweiten Schmelzpunktes sollte keine Sekundärstruktur mehr erhalten sein und das Protein ist vollständig denaturiert.

Aus dem Verhältnis der kalorimetrischen zur van't Hoff'schen Schmelzenthalpie kann man für den ersten Schmelzpunkt von einem Entfaltungsmechanismus abhängig von der Struktur der Monomeruntereinheit ausgehen. Beim zweiten Schmelzpunkt ist die weitere Entfaltung des Proteins jedoch abhängig von der Reststruktur des Proteins. Abweichungen zwischen theoretischem und gefundenem $\Delta H/\Delta H_v$ -Verhältnis sind durch Auswertefehler des ΔH_v -Werts bedingt, wie z. B. das Ansetzen der Basislinie. Hinzu kommen experimentelle systematische Fehler durch die Proteinkonzentrationsbestimmung, durch irreversible Denaturierung und durch den vernachlässigten Einfluss der verbliebenen Struktur während des thermischen Entfaltungsprozesses (Li *et al.*, 1998; Pfeil, 1998). Die Enthalpiewerte für den ersten Schmelzpunkt liegen im gleichen Bereich wie für Lysozym und RNase A (Yadav und Ahmad, 2000).

5.1.4 Thermostabilität der D-HicDH-Mutanten

Fast alle Mutanten besaßen wie der Wildtyp zwei Schmelzpunkte. Für die T113M- und D202I-Mutanten konnte exemplarisch auch der Verlust der Sekundärstruktur vor dem ersten Schmelzpunkt in gleicher Weise wie beim Wildtyp gezeigt werden. Bei fünf Mutanten (G136W, D202F, D202I, S293H, Y298R) wurde der erste Schmelzpunkt um mehr als 10°C herabgesetzt, d.h. sie wurden instabiler. Die Mutante D112I besaß einen 1.5°C höheren ersten Schmelzpunkt. Vier Mutanten zeigen eine Erhöhung des zweiten Schmelzpunkts um 3°C (T113M), 6°C (D112I) oder bis zu 20°C (D202F, D202I). L51F zeigt das gleiche Schmelzverhalten wie der Wildtyp. Bei einigen Mutanten lässt sich ein zweiter Schmelzpunkt überhaupt nicht detektieren, da sie sich möglicherweise am ersten Schmelzpunkt komplett oder kontinuierlich über den ganzen Temperaturbereich entfalten. Möglicherweise liegt ihr zweiter Schmelzpunkt oberhalb der Messgrenze.

Das Programm von Leven (1999) zur Bestimmung von Residuen, die für die Thermostabilität von Proteinen von Bedeutung sind, berechnet die Stabilisierung von Strukturelementen bei erhöhten Temperaturen. Proteinaktivitäten werden von dem Programm nicht beachtet. Somit ist die Vorhersage thermostabilerer D-HicDH-Mutanten mit dem Thermostabilitätsprogramm als Erfolg zu werten.

Mehr als die Hälfte aller getesteten speziellen Thermostabilitätsmutanten (vier von sieben Mutanten) zeigten eine Stabilisierung ihrer Sekundärstruktur gegen extrem erhöhte Temperaturen. Die Mutante **T113M** verhielt sich ähnlich wie der Wildtyp und zeigte eine

leichte Erhöhung des zweiten Schmelzpunktes. Durch den Aminosäureaustausch geht eine Wasserstoffbrücke verloren, aber die hydrophobe Umgebung stabilisiert verstärkt den unpolaren Rest im Domäneninneren. Der native Faltungsprozess wird nicht beeinflusst und auch die enzymatische Aktivität ist vergleichbar mit dem Wildtyp.

Der Austausch des polaren Restes Aspartat bei den Aminosäuren Asp112 und Asp202 gegen einen unpolaren hydrophoben Rest führte jeweils zu mehreren, unterschiedlich gefalteten, Proteinkonformeren, die mit Ionenaustauschchromatographie voneinander getrennt werden konnten. Sie besaßen unterschiedliche native elektrophoretische Eigenschaften, Schmelzpunkte und enzymatische Aktivitäten. Somit scheinen diese Reste für den nativen Faltungsprozess wichtig zu sein. Jeweils die ersten beiden Proteinfractionen der **D202I**- und **D202F**-Mutanten, die von der Ionenaustauschersäule eluierten (s. Abb. 13 und 14), zeigten eine gegenüber dem Wildtyp um etwa 20°C erhöhte Stabilität des zweiten Schmelzpunkts. Nur die Mutante D202I besitzt eine dem Wildtyp vergleichbare Aktivität. Der Aminosäurerest Asp202 liegt im Inneren der NAD-Domäne und bildet je eine Wasserstoffbrücke zu His204 und einem Lösungsmittelmolekül aus. Die umliegenden hydrophoben Reste (Ile230, Val200, Ala109, Phe164) stabilisieren den durch Austausch eingefügten hydrophoben Rest. Die Wasserstoffbrücke von Asp202 zu His204 scheint für den katalytischen Mechanismus im aktiven Zentrum wichtig zu sein bzw. für die Bindung des Cosubstrats NADH. His204 ist ein hochkonservierter Rest in der Familie der D-HDHs (Kochhar *et al.*, 1992). Es bildet sich ein ausgedehntes Wasserstoffbrückennetzwerk vom Asp202 zum NAD (Abb. 72).

Bei der D-LDH führt ein Austausch von His204 gegen Lysin zu einer erheblichen Aktivitätserniedrigung (Kochhar *et al.*, 2000). Allerdings können auch sterische Effekte in der hydrophoben Umgebung dafür verantwortlich sein, wie auch die positive Ladung im Domäneninneren. Der Austausch gegen Tyrosin (Taguchi *et al.*, 1993) führt zu keinerlei Aktivitätsverlust. Zu diesem Rest können die Wasserstoffbrücken noch ausgebildet werden. Glutamin (Bernard *et al.*, 1997) beeinflusst die Reaktivität nicht so stark.

Die fehlende Wasserstoffbrücke vom D202I zum His204 beeinflusst den katalytischen Mechanismus bei Raumtemperatur nicht. Allerdings ist die Stabilität bei etwas erhöhten Temperaturen durch größere Flexibilität stark herabgesetzt. Der erste Schmelzpunkt ist 10°C niedriger. Dagegen führt das sperrige Phenylalanin (D202F) auch schon bei Raumtemperatur zu einer starken Beeinflussung der enzymatischen Aktivität. Die Lage des His204 wird wahrscheinlich etwas verschoben, wodurch die übrigen Wasserstoffbrücken nicht mehr die optimalen Geometrien aufweisen. Die Proteininstabilität dieser Mutante verhält sich jedoch analog zur Isoleucin-Variante.

Die erste Fraktion der Ionenaustauschchromatographie der Mutante **D112I** weist eine Stabilisierung des ersten und zweiten Schmelzpunkts auf. Dieser Aminosäurerest liegt lösungsmittelzugänglich an der Dimerisierungs-Kontaktfläche. Die hydrophobe Seitenkette des Isoleucins verdrängt Lösungsmittelmoleküle aus dieser Region. Dadurch kann vermutlich die Stabilität des Dimerkomplexes erhöht werden. Dafür ist die enzymatische Aktivität dieser Fraktion gegenüber dem Wildtyp geringfügig herabgesetzt. Dies könnte durch eine verminderte Flexibilität hervorgerufen werden. Die zweite eluierte Fraktion besitzt volle enzymatische Aktivität bei gleichem zweiten Schmelzpunkt wie die erste Fraktion und einen ersten Schmelzpunkt analog zum Wildtyp.

Die verschiedenen Isoformen der D112I-, D202F- und D202I-Mutanten weisen darauf hin, dass diese Reste an der Proteinfaltung beteiligt sein könnten. Asp202 könnte durch seiner Lage im Inneren einer Domäne als Faltungskeim fungieren. Durch seinen Austausch wird die richtige Proteinrückfaltung behindert, was sich auch in den geringen Ausbeuten bei der Renaturierung zeigt. Asp112 liegt in der Region, in der sich die beiden Monomere zum katalytisch aktiven Dimer zusammenlagern. Die Dimerisierung kann durch unterschiedliche Konformationen ausgetauschter Reste verschieden stark ausgebildet sein.

Bei den Mutanten **E12I** und **S293H** kann nur ein Schmelzpunkt detektiert werden. Das Verhältnis der beiden Wärmekapazitäten weist darauf hin, dass sich beide Mutanten nach völlig anderen Mechanismen als der Wildtyp thermisch entfalten. Beide Mutanten sind katalytisch nahezu inaktiv und ließen sich auch nur sehr schlecht exprimieren. Glu12 liegt an der Oberfläche, zum aktiven Zentrum gerichtet, senkrecht zu Leu51. Es bildet insgesamt fünf Wasserstoffbrückenbindungen zu der Seitenkette von Arg75, dem Peptidgerüst von Arg9 und Gly7 und einem Lösungsmittelmolekül, die alle in der Substratdomäne liegen. Isoleucin kann alle diese strukturstabilisierenden Bindungen nicht ausbilden, was eine Erklärung für den Aktivitätsverlust ist. Trotzdem hat die Mutante den gleichen ersten Schmelzpunkt wie der Wildtyp. Ser293 befindet sich an der Dimerisierungsgrenzfläche. Es bildet zwei Wasserstoffbrücken zum benachbarten β -Faltblatt und eine zu einem Lösungsmittelmolekül, welches über eine weitere Wasserstoffbrücke mit Asp112 verbunden ist. Histidin kann diese Wasserstoffbrücken wohl aus sterischen Gründen nicht aufbauen. Dadurch wird die Proteinstabilität herabgesetzt. Dies zeigt sich in dem niedrigsten gemessenen ersten Schmelzpunkt von S293H.

Eine thermische Stabilisierung wird für die Mutanten D112I, D202I und D202F über Aminosäureatompotentiale (AAP) vorhergesagt, wobei D112I die stärkste stabilisierende Wirkung haben sollte. Die Stabilisierung der Reststruktur vor der Denaturierung, das ist der

Temperaturbereich zwischen den beiden Schmelzpunkten, kann für alle 3 Mutanten bestätigt werden. Dieser Bereich steigt von 42°C im Wildtyp auf über 70°C in den Asp202-Mutanten. Für D112I kann auch eine geringe Stabilisierung der Gesamtstruktur bei Temperaturerhöhung erreicht werden. Beachtenswert ist dabei die Beibehaltung der enzymatischen Aktivität von D112I und D202I. Nach der Vorhersage mit AAP sollte auch die Mutation E12I eine stabilisierende Wirkung haben, die aber nicht beobachtet wurde.

Über Torsionswinkelpotentiale wurde für die Mutation L51F eine erhöhte Thermostabilität vorhergesagt. Diese Mutante zeigt jedoch das gleiche Schmelzverhalten wie der Wildtyp. Die Mutationen T113M und S293H stammen aus einer Kombination beider Vorhersagemethoden. Die T113M-Mutation führt zu einer leichten Stabilisierung gegenüber vollständiger Denaturierung, während die S293H-Mutation eine Erniedrigung der Thermostabilität zur Folge hat.

So kann für die D-HicDH gefolgert werden, dass die Vorhersage thermostabilerer Mutanten mit AAP erfolgreicher war. Austausche im Inneren von Proteinen und Domänen können mit diesem Programm gut vorhergesagt werden, was sich für Asp202 im Inneren der NAD-Domäne bestätigt. Asp112 liegt in der Dimerisierungsgrenzfläche, so dass hier der Zusammenhalt des Dimers stabilisiert wird. Damit liegt dieser Rest in der nativen D-HicDH im Proteininneren. Um weitere Aussagen über die Qualität des Thermostabilitätsprogramms machen zu können, müsste eine größere Anzahl von potentiell thermostabileren Mutanten getestet werden.

5.1.5 Die Struktur der D-HicDH

Die D-HicDH kristallisiert unter den gleichen Fällungsmittelbedingungen in verschiedenen symmetrischen Raumgruppen (kubisch und hexagonal). Ihre Strukturen unterscheiden sich nur sehr wenig voneinander (Tab.28; RMS 0.6-1.0 Å), lediglich äußere *Loops* verlaufen etwas anders (Abb. 41). Die beiden Untereinheiten der P6₃-Zwillingsstruktur zeigen bedeutendere Unterschiede. Nach Übereinanderlegen der NAD-Domänen sind ihre beiden Substratdomänen etwas gedreht (Abb. 43). Sie sollten, wie mit dem Programm DYNDOM bestimmt (Tab. 29), größere Öffnungswinkel zwischen der NAD- und der Substratdomäne besitzen, die aber aus der Struktur nicht in diesem Maße zu erkennen sind. Diese Abweichung ist sicher auch auf die Art der Öffnungswinkelbestimmung zurückzuführen, da die D-HicDH-Struktur dafür erst nach Domänen getrennt auf die FDH-Struktur gefittet werden mußte. Durch geometrische Veränderungen können dabei schon Fehler in die Winkelberechnungen eingeflossen sein.

Die Untereinheit b der P₆₃-Zwillingsstruktur ähnelt der kubischen und der bekannten hexagonalen Struktur, während die Untereinheit a größere Unterschiede sowohl im Verlauf der Peptidkette als auch bei der Ausrichtung der Aminosäurereste zeigt (s.u.).

5.1.5.1 Das aktive Zentrum

Alle drei D-HicDH Strukturen kristallisierten mit unterschiedlichen Substraten in verschiedenen Raumgruppen. Da sich die Strukturen nur wenig unterscheiden, wird bei der Betrachtung der Substratbindung der Einfluß der verschiedenen Kristallpackungen vernachlässigt.

Die Bindung der Substratcarboxylatgruppe erfolgt hauptsächlich über Wasserstoffbrücken der Anionenbindungsstelle (Val77 N, Gly78 N, Asn76 ND2) und Tyr100 OH. Asn76 ND2 ist dabei ein wichtiger Wasserstoffdonor. Dies wurde bislang nur vermutet (Dengler *et al.*, 1997). Den erheblichen Einfluß von Tyr100 auf die Substratbindung konnte bereits durch die geringere Aktivität der Y100F-Mutante gezeigt werden. Arg234 bindet neben dem Wasserstoffion-Überträger His295 an den Substratcarbonylsauerstoff und polarisiert dadurch die Carbonylbindung. Die hydrophoben Reste Leu51 und Met307 füllen den Raum unterhalb und seitlich des Substratrestes. Das hintere Ende der Substratbindungstasche wird von Tyr298 und Arg9 gebildet.

Das Substrat Phenylpyruvat, das Hauptsubstrat der D-HicDH, ist in der kubischen Kristallform alleine im aktiven Zentrum gebunden. In den Strukturen mit anderen Substraten befindet sich immer noch ein Anteil Sulfat an dieser Stelle. Dies spricht für eine hohe Affinität von Phenylpyruvat zu den Bindungsstellen. Es liegt am nächsten an der Carboxylat-Bindungsstelle (Gly78 N, Val77 N, Asn76 ND2) (Tab. 30). Der Carbonylsauerstoff wird von der Arg234-Seitenkette gebunden. Der Phenylring liegt eingebettet in der hydrophoben Tasche (Abb. 44). Der aromatische Rest wird über hydrophobe Wechselwirkungen durch den fast parallel liegenden Aromaten von Tyr298 stabilisiert. Das Ende des Phenylrings zeigt zum Arg9 und Leu51.

Die anderen Substrate 2-Ketocaproat und 2-Ketoisocaproat sind nicht so sperrig und füllen so das aktive Zentrum nicht komplett aus. Sulfationen aus dem Fällungsmittel konkurrieren um die Bindungsstellen. Das unverzweigte langkettige 2-Ketocaproat wird von der D-HicDH als bestes nicht-aromatisches Substrat umgesetzt. So sind in seiner Gegenwart ein Viertel der aktiven Zentren mit Sulfat besetzt. Diese Besetzungen wurden sowohl mit CNS als auch mit SHELX

gefunden. Die Besetzung von 2-Ketocaproat und Sulfat (1DXY) im aktiven Zentrum wurde dagegen nicht verfeinert, sondern als 50%ig angegeben und nur über ihre Temperaturfaktoren verfeinert. Das Sulfat wird vor allem von den Stickstoffatomen in der Anionenbindungsstelle gebunden (Gly78 N, Val77 N, Asn76 ND2) und zusätzlich von Arg234 NH₂. Umgebende Wassermoleküle können ein Wasserstoffbrückennetzwerk aufbauen.

2-Ketocaproat wird in dem P₆₃-Zwillingskristall mit unterschiedlicher Orientierung gebunden. In der Untereinheit a wird die Carboxylgruppe des Substrats nicht vom Arg234 gebunden. Dieser Aminosäurerest ist sogar komplett vom Substrat weggedreht. Auch der Rest Tyr298 steht anders als in allen anderen Strukturen. Er ist etwas ins aktive Zentrum geklappt. Es könnte sich bei diesem aktiven Zentrum um einen früheren Zustand im katalytischen Prozess handeln. Das Substrat ist noch nicht ganz fest gebunden. Der Cofaktor NAD wird über zahlreiche Wasserstoffbrückennetzwerke gebunden (Abb. 71). Zusätzliche stabilisierende Wasserstoffbrücken zwischen dem NAD und dem Protein werden durch Wassermoleküle gebildet. Dabei spielen auch viele Wassermoleküle eine wichtige Rolle, die zusätzliche Wasserstoffbrücken zwischen dem NAD und dem Protein ausbilden.

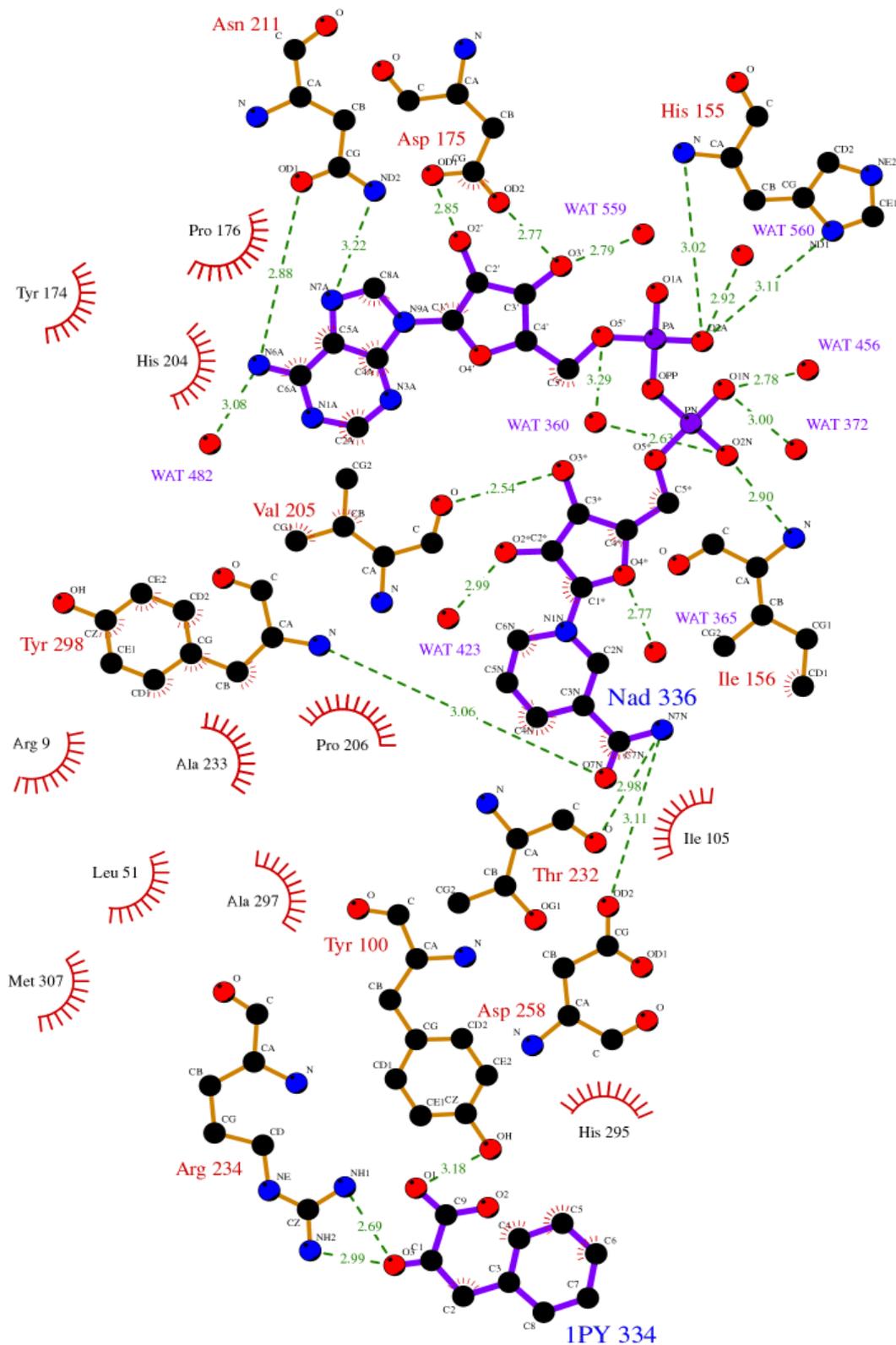


Abb. 71: Protein-Ligand-Bindungen am Beispiel von Phenylpyruvat (1PY) und NAD⁺ im aktiven Zentrum der kubischen D-HicDH Struktur. Die schematische Darstellung wurde mit dem Programm LIGPLOT erstellt.

In der Untereinheit a des $P6_3$ -Zwillingskristalls fehlen einige Wassermoleküle, so dass das NAD nicht so fest gebunden werden kann, was sich in den höheren B-Faktoren der NAD-Atome niederschlägt. Abbildung 72 zeigt exemplarisch die Unterschiede der $P6_3$ -Zwillingsuntereinheit a und der D-HicDH Struktur mit kubischer Raumgruppe in der Umgebung des Ribose-Sauerstoffs O4*. Dieser Ausschnitt wurde ausgewählt, weil er zum Wasserstoffbrückennetzwerk von Asp202 gehört. Dieser Aminosäurerest und seine potentielle Zugehörigkeit zum katalytischen Mechanismus wurde bei den Thermostabilitätsmutanten bereits diskutiert.

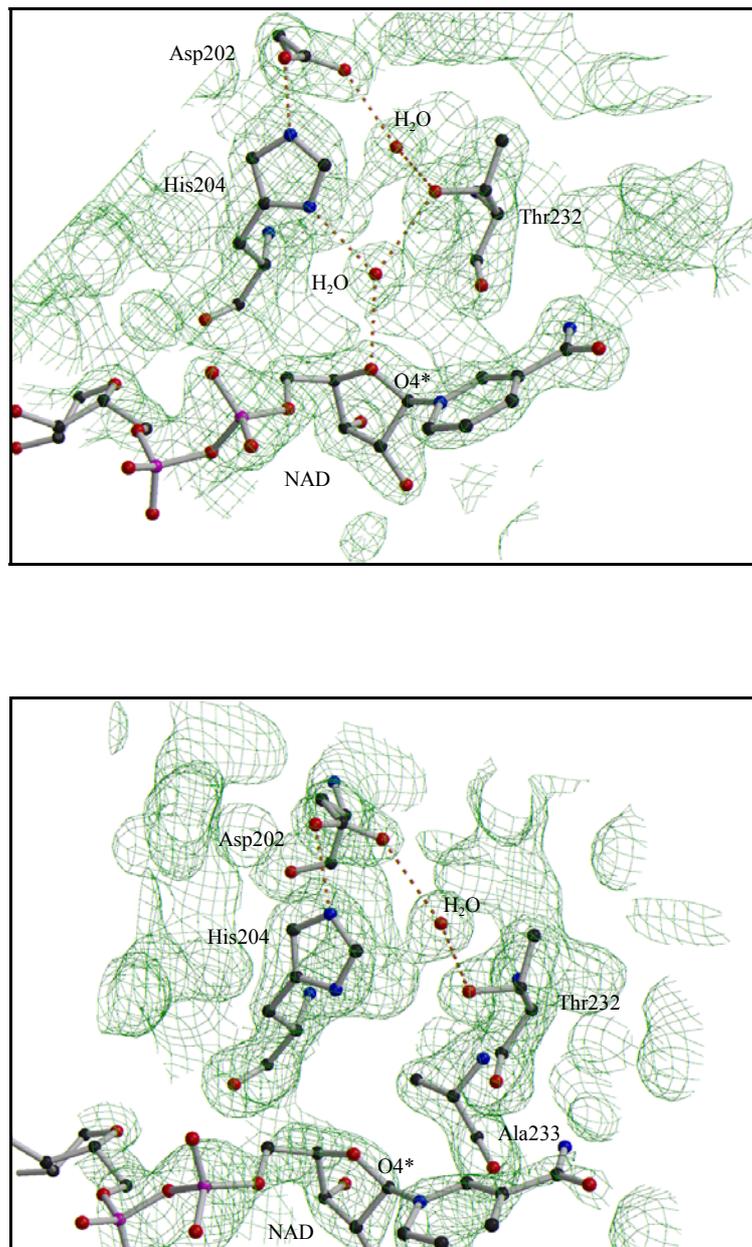


Abb. 72: Umgebung des NAD-Ribose-Atoms O4* in der kubischen Struktur (oben) und in der Untereinheit a des $P6_3$ -Zwillings (unten).

Arg234 kann in der Untereinheit a des P₆₃-Zwillings auch eine starke Wasserstoffbrückenbindung zur Ribose des Nicotinamids ausbilden, wenn es nicht zum Substrat zeigt. Damit wird die gegenteilige Behauptung von Dengler *et al.* (1997) widerlegt. Diese Bindung erfolgt mit Arg234 NE. Jedoch könnte das NAD durch das Zurückklappen des gesamten Arg234-Restes fester gebunden werden. Damit werden verschiedene Zustände in der Cosubstratbindung betrachtet.

Der katalytische Mechanismus könnte wie folgt ablaufen: Nach der Bindung des Substrats klappt die Seitenkette des Arg234 zum Substrat hin. Eine damit verbundene Optimierung der Wasserstoffbrückenbindungen könnte den katalytischen Mechanismus ermöglichen. Das Substrat wird fester eingebunden, Tyr298 wird durch den Substratrest zurückgeklappt, da das Substrat dann näher am NAD zu liegen kommt. Das NAD bewegt sich mit dem Nicotinamidring etwas auf das Substrat zu. Dadurch wird das NAD-Gerüst starrer und Wasser kann das NAD-Gerüst stabilisieren.

Die kubische Kristallstruktur enthält den Cofaktor NAD mit den niedrigsten B-Faktoren der Atome. Das Substrat jedoch hat recht hohe B-Faktoren. Trotzdem kann man in dieser Struktur den Übergang der sp²-Hybridisierung des Carbonylkohlenstoffs zur sp³-Hybridisierung der D-Hydroxylgruppe anhand der Dichte erahnen (Abb. 73). Aus Symmetriegründen wurde in der Struktur die planare Ketogruppenkonformation des Substrats beibehalten.

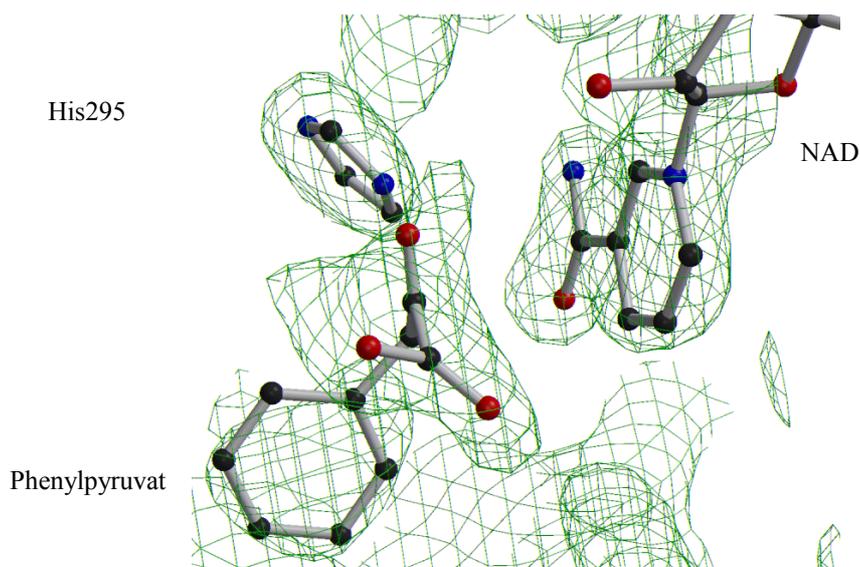


Abb. 73: Phenylpyruvat im aktiven Zentrum der kubischen D-HicDH Struktur.

5.1.5.2 Domänenbewegung

Die Strukturen der D-HicDH weisen untereinander keine wesentlichen Unterschiede im Öffnungswinkel zwischen den Domänen auf. Gegen eine Domänenbewegung beim katalytischen Prozess der D-HicDH spricht die Aktivität der Mutante L51F. Für eine Bewegung der Domänen wäre das sperrige Phenylalanin mitten im aktiven Zentrum hinderlich. Das Substrat Phenylpyruvat kann von der Mutante L51F umgesetzt werden. Die ähnlichen D-LDHs weisen ebenso einen offenen Spalt auf. Auch bei ihnen konnte bislang keine Domänenbewegung bei der enzymatischen Katalyse festgestellt werden. Vermutlich schirmt der sperrige aromatische Rest (Tyr298 in der D-HicDH, Phe300 in der D-LDH) am Eingang zum aktiven Zentrum bei gebundenem Substrat dieses vom Lösungsmittel ab. Die hydrophobe Umgebung um diesen Rest unterstützt dies.

5.2 Phytochrom

5.2.1 Aufreinigung

Bei beiden Phytochromfragmenten konnte durch einen zusätzlichen Aufreinigungsschritt das A_{654}/A_{280} -Verhältnis von 1.2 auf einen bislang nie erreichten Wert von 1.6 verbessert werden. Dies gelang mit Anionenaustauschchromatographie, bei der nicht rekonstituiertes Apoprotein und verschiedene Proteinisoformen abgetrennt wurden.

5.2.2 Charakterisierung

Sowohl das 59 kDa als auch das 65 kDa Phytochromfragment zeigten dasselbe A_{654}/A_{280} -Verhältnis von 1.6. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass das kürzere Fragment ebenfalls voll funktionsfähig ist. Offensichtlich wird das N-terminale 6 kDa Fragment für den Erhalt der spektroskopischen Eigenschaft nicht benötigt. CD-Spektren im VIS-Bereich unterstützen diese Aussage. Die Spektren beider Phytochromfragmente liegen in der P_r -Form bzw. in der P_{fr} -Form fast exakt aufeinander. Lediglich die Umrechnung der Signalhöhen in spezifische Elliptizitäten unter Einbeziehung der Proteinkonzentration kann zu Abweichungen geführt haben, da sich die Proteinkonzentration vom Phytochrom durch die Absorption des Chromophors PCB bei 280 nm nicht genau bestimmen läßt. Frühere Messungen von nativem 124 kDa und 118/114 kDa Phytochrom aus Hafer (Vierstra *et al.*, 1987) zeigten größere Abweichungen, die sicher auch durch die schlechtere Aufreinigungsqualität der Phytochrome aus dem nativen Organismus bedingt waren.

Massenspektren zeigten, dass beide Phytochromfragmente rein in Lösung vorliegen. Auf SDS-Gelen waren bei stark konzentrierten Proben keine weiteren Banden erkennbar. Sowohl die Gelfiltration als auch die DLS wiesen bei beiden Phytochromfragmenten auf ein dimeres Vorliegen in Lösung hin. Dies ist erstaunlich, da die Dimerisierungsdomäne im C-terminalen Teil des nativen Phytochroms A liegt und in beiden bearbeiteten Phytochromfragmenten fehlte. Es könnte somit eine Dimerisierung über die in beiden Fragmenten C-terminal vorhandenen $(\text{His})_6$ -Tags erfolgt sein. Beim Aufkonzentrieren aggregierte das 65 kDa Fragment, während das 59 kDa Fragment weiterhin einheitlich in Lösung vorlag. Das N-terminale 6 kDa Fragment könnte für diese Aggregation verantwortlich sein. Es enthält viele geladene Reste, die elektrostatische Wechselwirkungen eingehen können. Choi *et al.* (1990) stellte fest, dass Phytochrom bei höheren Konzentrationen und Ionenstärken Oligomere bilden kann. Über diese

Wechselwirkungen ist nichts weiter bekannt.

Beide Phytochromfragmente wiesen im IEF-Gel noch zusätzliche Banden in der P_r-Form auf. Es liegen also mehrere Isoformen der Proteine in Lösung vor. Das würde auch die breite Bande im SDS-Gel und die verschwommene Bande im nativen Gel erklären. In nativem Phytochrom A, gereinigt aus etioliertem Hafer, wurden massenspektrometrisch drei Isoformen gefunden (Lapko *et al.*, 1999). Durch die Überexpression in Hefe sollte nur eine Isoform vorhanden sein. In dieser Arbeit durchgeführte Versuche zur Auftrennung von Isoformen durch präparative IEF waren nicht erfolgreich, da das Protein dabei zerstört wurde.

Schmelzkurven zeigten von beiden Phytochromfragmenten ein ähnliches Stabilitätsverhalten gegenüber höheren Temperaturen. Ab etwa 40°C begann sich ihre Sekundärstruktur zu entfalten. Das Apoprotein beider Fragmente dagegen entfaltete sich kontinuierlich bei Temperaturerhöhung über den gesamten Temperaturbereich. Es liegt nicht stabilisiert in Lösung vor, was bedeutet, dass der Chromophor eine stabilisierende Wirkung auf die Gesamtstruktur hat.

5.2.3 Die Sekundärstruktur

Sekundärstrukturvorhersagen und experimentell bestimmte α -Helixanteile ergaben für das 65 kDa Phytochromfragment einen etwas höheren α -Helixanteil als für das 59 kDa Fragment, so dass im N-terminalen 6 kDa Fragment ein Helixbereich liegen muß, der sich jedoch nicht über das gesamte Fragment erstreckt. Aus CD-Spektren ermittelte Sekundärstrukturanteile streuten je nach Auswertungsprogramm erheblich. Für das 65 kDa Apophytochrom wurde ein α -Helixanteil von ca. 35 % gefunden, der mit den Vorhersagen gut übereinstimmt. Sowohl mit den Vorhersagen als auch mit den CD-Spektren konnte ein β -Faltblattanteil erhalten werden, der mit 10 % (Vorhersagen) und ca. 15 % (CD-Spektrum, Apophytochrom) zeigt, dass die Phytochromstruktur nicht zum nur- α -Helix-Strukturtyp gehört wie die des Phycocyanins (Sühnel *et al.*, 1997). Der β -Faltblattanteil läßt sich aus CD-Spektren nur ungenau bestimmen, da das Signal hierfür vom α -Helixsignal überlagert wird (Greenfield, 1996). Die Auswertung des 59 kDa Apophytochrom-Spektrums führte nur mit dem Programm K2D zu einem sinnvollen Ergebnis.

Die P_r- und P_{fr}-CD-Spektren unterschieden sich im Bereich von 200-230 nm, jedoch sind ihre Sekundärstrukturanteile in beiden Phytochromfragmenten vergleichbar. Daher kann nicht die

These von Song und Sommer (1990) und Deforce *et al.* (1994) vertreten werden, dass das N-terminale 6 kDa Fragment erst durch Photokonversion von der P_r-Form in die P_{fr}-Form eine α -Helixstruktur ausbildet.

Die größten Abweichungen bei der Berechnung der Sekundärstrukturanteile aus CD-Spektren ergeben sich, neben der Auswertemethode, durch die Proteinkonzentrationsbestimmung der vermessenen Probe. Die Proteinkonzentrationsbestimmung war beim Phytochrom etwas problematisch, da bei 280 nm auch der Chromophor PCB absorbierte. Diese Absorption wurde bei der Berechnung vernachlässigt. Auch die Ermittlung der Proteinkonzentration aus den P_r/P_{fr}-Differenzspektren wurde unter Annahme des Extinktionskoeffizienten des freien Chromophors in Lösung berechnet. So wurden die Sekundärstrukturanteile der P_r- und P_{fr}-Spektren nur untereinander verglichen.

5.2.4 Kristallisation

Es konnten unter drei Kristallisationsbedingungen Mikrokristalle erhalten werden. Zwei dieser Bedingungen sind sich sehr ähnlich und enthalten nur wenig Salzlösung, so dass die Mikrokristalle wahrscheinlich Proteinkristalle darstellen. Die Kristallisationskeime, mit denen die Kristallisationslösungen angeimpft wurden, konnten unter dem Mikroskop zuvor nicht beobachtet werden. Die Kristallisation aus Ammoniumsulfat ergab bei verschiedenen pH-Werten unterschiedlich große Mikrostiftkristalle, was für Proteinkristalle spricht. Zur genaueren Charakterisierung der Proteinkristalle müßten sie massenspektrometrisch oder mit Gelelektrophorese untersucht werden. Hierfür stehen jedoch nicht genügend Kristalle in ausreichender Größe zur Verfügung.

5.3 Ausblick

Die **D-HicDH** ist durch ihre Reaktion mit einem breiten Substratspektrum ein ideales Enzym zur stereospezifischen Reduktion zahlreicher hydrophober 2-Ketocarbonsäuren zu den entsprechenden D-2-Hydroxycarbonsäuren. Diese finden als Ausgangsstoffe für stereoselektive Synthesen neu modellierter Wirkstoffe, z. B. in der Pharmaindustrie, Anwendung. Um das Substratspektrum der D-HicDH erweitern zu können, könnte der Aminosäurerest Leu51, der auf die Substratspezifität den größten Einfluss hatte, gegen polare oder geladene Aminosäuren ausgetauscht werden.

Die Stabilität eines Proteins gegenüber fremden Umgebungsbedingungen zu erhöhen, ist Ziel zahlreicher Untersuchungen. Hierfür kommen das Prinzip der Zufallsmutagenese und die ortsgerichtete Mutagenese nach bioinformatischen Vorhersagen anhand der Proteinstruktur mit verschiedenen Programmen in Frage. Für organische Synthesen wäre eine größere Stabilität der D-HicDH in organischen Lösungsmitteln wünschenswert. Dafür müsste die Oberfläche hydrophober gestaltet werden. Eine D-HDH aus der halophilen Archaea *Haloferax mediterranei*, die als Hauptsubstrat D-2-Hydroxyisocaproat umsetzt (Bonete *et al.*, 2000), könnte nach Proteinsequenzierung und Strukturlösung im Vergleich zur D-HicDH Informationen über die strukturelle Anpassung der D-HDH-Proteine an extreme Umgebungen liefern. Die Stabilität von Proteinen gegenüber erhöhten Umgebungstemperaturen wird an diesem Arbeitskreis untersucht. Eine Verbesserung der Vorhersagequalität thermostabilerer Austausche des von Leven (1999) erstellten Programms wird z. Z. bearbeitet (Hoppe, persönliche Mitteilung). Mit diesem neuen Programm vorgeschlagene weitere Aminosäureaustausche können mit der D-HicDH leicht untersucht werden, da sich die Methoden der Mutagenese, Proteinexpression und -aufreinigung auf die Mutanten übertragen lassen und das Protein in großen Mengen erhalten werden kann. Die in dieser Arbeit anhand der Vorhersage gefundenen thermostabileren Austausche bei den Aminosäureresten Asp112 und Asp202 können gegen weitere Aminosäuren ausgetauscht werden, um die Funktion dieser Reste bei der Thermostabilität zu überprüfen. Außerdem könnten noch Mutanten untersucht werden, die in dieser Arbeit hergestellt wurden und neben der gewünschten Mutation noch weitere Zufallsmutationen aufweisen.

Die Kristallstruktur von D-HicDH-Mutanten kann veränderte Orientierungen der ausgetauschten Reste zeigen. Dies wäre für eine Funktionsanalyse von der Mutante G136W wichtig, um zu klären, ob der Tryptophanring den Zugang zum aktiven Zentrum abdeckt, wie im Fall der D-LDH, oder ob er sich in eine andere Richtung ausgerichtet hat und damit nichts mit dem

katalytischen Mechanismus zu tun hat. Die Struktur der Mutante L51F mit Substrat im aktiven Zentrum kann das Bindungsverhalten in diesem veränderten aktiven Zentrum erklären.

Kristalle des D-HicDH Wildtyps, die in Ammoniumsulfid als Fällungsmittel gewachsen waren, verloren unter Cryobedingungen sehr schnell ihre Streukraft. Optimiert man die Bedingungen für Tieftemperaturmessungen für diese Kristallisationsbedingung, z. B. bei Verwendung von Lithiumsulfid als Cryoreagenz, könnte man eine Struktur mit reduziertem NADH bekommen. Diese zeigt möglicherweise einen anderen Reaktionsübergangszustand an.

Um reproduzierbarere Kristalle vom **Phytochrom** zu erhalten, kann das Aufreinigungsprotokoll erweitert werden. IEF-Gele zeigen, dass noch weitere Isoformen in der P_i-Form in Lösung vorliegen, die sich bislang nicht voneinander trennen ließen. Präparative IEF in Gelen könnte hierfür getestet werden, allerdings sind die Proteinausbeuten dabei recht gering, so dass man, um eine Proteinlösung für Kristallisationsansätze zu erhalten, diesen Schritt mehrmals durchführen müsste. Der Zusatz von Additiven (wie Isopropanol, Glycerin, DMSO, Ammoniumsulfat, NaCl) bei der Aufreinigung und Konzentration des Phytochroms könnte die Proteinfaltung beeinflussen und nur eine Isoform stabilisieren.

Die Abspaltung des C-terminalen (His)₆-Tags nach der Aufreinigung des Proteins könnte dem Phytochrom zu einem besseren Kristallisationsverhalten verhelfen, da dieser Tag manchmal die Kristallisation eines Proteins verhindert.

Die erhaltenen Mikrokristalle könnten durch *Makro seeding* vergrößert werden. Dann ließe sich massenspektrometrisch zeigen, ob die vorhandenen Kristalle dem entsprechenden Phytochromfragment zugeordnet werden könnten.

6 Literaturverzeichnis

- Adams, M.W.W. und Kelly, R.M. (1998). Finding and using hyperthermophilic enzymes. *Trends Biotechnol.*, **16**, 329-332.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-3402.
- Andrade, M. A., Chadon, P., Merelo, J. J. und Moran, F. (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from uv circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng.*, **6**, 383-390.
- Beck, K., Gambee, J. E., Bohan, C. A. und Bächinger, H. P. (1996). The C-terminal domain of cartilage matrix protein assembles into a triple-stranded α -helical coiled-coil structure. *J. Mol. Biol.*, **256**, 909-923.
- Beale, S.I. (1990). Biosynthesis of the tetrapyrrole pigment precursor, δ aminolevulinic acid. from glutamate. *Plant Physiol.*, **93**, 1273-1279.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, **28**, 235-242.
- Bernard, N., Johnsen, K, Gelpi, J. L., Alvarez, J.A., Ferain, T., Garmyn, D., Hols, Pl, Cortes, A., Clarke, A. R., Holbrook, J.J., Delcour, J. (1997). D-2-hydroxy-4-methyvalerate dehydrogenase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. II. Mutagenic analysis of catalytically important residues. *Eur. J. Biochem.*, **244** (1), 213-219.
- Bonete, M.-J., Ferrer, J., Pire, C. Penades, M. und Ruiz, J. L. (2000). 2-Hydroxyacid dehydrogenase from *Haloferax mediterranei*, a D-isomer-specific member of the 2-hydroxyacid dehydrogenase familiy. *Biochimie*, **82**, 1143-1150.
- Bonner, B.A. (1967). Incorporation of delta aminolevulinic acid into the chromophore of phytochrome. *Plant Physiol.***42**, 11.

- Booth, D. R., Sunde M., Bellotti V., Robinson C. V., Hutchinson W. L., Fraser, P. E., Hawkins, P.N., Dobson, C. M., Radford, S.E., Pepys, M.B., Blake, C.C.F. (1997). Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. *Nature*, **385**, 787-793.
- Boylan, M.T. und Quail, P.H. (1991). Phytochrome A overexpression inhibits hypocotyl elongation in transgenic *Arabidopsis*. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10806-10810.
- Bradford, M. M.(1976). A rapid and sensitiv method for the quantitation of microgram quantities protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Große-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. und Warren, G. L. (1998). Crystallography and NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta. Cryst. D Biol. Cryst.*, **54**, 905-921.
- Brunhuber, N. M., Banerjee, A., Jacobs, W. R. und Blanchard, J. S. (1994). Cloning, sequencing, and expression of Rhodococcus L-phenylalanine dehydrogenase. Sequence comparisons to amino-acid dehydrogenases. *J. Biol. Chem.*, **269**(23), 16203-16211.
- Butcher, A. L. und Tomkins, J. K. (1985). A comparison of silver staining methods for the detecting proteins in ultrathin polyacrylamid gels on support film after isoelectric focussing. *Anal. Biochem.*, **123**, 336-341.
- Bychkova, V.E., Ptitsyn, O.B. (1995). Folding intermediates are involved in genetic diseases? *FEBS Lett.*, **359**, 6-8.
- Carrell, R.W. und Gooptu, B. (1998). Konformational changes and desease-serpins, prions and Alzheimer's. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**, 799-809.
- CCP4 (1994). The ccp4-suite: programs for protein crystallography. *Acta. Cryst. D Biol. Cryst.*, **50**, 760-763.
- Chandra, N., Acharya, K. R. und Moody, P. C. (1999). Analysis and characterization of data from twinned crystals. *Acta Cryst. D Biol. Cryst.*, **55**,1750-1758.

- Cherry, J. R., Hondred, D., Walker, J. M., Keller, J. M., Hershey, H. P. und Vierstra R. D. (1993). Carboxy-terminal deletion analysis of oat phytochrome A reveals the presence of separate domains required for structure and biological activity. *Plant Cell*, **5**, 565-75.
- Choi J. K., Kim I. S., Kwon T. I., Parker W., Song P. S. (1990). Spectral perturbations and oligomer/monomer formation in 124-kilodalton *Avena* phytochrome. *Biochemistry*, **29**, 6883-6891.
- Clack, T., Mathews, S. und Sharrock, R.A. (1994). The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol. Biol.* **25**, 413-427.
- Cordonnier, M.-M., Greppin, H. und Pratt, L.H. (1985). Monoclonal antibodies with differing affinities to the red-absorbing and far-red-absorbing forms of phytochrome. *Biochemistry* **24**, 3246-3253.
- Creighton, T.E (1993). Protein-structures and molecular properties. W. H. Freeman and Company, New York, 2. Aufl.
- Cudney, R., Patel, S., Weisgraber, K., Newhouse, Y. und McPherson, A. (1994). Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth. *Acta. Cryst.*, **D50**, 414-423.
- Delboni., L. F., Mande, S. C., Rentier-Delrue, F., Mainfroid, V., Turley, S. Vellieux, F. M. D., Martial, J. A., Hol, W. G. J. (1995). Crystal structure of recombinant triosephosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. An analysis of potential thermostability factors in sx isomerases with known three dimensional structure points to the importance of hydrophobic interactions. *Protein Sci.*, **4**, 2594-2604.
- Deléage, G., Blanchet, C. und Geourjon, C.. (1997). Secondary consensus prediction: Protein structure prediction. Implications for the biologist. *Biochimie*, **79**, 681-686.
- Deléage, G. und Roux, B. (1987). DPM: An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. *Protein Eng*, **1**, 289-294.
- Dengler, U., Niefind, K., Kieß, M. und Schomburg, D. (1997). Crystal structure of a ternary complex of D-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*, NAD⁺ and 2-oxoisocaproate at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **267**, 640-660.

- Dill, K.A. (1985). Theory for the folding and stability of globular proteins. *Biochem.*, **24**, 1501-1509.
- Dill, K.A. (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, **29**, 7133-7155.
- Dinner, A.R., Sali, A., Smith, L.J., Dobson, C.M. und Karplus, M. (2000). Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. *Trends. Biochem. Sci.*, **25**, 331-339.
- Deforce, L., Tokutomi, S. und Song, P.-S. (1994). Phototransformation of pea phytochrome A induces an increase in α -helical folding of the apoprotein: comparison with a monocot phytochrome A and CD analysis by different methods. *Biochemistry*, **33**, 4918-4922.
- Edgerton, M.D. und Jones, A.M. (1992). Localisation of protein-protein interactions between subunits of phytochrome. *Plant Cell* **4**, 161-171.
- Eigen, M. (1996). Prionics or the kinetic bases of prion diseases. *Biophys. Chem.*, **63**, A1-A18.
- Eklund, H. und Brändén, C. - I. (1987). Crystal structure, coenzyme conformations and protein interactions. In: *Pyridine Nucleotide Coenzymes* (Dolphin, D.N.Y., ed.), 51-98, Wiley, New York.
- Ellis, R. J. und Hartl, F. U. (1999). Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 102-110.
- Elich, T.D., McDonagh A.F., Palma, L.A. und Lagarias, J.C. (1989). Phytochrome chromophore biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **264**, 12902-12908.
- Elich, T.D. und Lagarias, J.C. (1989). Formation of a photoreversible phycoerythrin-apophytochrome adduct *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **264**, 12902-12908.
- Esnouf, R. M. (1997). Bobscript: an extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J. Mol. Graph Model*, **15**, 132-4, 112-3.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. and Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray ionisation for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **246**, 64-71.
- Fersht, A. R. (1995). Optimization of rates of protein folding: The nucleation-condensation mechanism and its implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 10869-10873.

- Fersht, A. (1999). Structure and mechanism in protein science: A guide to enzym catalysis and protein folding. W.H. Freeman und Co., New York.
- Frauenfelder, H., Parak, F. und Young, R. D. (1988). Conformational substates in proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **17**, 451-479.
- French, G. S. und Wilson, K. S. (1978). On the treatment of negative intensity observations. *Acta. Cryst.*, **A34**, 517.
- Frishman, D. und Argos, P. (1996). PREDATOR: Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence. *Protein Eng.*, **9**, 133-142.
- Garnier, J., Gibrat, J.-F. und Robson, B. (1996). GOR IV: GOR secondary structure prediction method version IV. *Methods in Enzymology*, R.F. Doolittle Ed., **266**, 540-553.
- Geourjon, C. und Deleage, G. (1995). SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput. Appl. Biosci.*, **11**, 681-684.
- Gill, S. C. und von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, **182**, 319-326.
- Grau, U. M. (1982). Structural interactions with enzymes. In: *The Pyridine Nucleotide Coenzymes* (Everse, J., Anderson, B & You, Kl, eds), 135-187, Academic Press, New York.
- Greenfield, N. J. (1996). Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Anal. Biochemistry*, **234**, 1-10.
- Griebenow, K. und Klibanov, A. M. (1997). Can conformational changes be responsible for solvent and excipient effects on the catalytic behavior of subtilisin Carlsberg in organic solvents? *Biotechnol. Bioeng.*, **53**, 351-362.
- Grimm, R., Eckershorn, C., Lottspeich, F., Zenger, C. und Rüdiger, W. (1988). Sequence analysis of proteolytic fragments of 124-kilodalton phytochrome from etiolated *Avena sativa L.*: Conclusions on the conformation of the native protein. *Planta* **174**, 396-401.

- Guermeur, Y. (1997) HNN: Combinaison de classifieurs statistiques, Application a la prediction de structure secondaire des proteines. *PhD Thesis*.
- Guermeur, Y., Geourjon, C., Gallinari, P. und Deleage, G. (1999). MLRC Improved Performance in Protein Secondary Structure Prediction by Inhomogeneous Score Combination, *Bioinformatics*, 15, 413-421.
- Hershey, H.P., Barker, R.F., Idler, K.B., Lissemore, J.L. und Quail, P.H. (1985). Analysis of cloned cDNA and genomic sequences for phytochrome: complete amino acid sequence for two gene expressed in etiolated *Avena*. *Nucl. Acids Res.*, **13**, 8543-8559.
- Hildebrandt, P., Hoffmann, A., Lindemann, P., Heibel, G., Braslavsky, S.E., Schaffner, K. Und Schrader, B. (1992). Fourier transform resonance Raman spectroscopy of phytochrome. *Biochemistry* **31**, 7957-7962.
- Hill, C., Gärtner, W., Towner, P., Braslavsky, S.E. und Schaffner, K. (1994). Expression of phytochrome apoprotein from *Avena sativa* in *Escherichia coli* and formation of photoactive chromoproteins by assembly with phycocyanobilin. *Eur. J. Biochem.*, **223**, 69-77.
- Hofmann, K. P. (1999). Signalling states of photoactivated rhodopsin. *Novartis Found Symp.*, **224**, 158-180.
- Hummel, W., Weiss, N. und Kula M. - R. (1984). Isolation and characterization of a bacterium possessing L-phenylalanine dehydrogenase activity. *Arch. Microbiol.*, **137**, 47-52.
- Hummel, W., Schütte, H. und Kula, M. - R. (1985). D-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus casei*. A new enzyme suitable for stereospecific reduction of 2-ketocarboxylic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 7-15.
- Hummel, W. und Kula, M. - R. (1989). Dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds. *Eur. J. Biochem.* **184**, 1-13.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23-28.
- Jaenicke, R. und Bohm, G. (1998). The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8** (6), 738-748.

- Jancarik, J. und Kim, S. H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.*, **24**, 409-411.
- Jones, A.M. und Quail, P.H. (1986). Quaternary structure of 124 kDa phytochrome from *Avena sativa* L.. *Biochemistry*, **25**, 2987-2995.
- Jones, A.M., Allen, C.D., Gardner, G. Und Quail, P.H. (1986). Synthesis of phytochrome apoprotein and chromophore are not coupled abligatorily. *Plant Physiol.*, **81**, 1014-1016.
- Jones, A.M. und Erickson, H.P. (1989). Domain structure of phytochrome from *Avena sativa* visualized by electron microscopy. *Photochem. Photobiol.*, **49**, 479-483.
- Jones, T. A., Zou, J.-Y., Cowan, S.W. und Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst.* **A47**, 110-119.
- Jordan, E.T., Cherry, J.R., Walker, J.M. und Vierstra, R.D. (1995). The amino-terminus of phytochrome A contains two distinct functional domains. *Plant J.*, **9**, 243-257.
- Kabsch, W. und Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded geometrical features. *Biopolymers*, **22**, 2577-2637.
- Kallwaß, H. K. W. (1988). Proteinchemische und enzymatische Charakterisierung der D-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase from *Lactobacillus casei*. Dissertation, Technische Universität Braunschweig.
- Kallwaß, H. K. W. (1992). Potential of R-2-Hydroxyisocaproatedehydrogenase from *Lactobacillus casei* for stereospecific reductions. *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 28-34.
- Karas, M. und Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionisation of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons. *Anal. Chem.*, **60**, 2299-2301.
- Karshikoff, A. und Ladenstein, R. (1998). Proteins from thermophilic and mesophilic organisms essentially do not differ in packing. *Protein Eng.*, **11**, 867-872.
- Kauzmann, W. (1959). *Adv. Protein Chem.*, **14**, 1-63.
- Kidd, D.G. und Lagarias, J.C. (1990). Phytochrome from the green alga *Mesotaenicum caldariorum*. *J. Biol. Chem.*, **265**, 7029-7035.

- Kim, P. S. und Baldwin, R. L. (1990). Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **59**, 631-660.
- King, R. D. und Sternberg, M J. (1996). DSC: Identification and application of the concepts important for accurate and reliable protein secondary structure prediction. *Protein Sci.*, **5**, 2298-310.
- Klibanov, A. M. (1989) Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 141-144.
- Klibanov, A. M. (1997). Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 97-101.
- Kochhar, S., Chuard, N. und Hottinger, H. (1992). Glutamate 264 modulates the pH dependence of the NAD⁺-dependent D-lactate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 20298-20301.
- Kochhar, S., Lamzin, V. S., Razeto, A., Delley M., Hottinger H., Germond J.E. (2000). Roles of His205, His296, His303 and Asp259 in catalysis by NAD⁺-specific D-lactate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.*, **267** (6), 1633-1639.
- Kraulis, P. J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **24**, 946-950.
- Kunugi, S., Suzuki, N., Nishimoto, S., Morisawa, T., Yoshida, M. (1997). Kinetic study of carboxypeptidase Y catalyzed peptide condensation reactions in aqueous-organic solvent. *Biocat. Biotrans.*, **14**, 205-217.
- Kufer, W., Krauss, C. und Scheer, H. (1982). Zwei milde, regioselektive Abbaumethoden von Biliprotein-Chromophoren, *Angew. Chem. Suppl.* 1050-1060.
- Ladenstein, R. und Antranikian, G. (1998). Proteins from hyperthermophiles: Stability and enzymatic catalysis close to the boiling point of water. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **61**, 37-85.
- Lamzin, V. S., Dauter, Z., Popov, V. O., Harutyunyan, E. H. und Wilson, K. S. (1994). High resolution structures of holo and apo formate dehydrogenase. *J. Mol. Biol.*, **236**, 759-785.
- Lapko, V. N., Jiang, X.-Y., Smith, D. L. und Song, P.-S. (1999). Mass spectrometric characterisation of phytochrome A: isoforms and posttranslational modifications. *Protein Science*, **8**, 1032-1044.

- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. und Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**, 283-291.
- Leatherbarrow, R. J. (1998). *GraFit* Version 4.0, Erithacus Software Ltd., Staines, U. K.
- Lerch, H. - P. (1989). Klonierung, Sequenzierung und Expression in *Escherichia coli* des Gens der D-2-Hydroxyisocaproat Dehydrogenase aus *Lactobacillus casei* und des Gens der L-2-Hydroxyisocaproat Dehydrogenase aus *Lactobacillus confusus*. Dissertation, Technische Universität Braunschweig.
- Lerch, H.-P., Blöcker, H., Kallwaß, H., Hoppe, J., Tsai, H. und Collins, J. (1989). Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the D-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase gene of *Lactobacillus casei*. *Gene*, **78**, 47-57.
- Leven, O. (1999). Vorhersage der Thermostabilität von Proteinen. Dissertation, Universität zu Köln.
- Levin, J. M., Robson, B. und Garnier, J. (1997). SIMPA96: An algorithm for secondary structure determination in proteins based on sequence similarity. *FEBS Lett.*, **205**, 303-308.
- Li, L. und Lagarias, J. C. (1994). Phytochrome assembly in living cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 12535-125359.
- Lindner, I., Gärtner, W., Braslavsky, S.E. und Schaffner, K. (1997). Synthesis of phytochromobilin, the chromophore of the plant photoreceptor phytochrome, and its 'iso'-derivative. *Angew. Chem.*, zur Veröffentlichung eingereicht.
- Mach, H., Middaugh, C. R. und Lewis, R. V. (1992). Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in native proteins. *Anal. Biochem.*, **200**, 74-80.
- Massa, W. (1996). Kristallstrukturbestimmung. B. G. Teubner, Stuttgart, 2. Auflage.
- Masters, C. L. und Beyreuther, K. (1997). Spongiform encephalopathies: tracking turncoat prion proteins. *Nature*, **388**, 228-229.
- Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.*, **33**, 491-497.

- McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallisation. *Eur. J. Biochem.*, **189**, 1-23.
- Merritt, E. A. und Bacon, D. J. (1997). Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Meth. Enzymol.*, **277**, 505-524.
- Mohr, H. und Schopfer, P. (1987). Photomorphogenese. In *Lehrbuch der Pflanzenphysiologie*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 311-345.
- Mozley, D., Remberg, A. und Gärtner, W. (1997). Large-scale generation of affinity-purified recombinant phytochrome chromopeptide. *Photochem. Photobiol.*, **66**, 710-715.
- Nakasako, M., Wada, M., tokutomi, S., Yamamoto, K.T., Sakai, J., Kataoka, M., Tokunaga, F. und Furuya, M. (1990). Quarternary structure of pea phytochrome I dimer studied with small-angle X-ray scattering and rotatory-shadowing electron microscopy. *Photochem. Photobiol.*, **52**, 3-12.
- Nakazawa, M. und Manabe, K. (1993). Differential exposure of tryptophan residues in the red and far-red light absorbing forms of phytochrome, as revealed by chemical modification. *Plant Cell Physiol.*, **34**, 1097-1105.
- Nölting, B. und Andert, K. (2000). Mechanism of protein folding. *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **41**, 288-298.
- Otwinowski, Z. und Minor, W. (1997). Processing of x-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Meth. Enzymol.*, **276**, 407-427.
- Pace, C. N. (2000). Single Surface stabilizer, *Nat. Struct. Biol.*, **7** (5), 345-346.
- Pearson, W. R. (1990). Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA. *Meth. Enzymol.*, **183**, 63-98.
- Pfeil, W. (1998). Protein stability and folding. Springer Verlag, Berlin.
- Provencher, S. W. und Glöckner, J. (1981). Estimation of globular protein secondary structure from circular dicroism. *Biochemistry*, **20**, 537-543.
- Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **95**, 13363-13383.
- Pschyrembel, W. (1994). Klinisches Wörterbuch. 257. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin.

- Querol, E., Perez-Pons, J. A. und Mozo-Villarias, A. (1996). Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability, *Prot. Eng.*, **9**, 265-271.
- Quail, P.H., Boylan, M.T., Parks, B.M., Short, T.W., Xu, Y. Und Wagner, D. (1995). Phytochromes: Photosensory perception and signal transduction, *Science*, **268**, 675-680.
- Radford, S. E. und Dobson, C. M. (1999). From computer simulations to human disease: emerging themes in protein folding. *Cell.*, **97**, 291-298.
- Rajek, M. (1999). Proteinchemische Untersuchungen an rekombinatem Phytochrom A aus Hafer. *Diplomarbeit*, Düsseldorf.
- Rost, B. und Sander, C. (1993). PHD: Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J. Mol. Biol.*, **232**, 584-99.
- Russell, R. B. und Barton, G. J. (1992). Multiple protein sequence alignment from tertiary structure comparison: assignment of global and residue confidence levels. *Proteins*, **14**, 309-323.
- Russell, R. J., Hough, D. W., Danson, M. J. und Taylor, G. L. (1994). The crystal structure of citrate synthase from the thermophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum*. *Structure*, **2** (12), 1157-1167.
- Russell, R. J. und Taylor, G. L. (1995). Engineering thermostability: lessons from thermophilic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **6**, 370-374.
- Sambrook, J. und Gething, M. J. (1989). Protein Structure. Chaperones, paperones. *Nature*, **342**, 224-225.
- Santos, N. C. und Castanho, M. A. (1996). Teaching light scattering spectroscopy: the dimension and shape of tobacco mosaic virus. *Biophys. J.*, **71**, 1641-1650 [published erratum appears in: *Biophys. J.*, **72**, 1481 (1997)].
- Sayle, R. A. and Milner-White, E. J. (1995). RasMol: Biomolecular graphics for all. *Trends in Biochemical Sciences*, **20**, 374-376.
- Schneider-Poetsch, H.A.W., Braun, B. und Rüdiger, W. (1989). Phytochrome - all regions marked by a set of monoclonal antibodies reflect conformational changes. *Planta*, **177**, 511-514.

- Schomburg, D. und Reichelt, J. (1988). BRAGI: A comprehensive protein-modelling programme system. *J. Mol. Graph.*, **6**, 161-165.
- Schröder, M. (1997). Untersuchungen zur automatisierten Ermittlung idealer Kristallisationsbedingungen von Proteinen. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Schuller, D. J., Grant, G. A. und Banaszak, L. J. (1995). The allosteric ligand site in the Vmax-type cooperative enzyme phosphoglycerate dehydrogenase. *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 69-76.
- Schütte, H., Hummel, W. und Kula, M. - R. (1984). L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase: New enzyme from *Lactobacillus confusus* for the stereospezifische reduction of 2-ketocarboxylic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 167-176.
- Schütte, H., Hummel, W. und Kula, M. - R. (1985). Improved enzyme screening by automated fast protein liquid chromatography. *Anal Biochem.*, **151**(2), 547-53.
- Sharrock, R.A. und Quail, P.H. (1989). Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana* structure, evolution, and differential expression of plant regulatory photoreceptor family. *GENES and DEVELOPMENT*, **3**, 1745-1757.
- Singh, B.R., Song, P.-S., Eilfeld, P. Und Rüdiger, W. (1989). Differential exposure of aromatic amino acids in the red-light-absorbing and far-red-light-absorbing forms of 124 kDa oat phytochrome. *Eur. J. Biochem.*, **184**, 715-721.
- Singh, B.R. und Song, P.-S. (1990). A differential molecular topography of P_r and P_{fr} forms of native oat phytochrome as probed by fluorescence quenching. *Planta*, **181**, 263-267.
- Sreerama, N. und Woody, R. W. (1993). A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.*, **209**, 32-44.
- Stockhaus, J., Nagatani, A., Halfter, U., Kay, S., Furuya, M. und Chua, N. H. (1992). Serine-to-alanine substitutions at the amino-terminal region of phytochrome A result in an increase in biological activity. *Genes Dev*, **6**, 2364-72 .
- Stoll, V.S., Kimber, M.S. und Pai, E. (1996). Insights into substrate binding by D-2-ketoacid dehydrogenases from the structure of *Lactobacillus pentosus* D-lactate dehydrogenase. *Structure*, **4**, 437-447.

- Sühnel, J., Hermann, G., Dornberger, U. und Fritzsche, H. (1997). Computer analysis of phytochrome sequences and reevaluation of the phytochrome secondary structure by fourier transform infrared spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1340**, 253-267.
- Taguchi, H. und Ohta, T. (1993). Histidine 296 is essential for the catalysis in *Lactobacillus plantarum* D-lactate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **268**, 18030-18034.
- Taguchi, H. und Ohta, T. (1994). Essential role of arginine 235 in the substrate-binding of *lactobacillus plantarum* D-lactate dehydrogenase. *J. Biochem.*, **115**, 930-936.
- Taguchi, H., Ohta, T. und Matsuzawa, H. (1997). Involvement of Glu-264 and Arg-235 in the essential interaction between the catalytic imidazole and substrate for the D-lactate dehydrogenase catalysis. *J Biochem (Tokyo)*, **122** (4), 802-809.
- Tokutomi, S., Nakasako, M., Sakai, J., Kataoka, M., Yamamoto, K.T., Wada, M., Tokunaga, F. Und Furuya, M. (1989). A model for the dimeric molecular structure of phytochrome based on small-angle X-ray scattering. *FEBS Lett.*, **247**, 139-142.
- Toyama, A., Nakazawa, M., Manabe, K., Takeuchi, H. und Harada, I. (1993). Ultraviolet resonance raman spectra of phytochrome: A comparison of the environments of tryptophan side chains between red light-absorbing and far-red light-absorbing forms. *Photochem. Photobiol.*, **57**, 391-395.
- Udgaonkar, J. B. und Baldwin, R. L. (1988). NMR evidence for an early framework intermediate on the folding pathway of ribonuclease A. *Nature*, **335**, 694-699.
- Vielle, C., Burdette, D. S. und Zeikus, J. G. (1996). Thermozyms. *Biotechnol. Annu. Rev.*, **2**, 1-83.
- Vierstra, R.D. und Quail, P.H. (1982). Proteolysis alters the spectral properties of 124 kDalton phytochrome from *Avena*. *Planta*, **156**, 158-165.
- Vierstra, R. D., Quail, P. H., Hahn, T.-R. und Song, P.-S. (1987). Comparison of the protein conformations between different forms (P_r and P_{fr}) of native (124 kDa) and degraded (118/114 kDa) phytochromes from *Avena sativa*. *Photochemistry and Photobiology*, 429-432.
- Vierstra, R.D. (1993). Phytochrome degradation. In: *Photomorphogenesis in plants - 2nd Edition* (Kendrick, R.E. and Kronenberg, G.H.M. eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherland, 141-160.

- Vinals, C., De Bolle, X., Depiereux, E. und Feytmans, E. (1995). Knowledge-based modeling of the D-lactate dehydrogenase three-dimensional structure, *Proteins: Struct. Funct. Genet.*, **21**, 307-318.
- Waldman, A. D., Hart, K. W., Clarke, A. R., Wigley, D. B., Barstow, D. A., Atkinson, T., Chia, W. N. und Holbrook, J. J. (1988). The use of genetically engineered tryptophan to identify the movement of a domain of *B. stearothermophilus* lactate dehydrogenase with the process which limits the steady-state turnover of the enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **150**, 752-759.
- Wallace, A. C. und Laskowski, R. A. und Thornton, J. M. (1995). LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.*, **8**, 127-134.
- Wandrey, C., Fiolitakis, E., Wichmann, U. und Kula, M. - R. (1984). L-Aminoacids from a racemic mixture of α -hydroxy acids. In: *Enzyme Engineering*, **7**, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **434**, 91-94.
- Warren, G. L. und Petsko, G. A. (1995). Composition analysis of alpha-helices in thermophilic organisms. *Protein Eng.*, **8**, 905-913.
- Weber, P. C. (1991). Physical principles of protein crystallization. *Adv Protein Chem.*, **41**, 1-36.
- Wetlaufer, D.B. (1973), Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 697-701.
- Xu, Y., Parks, B.M., Short, T.W. und Quail, P.H. (1995). Missense mutations define a restricted segment in the C-terminal domain of phytochrome A critical to its regulatory activity. *Plant Cell*, **7**, 1433-1443.
- Yadav, S. und Ahmad, F. (2000). A new method for the denaturation of stability parameters of proteins from their heat-induced denaturation curves. *Anal. Biochem.*, **283**, 207-213.
- Yeates, T. O. (1997). Detecting and overcoming crystal twinning. *Meth. Enzym.*, **276**, 344-358.
- Yinals, C., Depiereux, E., Feytmans, E. (1993). Prediction of structurally conserved regions of D-specific hydroxy acid dehydrogenases by multiple alignment with formate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **192**, 182.

Anhang

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Auswertungsstatistiken der NAD-abhängigen D-2-Hydroxysäure Dehydrogenase Strukturen
- Tabelle 2: Oligonukleotidsequenzen der für die Mutagenese und die Plasmidsequenzierung verwendeten Primer
- Tabelle 3: Substrate der D-HicDH, Ph = C₆H₆
- Tabelle 4: verwendete Geräte
- Tabelle 5: verwendete Programme zur Auswertung von Daten in dieser Arbeit
- Tabelle 6: Inputskripte für die Verfeinerung der beiden Datensätze
- Tabelle 7: Aminosäureaustausche im aktiven Zentrum
- Tabelle 8: Thermostabilitätsmutanten mit den berechneten Werten für Aminosäureaustausche aus Aminosäureatompotentialen (AAP) und Torsionswinkelpotentialen (TP) nach Leven (1999).
- Tabelle 9: Mutanten der D-HicDH und ihre Austausch, Nup: Nukleotidposition
- Tabelle 10: Proteinaufreinigung und spezifische Aktivität von D-HicDH wt und Mutanten mit den Substraten 2-Ketoisocaproat und Phenylpyruvat
- Tabelle 11: Analyse der D-HicDH Teilchengröße in Proteinkristallisationslösungen
- Tabelle 12: Mit DSC bestimmte Schmelzpunkte von D-HicDH und Mutanten
- Tabelle 13: Mit DSC bestimmte Schmelzenthalpien von D-HicDH und Mutanten

- Tabelle 14: Sekundärstrukturanteile der D-HicDH aus der Struktur und mit dem Programm K2D aus CD-Messungen bei verschiedenen Temperaturen berechnet.
- Tabelle 15: Aktivitätstest D-HicDH **Wt**, $M_w = 36893$ g/mol, $E_0 = 5.4$ mg/ml
- Tabelle 16: Aktivitätstest D-HicDH **Y298A**, $M_w = 36801$ g/mol, $E_0 = 7.4$ mg/ml
- Tabelle 17: Aktivitätstest D-HicDH **Y298R**, $M_w = 36886$ g/mol, $E_0 = 23$ mg/ml.
- Tabelle 18: Aktivitätstest D-HicDH **L51F**, $M_w = 36927$ g/mol, $E_0 = 9.3$ mg/ml
- Tabelle 19: Aktivitätstest D-HicDH **G136W**, $M_w = 37022$ g/mol, $E_0 = 8.7$ mg/ml
- Tabelle 20: Aktivitätstest D-HicDH **Y100F**, $M_w = 36877$ g/mol, $E_0 = 10.8$ mg/ml
- Tabelle 21: Aktivitätstest D-HicDH **M307V**, $M_w = 36861$ g/mol, $E_0 = 14.7$ mg/ml
- Tabelle 22: Aktivitätstest D-HicDH **M307Q**, $M_w = 36890$ g/mol, $E_0 = 4.3$ mg/ml
- Tabelle 23: Aktivitätstest D-HicDH **G78A**, $M_w = 36907$ g/mol, $E_0 = 3.6$ mg/ml
- Tabelle 24: Statistikwerte des hexagonalen (Raumgruppe $P6_3$) und des kubischen (Raumgruppe $P4_332$) Datensatzes der D-HicDH wt
- Tabelle 25: Verzwillingungstest des kubischen und des hexagonalen Datensatzes mit dem Programm DETECT_TWANNING aus CNS
- Tabelle 26: Strukturverfeinerungsschritte des kubischen Datensatzes mit CNS
- Tabelle 27: Strukturverfeinerungsschritte des hexagonalen Datensatzes mit CNS
- Tabelle 28: Mit PROFIT ermittelte mittlere Abweichungen (RMS in Å) der 4 D-HicDH Strukturen voneinander
- Tabelle 29: Öffnungswinkel der D-HicDH-Strukturen zwischen der Substrat- und der NAD-Domäne, ermittelt mit dem Programm DYNDOM (aus CCP4).

-
- Tabelle 30: Atomabstände Substrat-Aminosäurereste in den vier aktiven Zentren der D-HicDH in Å
- Tabelle 31: Atomabstände NAD-Aminosäurereste in den vier aktiven Zentren der D-HicDH in Å
- Tabelle 32: Proteinausbeuten bei der Aufreinigung des 59 und 65 kDa Phytochroms
- Tabelle 33: Peakzuordnung zu den MALDI-TOF-Massenspektren aus den Abbildungen 57-59 mit Angabe der Proteinmassen in Da.
- Tabelle 34: Ermittlung der Molekülgröße und -verteilung in Lösung mit Hilfe der DLS
- Tabelle 35: Sekundärstrukturanteile der Vorhersageprogramme für das 59, 65 und 124 kDa Phytochrom A aus Hafer.
- Tabelle 36: Sekundärstrukturanteile des 59 und 65 kDa Phytochroms aus CD-Spektren.
- Tabelle 37: Sekundärstrukturanalyse mit K2D beim Schmelzvorgang von Phytochrom Apo- (59 kDa) und Holoprotein (65 kDa).

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Die von der D-HicDH katalysierte NADH abhängige, reversible, stereospezifische Umsetzung zwischen 2-Ketocarboxylsäuren und D-2-Hydroxycarboxylsäuren.
- Abb. 2: Zwei verschiedene Perspektiven der dimeren D-HicDH-Struktur mit einheitlicher Färbung der Sekundärstrukturelemente innerhalb einer Untereinheit.
- Abb. 3: Eine Untereinheit der D-HicDH mit den Substraten 2-Ketoisocaproat (grau), Sulfat (gelb) und NAD (grau).
- Abb. 4: Das aktive Zentrum der D-HicDH aus *L. casei* (PDB: 1DXY) mit den Substraten 2-Ketoisocaproat (dunkelgrau) und Sulfat (gelb) und dem Cofaktor NAD (hellgrau) aus zwei Perspektiven.
- Abb. 5: Schematische Darstellung des Phytochromobilins in der P_r-Form.
- Abb. 6: Absorptionsspektrum der P_r- und P_{fr}-Form des 59 kDa Phytochrom A-Fragments aus Hafer mit dem Chromophor PCB.
- Abb. 7: Schematische Darstellung der Funktionen von Phytochromabschnitten. Die Chromophorbindungsstelle an Position 321 ist gekennzeichnet.
- Abb. 8: Schematische Darstellung aller in dieser Arbeit verwendeten Methoden. Rote Pfeile stehen für die Bearbeitung der D-HicDH, grüne Pfeile zeigen den Weg des Phytochroms.
- Abb. 9: Kristallisation von Proteinen nach der Methode des hängenden (links) und des sitzenden Tropfens (rechts).
- Abb. 10: Plasmid pHL4 mit dem D-HicDH-Gen.
- Abb. 11: Aufreinigungsschema der D-HicDH wt und Mutante.

- Abb. 12: Ionenaustauschchromatogramm von wt D-HicDH.
- Abb. 13: Ionenaustauschchromatogramm der Mutante D112I.
- Abb. 14: Ionenaustauschchromatogramm der Mutante D202I.
- Abb. 15: SDS-Gel (oben) und natives Gel (unten) der Aufreinigung von wt D-HicDH.
- Abb. 16: Untersuchung der Ionenaustauscher-Elutionsfraktionen der Mutanten D112I (links) und D202I (rechts) mit nativer Gelelektrophorese.
- Abb. 17: Isoelektrische Fokussierung der D-HicDH auf einem PHAST-Gel IEF pH 5-8 von Pharmacia..
- Abb. 18: MALDI-TOF-Massenspektrum von der D-HicDH-Mutante M307V.
- Abb. 19: Gelfiltration der D-HicDH wt.
- Abb. 20: DSC-Schmelzkurven von D-HicDH wt und Mutante D202F Fraktion 70-76.
- Abb. 21: CD-Schmelzkurve von D-HicDH Wildtyp.
- Abb. 22: CD-Schmelzkurve von D202I Fraktion 64/65
- Abb. 23: CD-Wellenlängen-Scans in 10°C Schritten während des Schmelzvorgangs. 0.2 mg/ml Wildtyp D-HicDH.
- Abb. 24: CD-Wellenlängen-Scans bei 20°C (natives Protein)
- Abb. 25: Logarithmische Darstellung der K_M -Werte verschiedener Substrate der D-HicDH Wildtyp.
- Abb. 26: Logarithmische Darstellung der k_{cat} -Werte verschiedener Substrate der D-HicDH Wildtyp.
- Abb. 27: Logarithmische Darstellung der k_{cat}/K_M -Werte verschiedener Substrate der D-HicDH Wildtyp.

- Abb. 28: Logarithmische Darstellung der k_{cat} - bzw. K_{M} -Werte verschiedener Substrate der D-HicDH Mutante Y298A.
- Abb. 29: Logarithmische Darstellung der k_{cat} - bzw. K_{M} -Werte verschiedener Substrate der D-HicDH Mutante Y298R.
- Abb. 30: Logarithmische Darstellung der k_{cat} - bzw. K_{M} -Werte verschiedener Substrate der D-HicDH Mutante L51F.
- Abb. 31: Logarithmische Darstellung der k_{cat} - bzw. K_{M} -Werte verschiedener Substrate der D-HicDH Mutante G136W.
- Abb. 32: Logarithmische Darstellung der k_{cat} - bzw. K_{M} -Werte verschiedener Substrate der D-HicDH Mutante Y100F.
- Abb. 33: Logarithmische Darstellung der k_{cat} - bzw. K_{M} -Werte verschiedener Substrate der D-HicDH Mutante M307V.
- Abb. 34: Logarithmische Darstellung der k_{cat} - bzw. K_{M} -Werte verschiedener Substrate der D-HicDH Mutante M307Q.
- Abb. 35: Logarithmische Darstellung der k_{cat} - bzw. K_{M} -Werte verschiedener Substrate der D-HicDH Mutante G78A.
- Abb. 36: Logarithmische Auftragungen der effektiven Aktivitäten $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ jeder Mutante im Verhältnis zum Wildtyp.
- Abb. 37: D-HicDH-Kristalle unter verschiedenen Kristallisationsbedingungen.
- Abb. 38: Beugungsbild des niedrig auflösenden kubischen Datensatzes.
- Abb. 39: Beugungsbild des hoch auflösenden kubischen Datensatzes.
- Abb. 40: Kumulative Intensitätsverteilung der azentrischen (A) und zentrischen (C) Reflexe des kubischen (oben) und des hexagonalen (unten) Datensatzes aus TRUNCATE im Vergleich zu theoretisch (th.) berechneten Verteilungen.

- Abb. 41: Mit PROFIT ermittelte Abweichungen (RMS in Å) der D-HicDH Strukturen voneinander
- Abb. 42: Mit PROFIT ermittelte Abweichungen (RMS in Å) der D-HicDH Strukturen voneinander
- Abb. 43: Die vier Strukturen der D-HicDH Monomere
- Abb. 44: Das aktive Zentrum der vier D-HicDH-Monomere aus drei Perspektiven
- Abb. 45: Nummerierung der Substratome, links: 2-Ketoisocaproat (OIC), mitte: 2-Ketocaproat (OCA), rechts: Phenylpyruvat (PY).
- Abb. 46: Nummerierung der NAD-Atome. P_{6,22} (1DXY): rot, P_{4,32} und P_{6,3}-Zwilling: schwarz.
- Abb. 47: Mit PROFIT ermittelte Abweichungen (RMS in Å) der beiden Untereinheiten ähnlicher D-HicDH-Strukturen.
- Abb. 48: Die Strukturen der D-HicDH und der D-LDH Monomere
- Abb. 49: Aufreinigungsschema von Phytochrom.
- Abb. 50 a: Ionenaustauschchromatogramm des 59 kDa-Phytochroms A auf einer Mono Q HR 10/10-Säule von Pharmacia
- Abb. 50 b: Ionenaustauschchromatogramm des 65 kDa-Phytochroms A auf einer Mono Q HR 10/10-Säule von Pharmacia
- Abb. 51: Absorptionsspektrum vom 65 kDa Phytochrom A Fragment in der P_r-Form
- Abb. 52: SDS-PHAST-Gel von 65 kDa Phytochrom
- Abb. 53: Natives PHAST-Gel von 65 kDa Phytochrom
- Abb. 54: Isoelektrische Fokussierungen von 65 kDa Phytochrom in der P_r-/P_{fr}-Form

- Abb. 55: IEF-Analyse der Fraktionen nach Ionenaustauschchromatographie von 65 kDa Phytochrom in der P_r-Form
- Abb. 56: Titrationskurve von 65 kDa Phytochrom, P_r-Form
- Abb. 57: MALDI-TOF-Massenspektrum von 65 kDa Phytochrom nach Reinigung durch Affinitätschromatographie
- Abb. 58: MALDI-TOF-Massenspektrum von 65 kDa Phytochrom nach Ionenaustausch-Chromatographie
- Abb. 59: MALDI-TOF-Massenspektrum von 59 kDa Phytochrom nach Ionenaustausch-Chromatographie.
- Abb. 60: ESI-Massenspektrum von 65 kDa Phytochrom.
- Abb. 61: Gelfiltration des 65 kDa-Phytochroms auf einer Sephadex 200 HR 10/30-Säule von Pharmacia
- Abb. 62: Sekundärstrukturvorhersage des N-terminalen 6 kDa Phytochromfragments (phy) mit verschiedenen Programmen
- Abb. 63: Schematische Darstellung der Sekundärstrukturelemente
- Abb. 64: CD-Spektren zur Sekundärstrukturanalyse von 59 und 65 kDa Phytochrom
- Abb. 65: CD-Spektren von 59 und 65 kDa Phytochrom A in der P_r- und P_{fr}-Form im VIS-Bereich
- Abb. 66: Schmelzkurven von 59 und 65 kDa Phytochrom (oben) und 59 kDa Apoprotein (unten) in 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8.0
- Abb. 67: Wellenlängenabhängiges CD-Spektrum beim Schmelzvorgang des 65 kDa Holophytochroms (oben) und 59 kDa Apoprotein in 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 8.0

-
- Abb. 68: Kristallisationstropfen von Phytochrom.
- Abb. 69: Schematischer Schmelzvorgang der D-HicDH.
- Abb. 70: Die D-HicDH-Struktur (1DXY) gefärbt nach Temperaturfaktoren in zwei Perspektiven.
- Abb. 71: Protein-Ligand-Bindungen am Beispiel von Phenylpyruvat und NAD^+ im aktiven Zentrum der kubischen D-HicDH Struktur
- Abb. 72: Umgebung des NAD-Ribose-Atoms O4* in der kubischen Struktur (links) und in der Untereinheit a des P6_3 -Zwillings (rechts).

Basensequenz des Plasmids pHL4 (Lerch, 1989)

Sequenziert von Andrea Eifert, Universität zu Köln, 28.10.1999

2810dhic.seq Length: 6826 October 29, 1999

Eigenschaften

- 980 - 267 produziert Lambda cI(ts857), hitzesensitiv
 1565 - 2564 produziert D-HicDH (reguliert durch lambda cI(ts857))
 5001 ColE1 ori aus pBR322 (ohne ROP), "high copy plasmid"
 6551 - 5753 bla aus pBR322, Ampicillin-Resistenz

Herkunft der Plasmidsegmente

- 1 - 6 SmaI Schnittstelle
 7 - 1147 j02459.phg: lamda 36967-38107: PL, cI, PMR
 1148 - 1205 x67656.pro1: E.coli oriC 356-413
 1205 - 1215 Linker: AvaI, XmaI, SmaI, BstYI
 1216 - 1464 j02459.phg: lamda 35715-35467: nutL
 1465 - 1505 Linker: ca. 18 Schnittstellen
 1506 - 3097 m26929.pro1: *L. casei dhd/ddh* 363-1948, korrigierte Sequenz!!!
 3098 - 6826 j01749.syn: pBR322 188-4359: EcoRV-EcoRI/ApoI
 3479 Deletion von 88 bp im Tc-Gen: zerstört Tetracyclin-Resistenz
 3479 - 3528 Insertion: Linker: 7 Schnittstellen
 3847 - 4079 Insertion: j02451.phg: fd 1657-1425: Terminator
 4534 Deletion von 637 bp: zerstört ROP

```

1   CCCGGGCGAT TTTATGAATA TACAAATAAT TGGAGCCAAC CTGCAGGTGA
51  TGATTATCAG CCAGCAGAGA ATTAAGGAAA ACAGACAGGT TTATTGAGCG
101 CTTATCTTTC CCTTTATTTT TGCTGCGGTA AGTCGCATAA AAACCATTCT
151 TCATAATTCA ATCCATTTAC TATGTTATGT TCTGAGGGGA GTGAAAATTC
201 CCCTAATTCG ATGAAGATTC TTGCTCAATT GTTATCAGCT ATGCGCCGAC
251 CAGAACACCT TGCCGATCAG CCAAACGTCT CTTCAGGCCA CTGACTAGCG
301 ATAACTTTCC CCACAACGGA ACAACTCTCA TTGCATGGGA TCATTGGGTA
351 CTGTGGGTTT AGTGGTTGTA AAAACACCTG ACCGCTATCC CTGATCAGTT
401 TCTTGAAGGT AACTCATCA CCCCCAAGTC TGGCTATGCA GAAATCACCT
451 GGCTCAACAG CCTGCTCAGG GTCAACGAGA ATTAACATTC CGTCAGGAAA
501 GCTTGGCTTG GAGCCTGTTG GTGCGGTCAT GGAATTACCT TCAACCTCAA
551 GCCAGAATGC AGAATCACTG GCTTTTTTGG TTGTGCTTAC CCATCTCTCC
601 GCATCACCTT TGGTAAAGGT TCTAAGCTTA GGTGAGAACA TCCCTGCCTG
651 AACATGAGAA AAAACAGGGT ACTCATACTC ACTTCTAAGT GACGGCTGCA

```

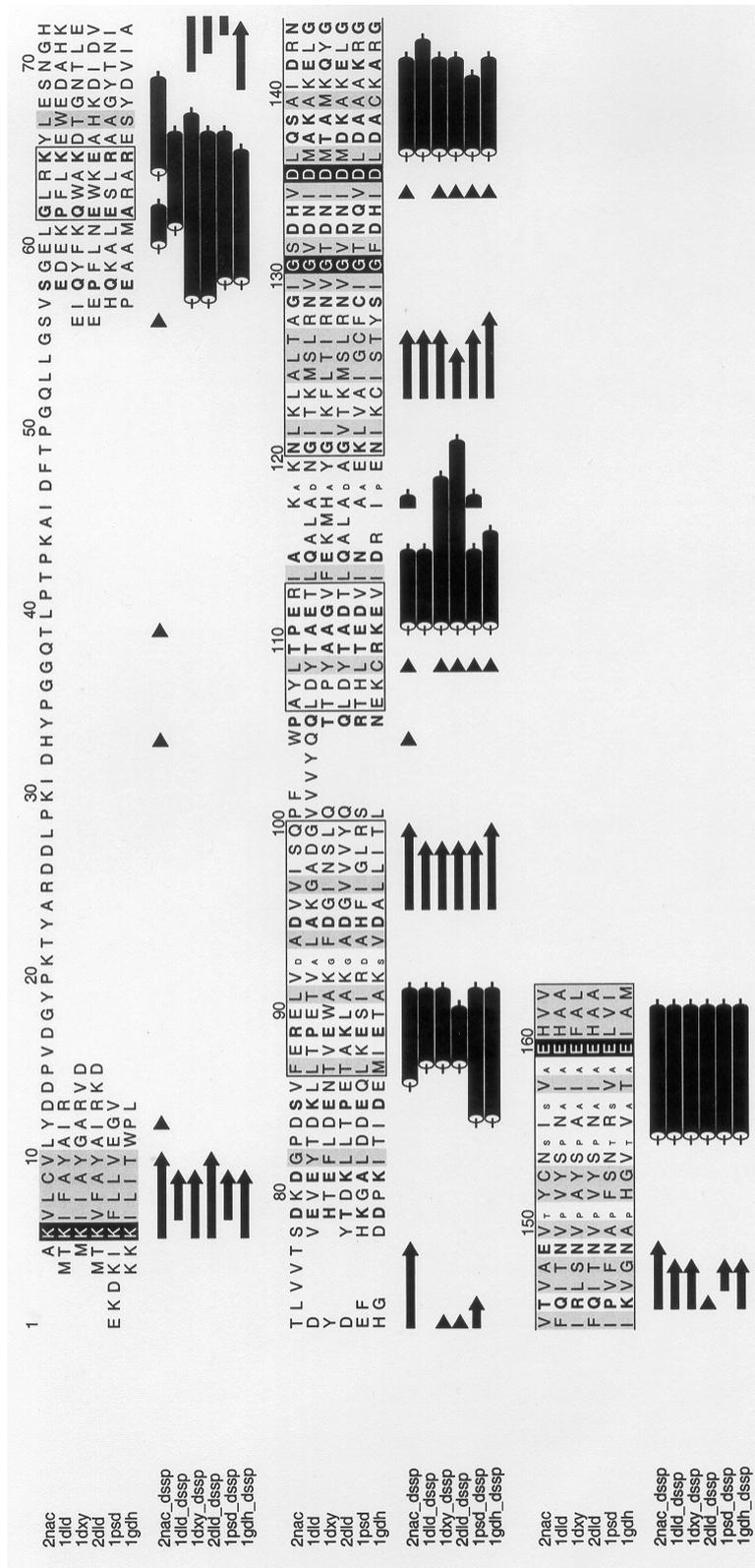
701 TACTAACCGC TTCATACATC TCGTAGATTT CTCTGGCGAT TGAAGGGCTA
751 AATTCTTCAA CGCTAACTTT GAGAATTTTT GTAAGCAATG CGGCGTTATA
801 AGCATTTAAT GCATTGATGC CATTAAATAA AGCACCAACG CCTGACTGCC
851 CCATCCCCAT CTTGTCTGCG ACAGATTCCT GGGATAAGCC AAGTTCATTT
901 TTCTTTTTTT CATAAATTGC TTTAAGGCGA CGTGCGTCCT CAAGCTGCTC
951 TTGTGTTAAT GGTTTCTTTT TTGTGCTCAT ACGTTAAATC TATCACCGCA
1001 AGGGATAAAT ATCTAACACC GTGCGTGTTG ACTATTTTAC CTCTGGCGGT
1051 GATAATGGTT GCATGTACTA AGGAGGTTGT ATGGAACAAC GCATAACCCT
1101 GAAAGATTAT GCAATGCGCT TTGGGCAAAC CAAGACAGCT AAAGATCAAG
1151 AATGTTGATC TTCAGTGTTT CGCCTGTCTG TTTTGCACCG GAATTTTTGA
1201 GTTCTGCCCC CCGGGGATCT CTCACCTACC AAACAATGCC CCCCTGCAAA
1251 AAATAAATTC ATATAAAAAA CATAACAGATA ACCATCTGCG GTGATAAATT
1301 ATCTCTGGCG GTGTTGACAT AAATACCACT GCGGGTGATA CTGAGCACAT
1351 CAGCAGGACG CACTGACCAC CATGAAGGTG ACGCTCTTAA AAATTAAGCC
1401 CTGAAGAAGG GCAGCATTCA AAGCAGAAGG CTTTGGGGTG TGTGATACGA
1451 AACGAAGCAT TGGCGCCTCG AGCCAAGAAC TCTCCATGGC ATATGGCATG
1501 CCTGCTTTTC ACAGAGGCAT CTTGTATACT GGTGAGTGGA CAAATTGGAA
1551 AGGAAGTTTA ACACATGAAG ATTATTGCTT ACGGTGCACG CGTTGACGAG
1601 ATTCAATATT TCAAGCAATG GGCCAAGGAT ACAGGCAACA CACTTGAATA
1651 CCATACAGAA TTTCTCGATG AAAACACCGT TGAATGGGCT AAAGGGTTTG
1701 ATGGCATCAA TTCATTGCAG ACAACGCCAT ATGCAGCCGG CGTTTTTGAA
1751 AAAATGCACG CGTATGGTAT CAAGTTCTTG ACGATTGCGA ATGTGGGTAC
1801 GGATAACATT GATATGACTG CCATGAAGCA ATACGGCATT CGTTTGAGCA
1851 ATGTACCGGC TTATTGCCA GCAGCGATTG CTGAATTTGC TTTGACCGAT
1901 ACTTTGTACT TGCTACGTAA TATGGGTAAA GTACAGGCGC AACTACAGGC
1951 GGGCGATTAT GAAAAAGCGG GCACCTTCAT CGGTAAGGAA CTCGGTCAGC
2001 AAACCGTTGG CGTGATGGGC ACCGGTCATA TTGGACAGGT TGCTATCAAA
2051 CTGTTCAAAG GCTTTGGCGC CAAAGTGATT GCTTACGATC CTTATCCAAT
2101 GAAGGGCGAT CACCCAGATT TTGACTATGT CAGCCTTGAA GACCTCTTTA
2151 AGCAAAGTGA TGTCATTGAT CTTCATGTTC CTGGGATTGA ACAAATACC
2201 CACATTATCA ATGAAGCGGC ATTTAATTTG ATGAAACCGG GTGCGATTGT
2251 GATCAACACG GCTCGGCCAA ATCTGATTGA CACGCAAGCC ATGCTCAGCA
2301 ATCTTAAGTC TGGCAAGTTG GCCGGTGTCTG GGATTGACAC CTATGAATAC
2351 GAAACCGAGG ACTTGTTGAA TCTCGCCAAG CACGGCAGCT TCAAGGATCC
2401 GTTGTGGGAT GAGCTGTTGG GGATGCCAAA TGTTGTCCTC AGCCCACACA
2451 TTGCCTACTA CACCGAGACG GCTGTGCATA ATATGGTTTA CTTCTACTA
2501 CAACATCTCG TTGATTTCTT GACCAAAGGC GAAACCAGCA CGGAAGTTAC
2551 TGGTCCAGCA AAGTAGTCAA CTGAATAGCA AAACGTGCCC TGCCTATTGA
2601 CGAATACGTT AATGGCAGAG CACGTTTTTT AATATTGGGA TTGCTTGCTT
2651 AAAAAATCGA ATTGCCACGA ATTGCCATGA TATAGACAAA CAAGGCAGCG
2701 CCATTGACGA ACAAGGAGAC GGCAATGATT GAAAAACGAA TGGTGTACGG
2751 TCTGGCGCCT ATGTCAGGAT CATAAAAGCG TGAACGGCGT TTGCCACGGT
2801 AAGAGAAGAA AAAGCCTACC AGAATAACGA CAATGATGCT CTCAACAATC

2851	GTGAGCAACC	AAAAAACCGG	TTGCGTTGTA	CTGGCAGTGA	CCAGAAAGTA
2901	CCCGCCAAGA	GCGATAAGAT	CGAGCAGGAT	CGAAATGAGA	ACCATCGTAA
2951	ATTCCCTCCTT	TAAAGTGAGC	GTGAGCCAGC	GCGGGTGGAA	CCGAAGTGTA
3001	AGTGGCCTTG	GGCGTGATGA	CCGTTCTTTG	GTCATTGCAA	CGAAGGTCCT
3051	TACACGCAGG	TTTCAGCGCT	GGCGAGCGCG	TTATGGCGAG	CGTATCGATC
3101	GTCCATTCCG	ACAGCATCGC	CAGTCACTAT	GGCGTGCTGC	TAGCGCTATA
3151	TGCGTTGATG	CAATTTCTAT	GCGCACCCGT	TCTCGGAGCA	CTGTCCGACC
3201	GCTTTGGCCG	CCGCCAGTC	CTGCTCGCTT	CGCTACTTGG	AGCCACTATC
3251	GACTACGCGA	TCATGGCGAC	CACACCCGTC	CTGTGGATCC	TCTACGCCGG
3301	ACGCATCGTG	GCCGGCATCA	CCGGCGCCAC	AGGTGCGGTT	GCTGGCGCCT
3351	ATATCGCCGA	CATCACCGAT	GGGGAAGATC	GGGCTCGCCA	CTTCGGGCTC
3401	ATGAGCGCTT	GTTTCGGCGT	GGGTATGGTG	GCAGGCCCCG	TGGCCGGGGG
3451	ACTGTTGGGC	GCCATCTCCT	TGCATGCACA	GGAACCGGAT	CCTAAGTAAG
3501	TAGAATTCTG	AGTAGGTAAG	TCAGACCCCG	ATGCCCTTGA	GAGCCTTCAA
3551	CCCAGTCAGC	TCCTTCCGGT	GGGCGCGGGG	CATGACTATC	GTCGCCGCAC
3601	TTATGACTGT	CTTCTTTATC	ATGCAACTCG	TAGGACAGGT	GCCGGCAGCG
3651	CTCTGGGTCA	TTTTCGGCGA	GGACCGCTTT	CGCTGGAGCG	CGACGATGAT
3701	CGGCCTGTCT	CTTGCGGTAT	TCGGAATCTT	GCACGCCCTC	GCTCAAGCCT
3751	TCGTCACTGG	TCCCGCCACC	AAACGTTTCG	GCGAGAAGCA	GGCCATTATC
3801	GCCGGCATGG	CGGCCGACGC	GCTGGGCTAC	GTCTTGCTGG	CGTTCGCTAA
3851	ACAACCTTCA	ACAGTTTCAG	CGGAGTGAGA	ATAGAAAGGA	ACAACATAAG
3901	GAATTGCGAA	TAATAATTTT	TTCACGTTGA	AAATCTCCAA	AAAAAAAGGC
3951	TCCAAAAGGA	GCCTTTAATT	GTATCGGTTT	ATCAGCTTGC	TTTCGAGGTG
4001	AATTTCTTAA	ACAGCTTGAT	ACCGATAGTT	GCGCCGACAA	TGACAACAAC
4051	CATCGCCAC	GCATAACCGA	TATATTCGGC	GACGCGAGGC	TGGATGGCCT
4101	TCCCCATTAT	GATTCTTCTC	GCTTCCGGCG	GCATCGGGAT	GCCCGCGTTG
4151	CAGGCCATGC	TGTCCAGGCA	GGTAGATGAC	GACCATCAGG	GACAGCTTCA
4201	AGGATCGCGT	CGCGGCTCTT	ACCAGCCTAA	CTTCGATCAT	TGGACCGCTG
4251	ATCGTCACGG	CGATTTATGC	CGCCTCGGCG	AGCACATGGA	ACGGGTTGGC
4301	ATGGATTGTA	GGCGCCGCC	TATACCTTGT	CTGCCTCCCC	GCGTTGCGTC
4351	GCGGTGCATG	GAGCCGGGCC	ACCTCGACCT	GAATGGAAGC	CGGCGGCACC
4401	TCGCTAACGG	ATTCACCACT	CCAAGAATTG	GAGCCAATCA	ATTCTTGCGG
4451	AGAACTGTGA	ATGCGCAAAC	CAACCCTTGG	CAGAACATAT	CCATCGCGTC
4501	CGCCATCTCC	AGCAGCCGCA	CGCGGCGCAT	CTCGGCTGCC	TCGCGCGTTT
4551	CGGTGATGAC	GGTGAAAACC	TCTGACACAT	GCAGCTCCCG	GAGACGGTCA
4601	CAGCTTGTCT	GTAAGCGGAT	GCCGGGAGCA	GACAAGCCCG	TCAGGGCGCG
4651	TCAGCGGGTG	TTGGCGGGTG	TCGGGGCGCA	GCCATGACCC	AGTCACGTAG
4701	CGATAGCGGA	GTGTATACTG	GCTTAACTAT	GCGGCATCAG	AGCAGATTGT
4751	ACTGAGAGTG	CACCAGCGGT	GTGAAATACC	GCACAGATGC	GTAAGGAGAA
4801	AATACCGCAT	CAGGCGCTCT	TCCGCTTCCT	CGCTCACTGA	CTCGCTGCGC
4851	TCGGTTCGTT	GGCTGCGGCG	AGCGGTATCA	GCTCACTCAA	AGGCGGTAAT
4901	ACGGTTATCC	ACAGAATCAG	GGGATAACGC	AGGAAAGAAC	ATGTGAGCAA
4951	AAGGCCAGCA	AAAGGCCAGG	AACCGTAAAA	AGGCCGCGTT	GCTGGCGTTT

5001 TTCCATAGGC TCCGCCCCC TGACGAGCAT CACAAAAATC GACGCTCAAG
5051 TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG GCGTTTCCCC
5101 CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCCTGTTC CGACCCTGCC GCTTACCGGA
5151 TACCTGTCCG CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCATAGCTC
5201 ACGCTGTAGG TATCTCAGTT CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT
5251 GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCGACC GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC
5301 TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC GACTTATCGC CACTGGCAGC
5351 AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC CGGTGCTACA
5401 GAGTTCTTGA AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACACTAGAA GGACAGTATT
5451 TGGTATCTGC GCTCTGCTGA AGCCAGTTAC CTTCCGAAAA AGAGTTGGTA
5501 GCTCTTGATC CGGCAAACAA ACCACCGCTG GTAGCGGTGG TTTTTTTTGT
5551 TGCAAGCAGC AGATTACGCG CAGAAAAAAA GGATCTCAAG AAGATCCTTT
5601 GATCTTTTCT ACGGGGTCTG ACGCTCAGTG GAACGAAAAC TCACGTTAAG
5651 GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA TCTTCACCTA GATCCTTTTA
5701 AATTAATAAT GAAGTTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG AGTAAACTTG
5751 GTCTGACAGT TACCAATGCT TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT
5801 GTCTATTTTCG TTCATCCATA GTTGCCTGAC TCCCCGTCGT GTAGATAACT
5851 ACGATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC AGTGCTGCAA TGATACCGCG
5901 AGACCACGC TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG
5951 GAAGGGCCGA GCGCAGAAGT GGTCCTGCAA CTTTATCCGC CTCCATCCAG
6001 TCTATTAATT GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCGC CAGTTAATAG
6051 TTTGCGCAAC GTTGTGCGCA TTGCTGCAGG CATCGTGGTG TCACGCTCGT
6101 CGTTTGGTAT GGCTTCATTC AGCTCCGGTT CCAACGATC AAGGCGAGTT
6151 ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAGCG GTTAGCTCCT TCGGTCCTCC
6201 GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGCAGT GTTATCACTC ATGGTTATGG
6251 CAGCACTGCA TAATTCTCTT ACTGTCATGC CATCCGTAAG ATGCTTTTCT
6301 GTGACTGGTG AGTACTCAAC CAAGTCATTC TGAGAATAGT GTATGCGGCG
6351 ACCGAGTTGC TCTTGCCCCG CGTCAACACG GGATAATACC GCGCCACATA
6401 GCAGAACTTT AAAAGTGCTC ATCATTGGAA AACGTTCTTC GGGGCGAAAA
6451 CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAATCC AGTTCGATGT AACCCTACTG
6501 TGCACCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTACCAGC GTTTCTGGGT
6551 GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGCGGACA
6601 CGGAAATGTT GAATACTCAT ACTCTTCCTT TTTCAATATT ATTGAAGCAT
6651 TTATCAGGGT TATTGTCTCA TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA
6701 AAAATAAACA AATAGGGGT CCGCGCACAT TTCCCCGAAA AGTGCCACCT
6751 GACGTCTAAG AAACCATTAT TATCATGACA TTAACCTATA AAAATAGGCG
6801 TATCACGAGG CCCTTTCGTC TTCAAG

Strukturvergleiche der D-HDH-Familie mit STAMP

Substrat-Domäne (AS 1-100)



220 230 240 250 260 270 280
 | | | | | | |
 phy SLPGGSMEVLCNTVVKEVFDLTGYDRVMAYKFHEDDHGEVVFSEITKPGLEPYLGLHYPATDIPQAARLLF
 DPM ccccccheeceehehcccccehshhhhhhtccccehchccccctccccccccccccchhhhhh
 DSC cccccccchhhhhhhhhhhccccchheeeccccccceehhhhhccccccccccccccccchhhhhhh
 GOR4 eccccceeeccccceeeccccceeeccccceeeccccccccccccccccccccchhhhhhh
 HNNC hccccceeeechhhhhheccccchheeeccccccccchhhhhccccccccccccccccchhhhhhh
 PHD hccccchhhhhhhhhhhhhccccceeeccccchhhhhhhhhccccceccccccccccccchhhhhhh
 Predator cccccceehhhhhhhhhccccccccceeeccccccccceeeccccccccccccccccchhhhhhh
 SIMPA96 ccccchhhhhhhhhhhhhccccceeeccccchhhhhhhccccceccccccccchhhhhhh
 SOPMA cccccchhhhhhhhhhhhhhttccheeecccccttthheehhccttccceeecccccccthhhhee
 MLRC cccccchhhhhhhhhhhhhccccceeeccccchhhhhhhccccceeeccccccccchhhhhhh
 Sec.Cons. cccccche?hhhhhhhh??ccccceeeccccccccchhhhhccccccccccccccccchhhhhhh

290 300 310 320 330 340 350
 | | | | | | |
 phy MKNKVRMICDCRARSIKVIEAEALPFDISLCGSALRAPHSCHLQYMNENMNSIASLVMVAVVNENEEDDEA
 DPM hhhhehhehchhhhcehshhhhhccccccccchhhhhccccchhhhhchcchheeeeeeehchhhhhh
 DSC hhccccceccccchhhhhhhccccccccccccccccccccchhhhhchchhhhhheeecccccccc
 GOR4 hhceeeccccccccchhhhhhhccccccccccccccccccccceeeechhhhhhhheeecccccccc
 HNNC hhhhhhhhhhhhhhhhhhhccccceeeccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhheeecccccccc
 PHD hhccccceccccceeeccccccccceeeccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhheeecccccccc
 Predator hhhceeeccccccccceeeccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhheeecccccccc
 SIMPA96 hcccchhhhhccccceeeccccccccceeeccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhheeeccccchhh
 SOPMA httteeeecttccceeeccccccccceeeccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhheeeecttcccccc
 MLRC hhccccceccccceeeccccccccceeeccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhheeecccccccc
 Sec.Cons. hhceeee?ccccce?e?h??cccc??cccccccc?hhhhhhhhhhhhhh?eeeecccccccc

360 370 380 390 400 410 420
 | | | | | | |
 phy ESEQPAQQKKKLLWGLLVCHHESPRYVFFPLRYACEFLAQVFAVHVNREFELEKQLREKNIILKMOTMLS
 DPM hhhchhhhhchhhcheccccccccccccccccchhhhhhhhehheehhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhc
 DSC cccccchhhhhcceeccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
 GOR4 hhhhhhhhhhhcceeccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
 HNNC ccccchhhhhcceeccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
 PHD cccccccccccccceeeccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
 Predator ccchhhhhhhhhhhheeeccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
 SIMPA96 hhhhhhhhhhhhhhhheeeccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
 SOPMA cccccccchhhheeeccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
 MLRC chhhhhhhhhhhheeeccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
 Sec.Cons. ccc?chhhhhhhheeecccccccccccc?hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh

430 440 450 460 470 480 490
 | | | | | | |
 phy DMLFREASPLTIVSGTPNIMDLVKCDGAALLYGKQVWRLRNAPTESQIHDIAFWLSDVHRDSTGLSTDSL
 DPM chhhhhccccceccccccccchhccccchhhccccchhhccccccccccccchhhhhcccccccccccc
 DSC hhhhhccccccccccccchhhhhccccchhhhhccccccccccccchhhhhhhhhhhcccccccccccc
 GOR4 hhhhhccccceeeccccceeeccccceeeccccceeeccccccccccccchhhhhheeecccccccccccc
 HNNC hhhhhccccceeeccccchhhhhhhccccceeeccccceeeccccccccchhhhhheehhhhhcccccccccccc
 PHD hhhhhccccceeeccccchhhhhhhccccchhhhhccccceeeccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh
 Predator hhhhhccccceeeccccceeecccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
 SIMPA96 hhhccccceeeccccchhhhhhhccccceeeccccceeeccccccccchhhhhhhhhhhccccccccccccchhh
 SOPMA hhhhttccccceccccchheehhtttceeeetccceeeccccccccchhhhhhhhhhhhtccccccccchhh
 MLRC hhhccccceeeccccchhhheccccceeeccccceeeccccccccchhhhhhhhhhhhhccccccccccccch
 Sec.Cons. hhhhhccccceccccchhh?hccccceee?cccccecccccccc?hhhhhhhhhhcccccccccccc

	780	790	800	810	820	830	840
phy	FGWCSEWNAAMTKLTGWNRDEVLDKMLLGEVFDSSNASCP LKNRDAFVSLCVLINSALAGEETEKAPFGF						
DPM	ccccchhhhhhhcccccccchhhhhhhcchcccctccccctthhhheeeeeecchhhchhhhhcccc						
DSC	ccccchhhhhhhhhccccccccchhhhhccccccccceccccccccceeeeecccccccccccccccc						
GOR4	ccceeeeeeccccchhhhhhhhhccecccccccccccccceehhhhhhhhhchhhhhcccccccc						
HNNC	cccchhhhhhhhhccccchhhhhhhhehhhhccccccccccccchhhhhhhhhhhcccccccccccccccc						
PHD	ccccchhhhhhhhhccccchhhhhhhheeeccccccccceccccchhhheeeeecccccccccccccccc						
Predator	ccccchhhhhhhhhccccchhhhhhhhhhhccccccccccccccccchhhhhhhchhhhhhhcccccccc						
SIMP96	cchhhhhhhhhhhccccchhhhhhhhhhhccccccccccccccccceeeehhhhhcccccccccccccc						
SOPMA	ccchhhhhhhhhhhhttcchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhccctthhhheeeeeehhhccccccccceee						
MLRC	ccchhhhhhhhhhhccccchhhhhhhhhhhccccccccccccccccceeeehhhccccccccccccceee						
Sec. Cons.	ccccchhhhhhhhhccccchhhhhhhhhhh?ccccccccccccchhhheeeeeeh?cccccccccccccc						

	850	860	870	880	890	900	910
phy	FDRSGKYEI ELLSANRKENEGGLITGVFCFIHVASHELQHALQVQOASEQTSIKRLKAFSYMRAHAINNPL						
DPM	cctccccehhhhhhthcctccccceceeeeeehhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh						
DSC	ccccchhhhhhhhhhhccccccccccccceccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh						
GOR4	ccccceeeeeccccccccccccceeeeeccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh						
HNNC	cchhhhhhhhhhhccccccccccccceeeeeccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh						
PHD	cccchhhhhhhhhhhhhccccccccccccceccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh						
Predator	ccccccchhhhhhhhhccccccccccccceeeeeehhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh						
SIMP96	ccccchhhhhhhhhccccccccccccceeeehhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh						
SOPMA	ectttchhhhhhhhhcccccttceeeeeccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh						
MLRC	eccchhhhhhhhhhhccccccccccccceehhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh						
Sec. Cons.	ccccchhhhhhhhh?cccccc?ee?eeeeee?hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh						

	920	930	940	950	960	970	980
phy	SGMLYSRKALKNTDLNEEQMKQIHVGDNCHHQINKILADLDQDSITEKSSCLDLEMAEFLLDQDVVVAVS						
DPM	ccccchhhhhhtcchchhhhhhhccccccccccccchhhhhhhccccchtcchhhhhhhhhhhheehhee						
DSC	cchhhhhhhhhhhcchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh						
GOR4	hhhhhhhhhhhhcchhhhhhhhhheeeccccchhhhhhhhhccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhh						
HNNC	chhhhhhhhhccccchhhhhhhheccccchhhhhhhhhhhccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhh						
PHD	ccchhhhhhhccccchhhhhhhcchhhhhhhhhhhccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh						
Predator	cccchhhhhccccccccchhhhhhhccccccccchhhhhhhhhhhccccccccccccchhhhhhhhhhhhh						
SIMP96	cchhhhhhhccccccccchhhhhhhheccccchhhhhhhhhhhccccchhhhhcchhhhhhhhhhhhhhh						
SOPMA	cheehhhhhhhhhccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh						
MLRC	cchhhhhhhhhccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh						
Sec. Cons.	cchhhhhhhhh?ccccchhhhhhh?cccc?hhhhhhhhhh?ccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhh						

	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050
phy	QVLITCQGGKIRISCNLPERFMKQSVYGDGVR LQOILSDFLFISVKFSPVGGSV EISSKLTKN SIGENLH						
DPM	eeeeccctccccccccchhhhhhhcctccchhhhecccccccccccccccccccccccccccccccc						
DSC	hhhhhhccccchhhhhhhccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhheeecccccccccccccccccccc						
GOR4	hhhhhhccccccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhheeeccccccccccccccccccccchhh						
HNNC	hhhhheccccccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhheeeccccccccccccccccccccchhh						
PHD	hhhhhhccccccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhh						
Predator	hhhhccccccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhheeecccccccccccccccc						
SIMP96	heeeccccccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhheeecccccccccccccccc						
SOPMA	hhhhctttceeeehccccchhhhhhhettcchhhhhhhhhhhheeecccttceeeeeccccchhhccchh						
MLRC	hhhhhhccccccccccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhecccccccccccccccc						
Sec. Cons.	hhhhhccccccccccccccccchhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhheeeccccccccccccccccccccch						

Kurzzusammenfassung

Zur Untersuchung der Substratspezifität und Thermostabilität der D-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase (**D-HicDH**) aus *Lactobacillus casei* wurden Mutanten hergestellt und analysiert. Thermostabilere Aminosäureaustausche wurden mit einem Programm von Leven (1999) vorhergesagt. Davon waren drei Mutanten (D112I, D202I, D202F) thermostabiler als der Wildtyp. Aminosäureaustausche im aktiven Zentrum setzten in fast allen Fällen die enzymatische Aktivität mit verschiedenen Substraten herab. Der Austausch von L51F führte zu einer Substratspezifitätsänderung. Analog zu den D-Lactat-Dehydrogenasen wurde nun Pyruvat bevorzugt umgesetzt.

Zwei verschiedene Kristallformen des D-HicDH-Wildtyps wurden röntgendiffraktometrisch untersucht. Ein Kristall gehörte zur kubischen Raumgruppe $P4_32$ mit den Zellkonstanten $a = b = c = 149.33 \text{ \AA}$ (R: 21.7 %, R_{frei} : 24.3 %). Die Struktur enthielt im aktiven Zentrum Phenylpyruvat und NAD^+ bei 2.0 \AA Auflösung. Der zweite Kristall war ein perfekter Zwilling in der hexagonalen Raumgruppe $P6_3$, mit den Zellkonstanten $a = b = 131.33 \text{ \AA}$ und $c = 125.55 \text{ \AA}$ und einer Auflösung von 1.87 \AA (R: 20.4 %, R_{frei} : 25.5 %). Sein aktives Zentrum enthielt einerseits NAD^+ , andererseits 2-Ketocaproat oder alternativ Sulfat, wobei das Besetzungsverhältnis 0.75 : 0.25 vorlag. Alle D-HicDH-Strukturen sind sich sehr ähnlich. Es konnte keine Domänenbewegung für den katalytischen Mechanismus festgestellt werden.

Die Aufreinigung eines 59 kDa und eines 65 kDa N-terminalen **Phytochrom A**-Fragments aus Hafer wurde durch Anionenaustauschchromatographie verbessert. Bei beiden Fragmenten wurde ein A_{654}/A_{280} -Verhältnis von 1.6 erreicht, was für sehr saubere Proteinlösungen spricht und zusätzlich bedeutet, dass die N-terminalen 6 kDa für die volle spektroskopische Funktion des Phytochroms offensichtlich nicht notwendig sind. Beide Phytochromfragmente liegen in Lösung als Dimere vor, in konzentrierter Form aggregierte das 65 kDa Phytochrom. Sekundärstrukturvorhersagen und -analysen von beiden Apophytochromen mit Circular-Dichroismus ergaben Sekundärstrukturanteile von ca. 40 % α -Helix und 10 % β -Faltblatt. Der Helixanteil war im 65 kDa Phytochrom leicht höher. Mikrokristalle wurden von beiden Phytochromfragmenten erhalten.

Abstract

The substrate specificity and thermostability of D-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase (**D-HicDH**) from *Lactobacillus casei* was investigated by modelling and analysing different mutants. Thermostable mutations have been predicted by a program of Leven (1999). Experiments showed an increased thermostability of three mutants (D112I, D202I, D202F) in comparison to the wildtype. The substitution of amino acids in the active site of the enzyme led to a decrease of enzymatic activity using different substrates. The mutant L51F led to a change in substrate specificity. Like the D-lactate dehydrogenases pyruvate was now the preferred substrate.

Two X-ray diffraction datasets of D-HicDH wildtype crystals have been collected. One crystal belonged to the cubic space group $P4_32$ with cell parameters $a = b = c = 149.33 \text{ \AA}$ and diffracted to 2.0 \AA resolution (R_{work} : 21.7 %, R_{free} : 24.3 %). NAD^+ and Phenylpyruvate were bound to the active site. The second crystal belonged to the hexagonal space group $P6_3$ with the cell parameters $a = b = 131.33 \text{ \AA}$ and $c = 125.55 \text{ \AA}$. And was a perfect twin (R_{work} : 20.4 %, R_{free} : 25.5 %). NAD^+ and 2-Ketocaproate or sulfate (0.75:0.25) were bound to the active site and diffracted up to 1.87 \AA resolution. All D-HicDH structures have been proven as very similar. No domain movement could be detected for the catalytical mechanism.

Purification of 59 kDa and 65 kDa N-terminal **Phytochrome A** fragments have been improved by anion exchange chromatographie. Using this method both fragments reached in an A_{654}/A_{280} -ratio of 1.6. As a further result it has been proven that the N-terminal 6 kDa domain is not necessary for full spectroscopic function. Both fragments of phytochrome A form dimers in solution. At higher concentrations 65 kDa phytochrome A tends to aggregate. Analysis of the secondary structure of both apophytochromes have been calculated to 40 % α -helices and 10 % β -sheet by circular dichroism and predictions of several programs. The helical amount has been higher in the 65 kDa Phytochrome. Microcrystals have been received from both fragments.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Andrea Eifert
Geburtsdatum	20.5.1971
Geburtsort	Köln
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1977-1978	Grundschule Pulheim-Brauweiler
1978-1981	Deutsche Schule Brüssel
1981-1990	Gymnasium der Stadt Frechen
Juni 1990	Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Hochschulbildung

WS 1990/91 - SS 1996	Studium der Diplom-Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Juli 1993	Vordiplom
Jan. - Juli 1996	Diplomarbeit bei Prof. Dr. H. Weiss mit dem Thema: <i>Anpassung der Fettsäurezusammensetzung der Mitochondrien- membranen von mutierten Neurospora Stämmen an veränderte Wachstumsbedingungen.</i> Institut für Biochemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berufliche Tätigkeiten

Nov. 1996 - Feb. 1997	Wissenschaftliche Hilfskraft bei INSTAND e.V. <i>Institut für Standardisierung und Dokumentation im medizinischen Laboratorium, Düsseldorf</i>
ab April 1997	Doktorarbeit bei Prof. Dr. D. Schomburg, Institut für Biochemie, Universität zu Köln