

**Charakterisierung der thermal induzierten Denaturierung der
L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase aus *Lactobacillus confusus*
und
Rationales Protein-Design zur Erhöhung ihrer
Stabilität**

**Inaugural – Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln**

**durchgeführt am Institut für Biochemie
Lehrstuhl: Prof. Dr. D. Schomburg**

Vorgelegt von

**Bao Lide
aus der inneren Mongolei**

Köln 2006

Berichtersteller:

Prof. Dr. Dietmar Schomburg

Prof. Dr. Helmut W. Klein

Tag der mündlichen Prüfung:

13. 06. 2006

Danksagung

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg für das interessante und herausfordernde Thema sowie die gute Rahmenbedingungen am Institut für Biochemie,

Herrn Prof. Dr. Helmut W. Klein für die Übernahme des Zweitgutachtens,

Frau Dr. Shivani Chatterjee für die Einführung der Molekularbiologie und für Ihre richtungweisende Begleitung, und Ihre Geduld,

Sabine Lohmer für die wertvolle technische Unterstützung und für ihre Hilfsbereitschaft,

Michael Zimmermann für die Unterstützung bei der Lösung zahlreicher Computerprobleme,

Jana Börner, Jeniffer Raaf, Suma Choorapoikayil, Bernhard Thielen, Andreas Odenbach, Christian Brück, Jan Schoepe, Dr. Sebastian Buchinger, und allen, die Zeit für die Korrektur meiner Arbeit gefunden haben, und bei der gesamten Arbeitsgruppe für die freundliche Atmosphäre.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	V
Abstract	IX
Kurzzusammenfassung	X
1. EINLEITUNG	1
1.1 Thermostabilität von Proteinen	3
1.2 Vorhersage der Thermostabilität	4
1.3 Methode zur Stabilisierung von Proteinen	6
1.4 Stabilisierungsfaktoren	7
1.5 L-2-Hydroxyisocaproat Dehydrogenase	8
1.6 Strukturmerkmale der L-HicDH	10
1.7 Der Reaktionsmechanismus der L-HicDH	11
1.8 Die biologische Bedeutung der L-HicDH	12
1.9 Anwendung der L-HicDH	13
1.10 Proteinfaltung und Stabilität vermittelnde Kräfte	14
1.11 Genom-basierte Studien über Protein Thermostabilität	15
1.12 Die Protein-Entfaltung	16
1.13 Two-state reversible Entfaltung: Thermodynamik der konformationalen Änderung von Proteinen	18
1.14 Thermostabilität und kinetische Stabilität	19
1.14.1 Bestimmung und Definition der Proteinstabilität	19
1.14.2 Kinetische Stabilität	20
1.15 Grundlagen und Begriffe	23
1.15.1 Theoretische Grundlagen der Mikrokalorimetrie	23
1.15.2 Begriffsdefinitionen	25
1.16 AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	29
2. MATERIAL UND METHODEN	30
2.1 Materialien	30
2.1.1 Geräte	30
2.1.2 Chemikalien	31
2.1.3 Verwendete Puffer	31
2.1.4 Bakterien, Plasmide und Medien	32
2.1.5 Verwendete Oligonukleotiden	34
2.1.6 Kits	36
2.2. Methoden	37
2.2.1 Konstruktion des Vektors und Anpassung des Gens	37
2.2.2 Plasmidpräparation	39
2.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration	40
2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	40

2.2.5 Herstellung kompeteter Zellen	40
2.2.6 Hitzeschock-Transformation	41
2.2.7 Gerichtete Mutagenese	41
2.2.8 Glycerin-Dauerkulturen	42
2.2.9 Sequenzierung von DNA	42
2.2.10 Expressionsplasmid	43
2.2.11 T7-Expressionssystem	43
2.2.12 Protein-Expression.....	44
2.2.13 Zellaufschluss	45
2.2.14 Proteinreinigung durch Metallchelate-Affinitätschromatographie.....	45
2.2.15 Aktivitätsbestimmung der L-HicDH und ihrer Varianten	46
2.2.16 Proteinkonzentrationsbestimmung	47
2.2.17 SDS-PAGE	48
2.2.18 Konzentrierung und Umpufferung von Proteinen	49
2.2.19 Enzym-Assay	49
2.2.20 Kalorimetrische Messungen	51
2.2.21 Schmelzpunktbestimmung mit <i>Circular-Dichroismus</i> (CD).....	60
3. ERGEBNISSE.....	61
3.1 Konstruktion von Plasmiden zur Expression des L-HicDH –Wildtyp Proteins und von L-HicDH-Varianten	61
3.1.1 Konstruktion des Vektors pET-SmaI.....	61
3.1.2 Insertion des L-HicDH-Gens in das Plasmid pET-SmaI.....	62
3.1.3 Insertion der L-HicDH-Varianten in den Vektor pC-His	63
3.2 Expression der L-HicDH und ihrer Varianten	64
3.2.1 Theoretisch ermittelte Protein-Parameter des L-HicDH-Wildtyp-Proteins	64
3.2.2 Mutationsplanung und Herstellung der L-HicDH Varianten	65
3.2.3 SDS-PAGE für Wild-Typ L-HicDH und ihrer Mutanten.....	69
3.3 Enzymaktivität der L-HicDH und ihrer Varianten	69
3.3.1 Enzymaktivität der L-HicDH in Abhängigkeit von pH-Wert	69
3.3.2 Enzymaktivität der L-HicDH in Abhängigkeit von der Temperatur.....	70
3.3.3 Enzymaktivität (spezifische Aktivität in U/mg) der Wild-Typ L-HicDH und ihrer Varianten in Abhängigkeit vom pH-Wert	72
3.4 Enzym-Assay für L-HicDH und ihrer Mutanten	73
3.5 Thermostabilität der L-HicDH bei der Anwesenheit von NADH	75
3.6 Thermale Entfaltung der L-HicDH und ihrer Mutanten	77
3.6.1. Thermostabilitätsparameter der L-HicDH und ihrer Mutanten	77
3.6.2 pH-Abhängigkeit	81
3.6.3. Reproduzierbarkeit der DSC-Messung.....	82
3.7 CD-Messungen der L-HicDH und ihrer Mutanten zwecks T _m -Bestimmung	84
3.8 Charakterisierung der Denaturierung der Wild-Typ L-HicDH und ihrer Mutanten.....	89
3.8.1 Abhängigkeit der Übergangstemperatur von der <i>Scan-Rate</i>	89
3.8.2 Irreversibilität	91
3.8.3. Extreme Kooperativität.....	92
3.8.4 Aktivierungsenergie der Entfaltung der Wild-Typ L-HicDH	93

3.8.5 Aktivierungsenergie der Entfaltung der Mutanten der L-HicDH.....	97
3.8.6 Stabilitätsberechnung mit CUPSAT	100
4. DISKUSSION	104
4.1 Konstruktion des Vektors und Anpassung des Gens	104
4.2 Konstruktion des Expressionsvektors für L-HicDH mit His-Tag.....	104
4.3 Expression und Reinigung der L-HicDH und ihrer Mutanten	105
4.4 Enzymaktivität	105
4.4.1 Spezifische Enzymaktivität der L-HicDH Wild-Typ und deren Mutanten in Abhängigkeit vom pH-Wert	105
4.4.2 Auswirkung der Temperatur auf die Enzymaktivität der L-HicDH Wild-Typ und ihre Thermostabilität.....	107
4.4.3 Effekt von Mutationen auf die kinetischen Parameter	107
4.5 Der Effekt der Anwesenheit des Liganden (NADH) auf die Thermostabilität der L- HicDH	109
4.6 Thermale Entfaltung der L-HicDH und ihrer Mutanten	109
4.7. CD-Messungen.....	111
4.8 Charakterisierung der Denaturierung der Wild-Typ L-HicDH.....	111
4.9 Vergleich der Stabilität der Wild-Typ L-HicDH und ihrer Mutanten	118
4.9.1 Vergleich der Mutanten mit den Statistischen Daten aus <i>ProTherm</i>	118
4.9.2 Typische Aktivierungsenergie für die Proteinfaltung.....	120
4.9.3 Strategie zur Stabilisierung von Proteinen	121
4.9.4 Vorhersageprogramme für die Stabilität von Proteinen	121
5. ZUSAMMENFASSUNG	123
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	126
ANHANG.....	138
A. 1. Plasmidkarte : pET-3d von Novagen	138
A. 2. Plasmidkarte: pET-sma	139
A. 3. Plasmid pHL6.....	140
A. 4. Plasmid pET-LhicDH (C-His-Tag).....	141
A. 5. Mess-Daten der Enzymaktivität.....	142
A. 6. Mess-Daten der Enzymkinetik.....	144
A. 7. DCS-Daten für die Ermittlung der Aktivierungsenergie	149
A. 8. Theoretische Grundlagen	154
1. Irreversible Denaturierung.....	154
2. Arrhenius Gleichung.....	155
3. Ermittlung von Aktivierungsenergie E_a : Mathematische Ausarbeitung des kinetischen Modells für die Denaturierung von L-HicDH	157
4. Effekt der Ligand-Bindung auf die Faltungsthermodynamik.....	162
A. 9. Abbildungsverzeichnis.....	166
A. 10. Tabellenverzeichnis.....	168
A. 11. Vorabveröffentlichungen	169
A. 12. Erklärung.....	170
A. 13. Lebenslauf.....	171

Abkürzungsverzeichnis

3-Buchstaben und 1-Buchstabencode der Aminosäuren

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

Abkürzungsverzeichnis

Sonstige Abkürzungen

ΔC_p	Änderung der Wärmekapazität
ΔG	freie Enthalpie
ΔG^0	freie Enthalpie unter Standardbedingungen
ΔH	Enthalpie
ΔS	Entropie
Å	Ångström (1 Å = 0.1 nm)
AAP	Aminosäure-Atom-Potential
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
C	Celsius
CD	Circulardichroismus
D	denaturiertes Enzym
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSC	Differential Scanning Calorimetrie
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Darmbakterium Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
h	Stunde
I	Intermediat
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
K	Kelvin

Abkürzungsverzeichnis

K_b	Bindungskonstante
Kcat	Katalysekonstante
KDa	Kilodalton
Km	Michaelis-Menten-Konstante
l	liter
LB	Luria broth
L-HicDH	L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
Mol	Einheit der Stoffmenge
MW	Molekulargewicht
N	natives Enzym
NAD ⁺	Nicotin-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotin-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
nm	Nanometer
OD ₅₀₀	optische Dichte bei 500 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDB	Protein Data Bank
pH	pondus hydrogenii
pI	isoelektrischer Punkt
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	absolute Temperatur
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TWP	Torsionswinkel-Potential

Abkürzungsverzeichnis

U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UV	ultraviolett
ÜZ	Übergangszustand
WT	Wildtyp
λ	Wellenlänge

Abstract

The stability of the L-HicDH and their mutants was examined by differential Scanning calorimetry. With the help of thermal induced denaturation of the protein the stability of the L-HicDH was characterized thermodynamically and kinetically. L-HicDH shows highest stability at pH 6.0, which is close to its theoretical pI = 5.06. Thermal induced denaturation of the L-HicDH is scan rate dependent and an irreversible process. The whole L-HicDH could unfold as a single cooperative unit and intersubunit interactions of this homotetrameric enzyme must play a significant role in the stabilization of the whole enzyme. The activation energy of thermal induced denaturing of the L-HicDH amounts to 525-538 kJ mol⁻¹. This value is relative high compared with the literature values of the activation energy of proteins and implies the L-HicDH is kinetically very stable.

The rational protein design for the increase of the stability of the l-HicDH was achieved by the mutants Gly251Ala, Glu270Met, and Gly24Ala. All three mutants after the exchange of the amino acids show very good values of amino acid atomic and angle of twist potentials. The predictability of the program for the computation of amino acid atomic and angle of twist potentials is thereby satisfying. From the results of this work the following conclusion concerning protein stabilization can be drawn: (1) oligomerisation is an important strategy to stabilize the protein. Hydrophobic interactions within the contact between the subunits increase the stability of the protein. (2) The stability of the protein can be increased by certain surface charge distributions. (3) The new developed computer program, CUPSAT, which compute the energetics of the protein molecules for the rational protein design, proved as a very helpful tool.

Kurzzusammenfassung

Die Stabilität der L-HicDH und ihrer Mutanten wurde durch differentielle *Scanning*-Kalorimetrie untersucht. Mit Hilfe der thermal induzierten Denaturierung des Proteins wurde die Stabilität der L-HicDH thermodynamisch und kinetisch charakterisiert.

L-HicDH verhält sich am stabilsten bei dem pH-Wert von 6,0, der sich nah an seinem theoretischen $pI = 5,06$ befindet. Die thermal induzierte Denaturierung der L-HicDH ist ein irreversibler Prozess und abhängig von der Scanrate.

Die Wärmekapazitätsfunktion der L-HicDH zeigt einen einzelnen Peak und die ganze L-HicDH entfaltet sich sehr kooperativ. Das Verhältnis $\Delta H/\Delta H_v$ in allen Mutanten zeigen eine extreme Kooperativität. Diese extreme Kooperativität ergibt sich aus dem gleichzeitigen Zerfallen aller strukturellen Elemente und der außergewöhnlichen Entfaltung dieses großen Proteins. Dies wiederum reflektiert die Stabilisierungsrolle der Oligomerisierung in diesem homotetrameren Enzym.

Die Aktivierungsenergie der thermal induzierten Denaturierung der L-HicDH beträgt 525-538 kJ mol^{-1} . Im Vergleich zu Literaturwerten ist dieser Wert relativ hoch. Die L-HicDH ist daher kinetisch betrachtet ein sehr stabiles Protein.

Das rationale Protein-Design zur Erhöhung der Stabilität der L-HicDH wurde durch die Mutanten Gly251Ala, Glu270Met, und Gly244Ala erzielt. Alle drei Mutanten besaßen nach dem Austausch der Aminosäuren sehr gute Werte der Aminosäure-Atom- und Torsionswinkel-Potentiale. Die Zuverlässigkeit des Vorhersageprogramms zur Berechnung von Aminosäure-Atom- und Torsionswinkel-Potentialen ist damit zufriedenstellend.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann man folgende Schlussfolgerung für die Proteinstabilisierung ziehen: (1) Oligomerisierung ist eine wichtige Strategie, Proteine, zu stabilisieren. Durch die Erhöhung der hydrophoben Interaktionen in den Kontaktbereichen zwischen den Untereinheiten kann die Stabilität des Proteins gesteigert werden. (2) Bestimmte Oberflächen-Ladungsverteilungen können die Stabilität von Proteinen erhöhen. (3) Das weiterentwickelte Computerprogramm CUPSAT, das die Energetik der Proteinmoleküle für das rationale Protein-Design berechnet, hat sich als ein sehr hilfreiches Werkzeug erwiesen.

1. EINLEITUNG

Um zu überleben, müssen Organismen in der Lage sein, sich ihrer natürlichen Umgebung anzupassen. Manche Organismen leben bei einer extrem hohen Temperatur. Dies wirft die Frage auf, wie diese Organismen die hohen Temperaturen nicht nur tolerieren, sondern auch zu ihrem Vorteil ausnutzen können. Das Verständnis über die hohe Temperaturresistenz von thermophilen und hyperthermophilen Proteinen ist essentiell für Studien von Protein-Faltungen und –Stabilität, und ist kritisch für das Design der effizienten Enzyme, die bei hohen Temperaturen wirken können.

In den letzten Jahren sind die Mechanismen, die die enorme Stabilität von Proteinen aus hyperthermophilen Organismen bestimmen, intensiv erforscht worden. Bis heute resultieren die meisten Daten zu diesem Thema aus Vergleichen der dreidimensionalen Struktur von thermostabilen Proteinen mit ihren mesophilen Kontrahenten. Diese Vergleiche demonstrieren, dass die Thermostabilität eines Proteins eine Eigenschaft ist, die nur wenige strukturelle Änderungen benötigt, die zur Optimierung stabilisierender hydrophober und /oder hydrophiler Interaktionen führt (Spassov *et al.*, 1995; Jaenicke and Bohm, 1998).

Unter nativen Bedingungen liegen Proteine in der Regel in einer gefalteten dreidimensionalen Struktur vor, die ein energetisches Minimum aufweist. Die Faltung einer Aminosäuresequenz zu einer dreidimensionalen Struktur und die dabei entstehende Energieminimierung und biologische Funktion, sowie deren Zusammenhänge sind heute vielfältig erforscht. Dabei wurden einige Struktur- und Stabilitätsvorhersage-Methoden entwickelt, in denen man versucht, aus der Sequenz die Struktur oder aus der Struktur die Stabilität vorherzusagen. Die gezielte Mutagenese von Proteinen ermöglicht, dass die Proteinfaltung, Stabilität und die Kräfte, die die Faltung und Stabilität bestimmen, untersucht werden können.

Unter Proteinstabilität kann man verstehen:

- Stabilität von Protein, die durch die Halbwertszeit in der Zelle (regulierter und kinetisch kontrollierter Prozess) definiert wird;

1. EINLEITUNG

- proteolytische Stabilität *in vivo* oder *in vitro* ;
- Lagerzeit ohne Verlust der biologischen Aktivität;
- Konformationale Stabilität (Thermodynamik): Schmelzpunkt oder Mittelpunkt der Übergangstemperatur (T_m) und kalorimetrische Enthalpie-Änderung ΔH sind die thermodynamischen Parameter für die konformationale Stabilität.

Unter physiologischen Bedingungen beträgt der Durchschnittswert der konformationalen Stabilität eines Proteins $\sim 20\text{-}50$ KJ/mol. Die Gründe für diese niedrige Stabilität sind:

1. die biologische Aktivität benötigt einen bestimmten Grad an konformationaler Flexibilität;
2. Protein muss abgebaut werden können (besonders wichtig für regulatorische Proteine).

Die Konformationale Stabilität von Proteinen hängt von den experimentellen Bedingungen ab und kann durch Lösungsmittel induzierten Faltungs-/Entfaltungsübergang, thermal induzierte Entfaltung und Kalorimetrie bestimmt werden.

Ein zentrales Thema in der biotechnologischen Forschung ist die Stabilisierung von Protein, in der die biologische Aktivität des Proteins besser erhalten wird. Insbesondere bei Enzymen hat die Erhöhung der Thermostabilität große Bedeutung. Bei erhöhter Temperatur können die Enzym-katalysierten Reaktionen schneller ablaufen, außerdem steigt die Löslichkeit von Substraten und Produkten bei erhöhter Temperatur an, und dies führt zur Kostenersparnis in der industriellen Anwendung von Enzymen.

ProTherm ist eine thermodynamische Datenbank für Proteine und Mutanten. (<http://gibk26.bse.kyutech.ac.jp/jouhou/Protherm/protherm>). In dieser Datenbank wurde der aktuelle Forschungszustand über die Thermostabilisierung von Proteinen in statistischen Daten zusammengefasst. Aus diesen statistischen Daten können wir einen einfachen Überblick über den Forschungsstand in diesem Bereich gewinnen.

Daten der ProTherm, Stand 20. Sept. 2005:

Totale Anzahl von Einträgen	18539
Totale Anzahl aller Proteine	833

1. EINLEITUNG

Anzahl von Proteinen mit Mutationen	258
Anzahl von einzelnen Mutationen	8970
Anzahl von Wildtyp-Proteinen	7411
Anzahl von Mutationen in Helices	4177
Anzahl von Mutationen in <i>Sheets</i>	2693
Anzahl von Mutationen in <i>Turns</i>	1321
Anzahl von Mutationen in <i>Coils</i>	2515
Anzahl von Einträgen von verdeckten, nicht exponierten Aminosäuren	4631
Anzahl von Einträgen von teilweise verdeckten, nicht exponierten Aminosäuren	2817
Anzahl von Einträgen von exponierten Aminosäuren	2839
Anzahl von Einträgen mit CD	7682
Anzahl von Einträgen mit DSC	5508
Anzahl von Einträgen durch thermale Entfaltung	11094
Anzahl von Einträgen durch GdnHCl-Denaturierung	4035
Anzahl von Einträgen durch Urea-Denaturierung	3105
Totale Anzahl von Referenzen	1587

1.1 Thermostabilität von Proteinen

Unter der Thermostabilität eines Proteins versteht man die Eigenschaft eines Proteins, bei einer bestimmten Temperatur seine Struktur und biologische Funktion aufrecht zu erhalten. Eine gefaltete Struktur eines Proteins hat einen relativ starren, dicht gepackten Proteinkern, und die äußeren Bereiche sind lockerer und flexibler. Bei Erhöhung der Temperatur nimmt die thermische Bewegung der flexiblen äußeren Teile des Proteins zu, die Gesamtstruktur des

1. EINLEITUNG

Proteins bleibt aber in einem bestimmten Temperaturbereich erhalten. Bei Temperaturenniedrigung erlangt das Protein seine native Konformation zurück. Dieser Temperaturbereich liegt bei homologen Proteinen aus mesophilen Organismen bei 10-45°C, aus thermophilen Organismen bei 60-80°C und aus hyperthermophilen Organismen bei 85-110°C. Bei weiterer Temperaturerhöhung nimmt die thermische Bewegung so stark zu, dass die Balance zwischen Flexibilität und Stabilität zerstört wird und das Protein die Wasserstoffbrücken- und Salzbrückenbindungen verliert. Hierdurch verliert das Protein seine Gesamtstruktur, es kann eine irreversible, entfaltete Denaturierung eintreten.

Die Stabilität eines Proteins kann mit unterschiedlichen Methoden experimentell bestimmt werden. Die bei der Temperaturveränderung entstehende Denaturierung und Renaturierung können durch ein CD-Spektrometer verfolgt werden. Die Schmelztemperatur kann auch mit dem CD-Spektrometer gemessen und durch einen direkten oder indirekten Aktivitätstest bei unterschiedlichen Temperaturen bestimmt werden.

Die Wechselwirkungen, die die Faltung eines Protein bestimmen, sind die kovalenten Bindungen (Peptidbindungen, Disulfidbrücken) und nicht kovalenten Bindungen wie z.B. hydrophober Effekt, Wasserstoffbrückenbindungen, die van der Waals-Kräfte und elektrostatischen Wechselwirkungen.

Die Erhöhung der Thermostabilität von Proteinen ist von großem wirtschaftlichem Interesse. Um Biokatalysatoren bei extremen Bedingungen einzusetzen, die Substratlöslichkeit zu erhöhen und Enzymverbrauchskosten zu reduzieren, hat die Industrie zunehmendes Interesse an thermostabileren Enzymen.

1.2 Vorhersage der Thermostabilität

Die Thermostabilisierung eines Enzyms stellt hohe Anforderungen an die Methoden des Computer-Protein-Design dar, weil die Substrat-Geometrie des aktiven Zentrums und das

1. EINLEITUNG

molekular-dynamische Verhalten während der enzymatischen Reaktion oft sehr auf maximale katalytische Effizienz ausgerichtet ist (Kraut *et al.*, 2003; Daniel *et al.*, 2003). Daher muss die Design-Methode in der Lage sein, für thermostabilisierenden Mutanten innerhalb einer bestimmten Faltung jede Veränderung im Rückgrat zu minimieren, der die Struktur des aktiven Zentrums oder ihre Flexibilität stören könnte (Korkegian, A. *et al.*, 2005).

Für eine gezielte Erhöhung der Thermostabilität durch Austausch einer einzelnen Aminosäure ist die Anzahl der Austauschmöglichkeiten sehr groß. Dr. Oliver Leven hat ein Thermostabilitätsvorhersageprogramm (Leven, O., 1999) entwickelt, in dem der stabilisierende Einfluss eines Aminosäureaustausches durch Berechnung eines Aminosäure-Atom- und eines Torsionswinkel-Potentials beurteilt werden. Die Stabilitätsänderung eines Proteins nach Austausch einer Aminosäure lässt sich durch ein Stabilitätsprofil vorhersagen, indem die Wechselwirkungsenergie zwischen einer Umgebung und jeder der zwanzig an dieser Stelle potentiell einsetzbaren Aminosäuren bestimmt und in einer Tabelle (Profil) zusammengefasst wird. Aus diesem Profil lassen sich die theoretisch vorhergesagten energetischen Auswirkungen eines Aminosäureaustauschs ablesen.

In einer Proteinstruktur sind die Wechselwirkungen aller Aminosäuren sehr kompliziert. Um diese Komplexität zu vereinfachen, wurde die Umgebung einer Aminosäure in diesem Programm wie folgt beschrieben: jede Aminosäure interagiert nur mit denjenigen Aminosäuren oder den Atomen, die ihre Umgebung bilden. Der Einfluss der restlichen Struktur wird als konstant betrachtet. Durch die Torsionswinkel Φ und ψ der betrachteten Aminosäuren kann die direkte Wechselwirkung zu Nachbarn in der Sequenz erfasst werden (Φ = Rotationswinkel um die N-C $_{\alpha}$ -Bindung; ψ = Rotationswinkel um die C $_{\alpha}$ -C'-Bindung). Diese Wechselwirkungen sind auf die nächsten Nachbarn im Sequenzraum beschränkt und die räumlichen Wechselwirkungen werden nicht berücksichtigt. Bei der Rechnung der abstandsabhängigen Aminosäure-Atom-Potentiale wird die wechselwirkende Aminosäure als Kugel betrachtet. Die Umgebungsatome werden schalenweise um den Mittelpunkt der Seitenkette herum erfasst und anteilig berücksichtigt.

Durch die Beschreibung der $\Phi\Psi$ -Winkel kann der Verlauf des Proteinrückgrats verfolgt werden, durch den die Proteinfaltung definiert ist. Wegen der Abhängigkeit der Konformation

1. EINLEITUNG

von der Seitenkettenposition hat jede der zwanzig Aminosäuren verschiedene $\Phi\Psi$ -Winkel-Verteilungsmuster. Aus dieser Verteilung kann der Energiewert einer $\Phi\Psi$ -Winkel-Kombination mit Hilfe eines wissensbasierten Potentials abgeschätzt werden.

1.3 Methode zur Stabilisierung von Proteinen

Die Erhöhung der Proteinstabilität ist für industrielle biokatalytische Prozesse, aber auch für Arzneistoffe auf Proteinbasis von großem Interesse (Manning *et al.*, 1989). Von den Methoden zur Erhöhung der Proteinstabilität verwendet man meistens die folgenden:

1. Medium Engineering: In dieser Methode werden die Zugabe von Additiven wie Zucker, Glycerin oder stabilisierenden Salzen (Geisow & Epton, 1995), die Verwendung organischer Lösungsmittel (Klibanov, 1989; Fagain, 1995), und die Koexpression des Proteins mit Chaperonen zur Unterdrückung der Aggregation (Schlieker *et al.*, 2002) verwendet;
2. Chemische Modifizierungen der Proteine: Die Aminosäureseitenketten werden durch gruppenspezifische Reagenzien (Cupo *et al.*, 1980), kovalente Verknüpfung mit Polyethylenglykol oder Zuckerresten (Rajalakshmi & Sundaram, 1995) modifiziert. Auch intra- oder intermolekulare Quervernetzung (Enns & Chan, 1978; Wong & Wong, 1992), z.B. durch Ausbildung von Disulfidbrücken, kann zur Stabilisierung genutzt werden.
3. Immobilisierung von Proteinen: Proteine können auf einem Träger gebunden werden (Ulbrich, 1989) oder in Polymerstrukturen eingekapselt werden (Perez *et al.*, 2002);
4. Protein-Engineering: Dies ist eine Methode, in der man durch die rekombinanten DNA-Technologien die Primärsequenz der Proteine gezielt ändern kann. Dabei können erhebliche

1. EINLEITUNG

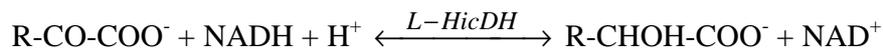
Stabilisierungseffekte erzielt werden (Shortle, 1989). In den letzten Jahren wurden viele Proteine durch Protein-Engineering nach ihrer Stabilität intensiv untersucht, und dabei wurden einige wichtige Stabilisierungsfaktoren entdeckt.

1.4 Stabilisierungsfaktoren

Einige Stabilisierungsfaktoren (Sternier *et al.* 2000, Kumar *et al.* 2000), die in den meisten Untersuchungen entdeckt und systematisch getestet wurden, sind (1) Erhöhung der Zahl der Wasserstoffbrücken, (2) zusätzliche und gesteigerte elektrostatische Wechselwirkungen, (3) optimierte hydrophobe Wechselwirkungen, (4) Erhöhung der Packungsdichte durch Füllung von Hohlräumen in der Proteinstruktur (Ishikawa *et al.*, 1993), (5) vergrößerte polare Oberfläche im Vergleich mit einer nicht-polaren Oberfläche, (6) Erhöhung des α -Helix-Gehaltes und der α -Helix-Stabilität, (7) vermehrte Bindungen mit Metall-Ionen, (8) Erhöhte Fixierung des Peptid-Endes zum Proteinkern, (9) Austausch von Resten mit energetisch ungünstigeren Konformationen durch Glycin, (10) Entfernung von in Lösungsmittel exponierten Loops, (11) Einführung von Prolinresten (Muslin *et al.*, 2002), (12) Multimerisierung und Quervernetzung (Sauer *et al.*, 1986), (13) Reduzierung der thermolabilen Aminosäurereste Asparagin, Glutamin, Cystein und Methionin im Protein. Viele dieser Faktoren sind an Subtilisin (Bryan, 2000), Glukoamylase (Sauer *et al.*, 2000), Glukose-Isomerase (Hartley *et al.*, 2000) und α -Amylasen (Nielsen & Borchert, 2000) als Modellenzymen erfolgreich angewendet worden und zeigen, dass oft nur wenige ausgewählte Mutationen nötig sind, um ein mesophiles in ein thermophiles Protein umzuwandeln (Arnold, 1998). Der größte Stabilisierungseffekt durch eine Punktmutation wurde bisher für die Triosephosphat-Isomerase aus *Leishmania* beschrieben und verursacht eine Erhöhung der Schmelztemperatur um 26°C (Williams *et al.*, 1999).

1.5 L-2-Hydroxyisocaproat Dehydrogenase

Die L-2-Hydroxyisocaproat Dehydrogenase (L-HicDH, E.C. 1.1.1.27) aus *Lactobacillus confusus* wurde erstmals von Schütte *et al.* gereinigt und charakterisiert (Schütte *et al.*, 1984). Dieses Enzym ist eine NAD(H)-abhängige Oxidoreduktase und katalysiert die reversible und stereospezifische Umwandlung von 2-Ketocarbonsäuren zu den entsprechenden 2-Hydroxycarbonsäuren. L-2-Hydroxyisocaproat ist das beste Substrat für dieses Enzym und deswegen wurde dieses Enzym von Schütte *et al.* als L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase (L-HicDH) benannt. L-HicDH ist ein Homotetramerenzym, und jede Untereinheit hat ein Molekulargewicht von 33 kDa. Die Summenformel der katalysierten Reaktion stellt sich wie folgt dar:



Das Enzym wurde von Lerch *et al.* isoliert, sequenziert und in einem Expressionsvektor subkloniert (Lerch *et al.*, 1989). Die Aminosäuresequenz von L-HicDH, die von dem Gen abgeleitet ist, hat eine insgesamt 30 % -ige Identität mit der Aminosäuresequenz von L-Lactat-Dehydrogenase (L-LDH) aus *Lactobacillus casei*. Die bei der Bindung von Koenzym und Substrat beteiligten Aminosäurereste sind in der L-HicDH hoch konserviert im Vergleich zu prokaryotischen und eukaryotischen L-LDHs (Lerch *et al.*, 1989). Feil *et al.* (1994) hat durch die Homologie-Modellierungs-Technik ein Modell der L-HicDH als Monomer erhalten und einige L-HicDH Varianten auf der Basis von diesem Modell konstruiert. Fünf unterschiedliche Formen von Wild-Typ L-HicDH-Kristallen wurden von Niefind (1993) gezüchtet und teilweise charakterisiert. Darauf wurden die Röntgenstrukturdaten eines L-HicDH Kristalls von Niefind bis zur Auflösung von 2.2 Å verfeinert und veröffentlicht (Niefind *et al.*, 1995) (PDB-Code: 1HYH). Das L-HicDH Monomer besteht aus zwei Domänen: die NAD⁺-bindende Domäne und die katalytische Domäne. Die gesamte Struktur eines Monomers hat 7 α -Helices,

1. EINLEITUNG

12 β -Stränge, einen *active site loop* (Gly98 bis Arg112) und einen *flexible surface loop* (Val217 bis Asp226). Die NAD^+ -bindende Domäne, die sich am N-terminalen Teil befindet, besitzt den Rossmann-fold. Sie besteht aus einem Faltblatt von sechs parallelen β -Strängen (βA , βB , βC , βD , βE , βF) mit drei α -Helices (αB , αC , α3G) auf der einen Seite und zwei α -Helices ($\alpha\text{D/E}$, α1F) auf der anderen Seite. Das Zentrum der katalytischen Domäne besteht aus zwei gedrehten, antiparallelen β -sheets: eines besteht aus den Strängen βG , βH und βJ , die andere besteht aus βK , βL und βM . Die *sheets* werden von vier Helices α2F , α1G , α2G und αH umgeben.

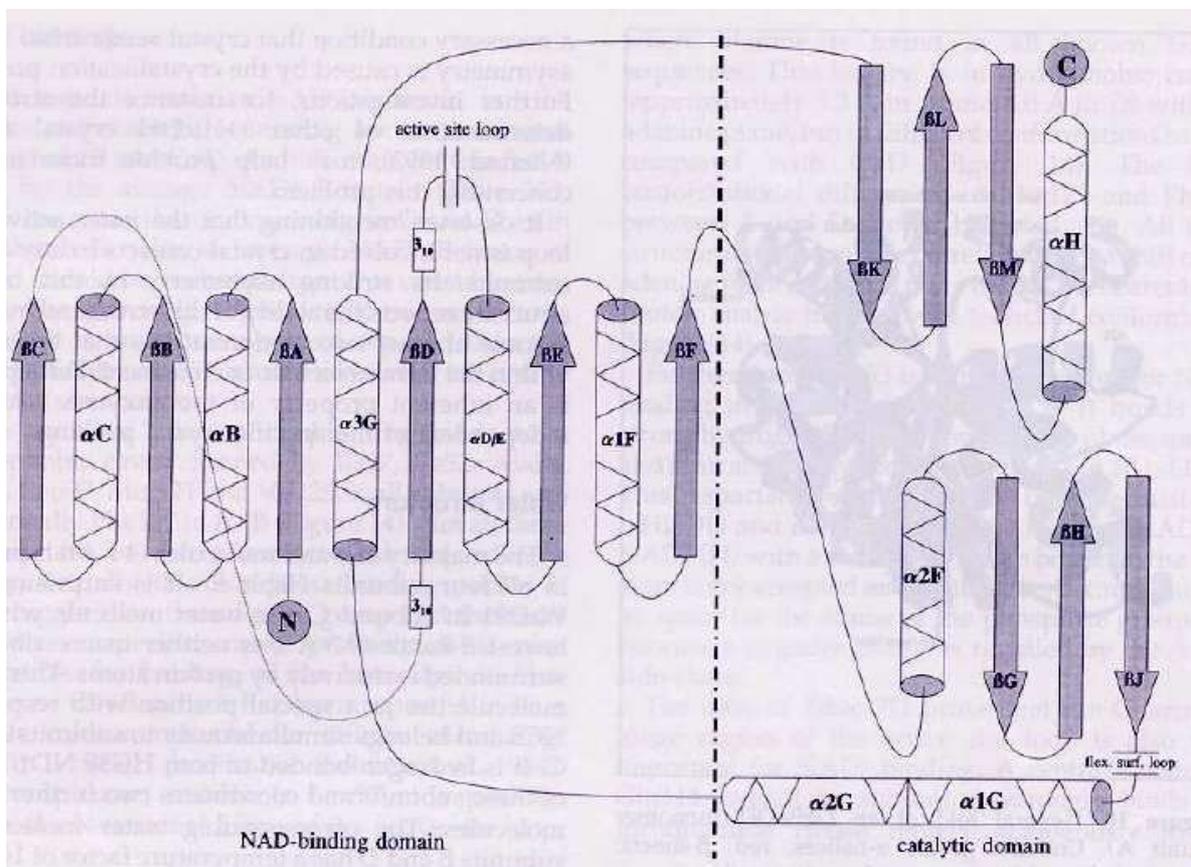


Abbildung 1-1. Die gesamte Topologie von einem L-HicDH Monomer (die Abbildung stammt aus Niefind, K., Hecht, H-J. and Schomburg, D. *J. Mol. Biol.* (1995) 251, 256-281)

1.6 Strukturmerkmale der L-HicDH

Die Strukturdaten von L-HicDH sind in der Protein Datenbank (PDB, <http://www.rcsb.org/>) erhältlich.

Kontaktbereich zwischen Monomeren:

Der Kontaktbereich zwischen den vier Monomeren des tetramerischen Enzyms ist groß. Bei der Untereinheit A und B sind ungefähr 28% der zugänglichen monomeren Oberfläche an Untereinheitskontakten beteiligt und bei der Untereinheit C und D sind ungefähr 26% der zugänglichen monomeren Oberflächen an Kontakten beteiligt. Im Durchschnitt verliert jede Untereinheit durch die Interaktion ungefähr 27% zugänglicher Oberfläche zum Lösungsmittel.

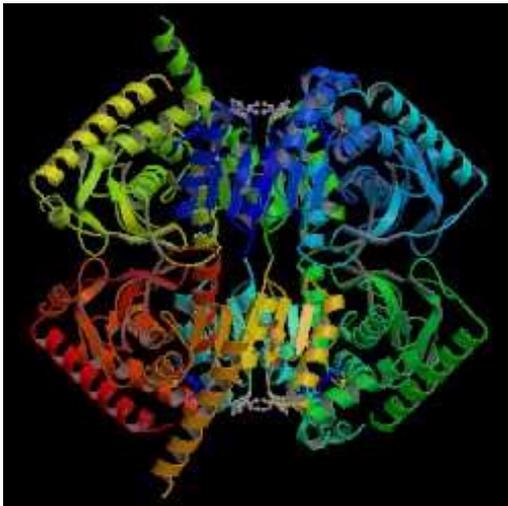


Abbildung 1-2. Tetramer der L-HicDH
(PDB-Kürzel 1HYH, Niefind *et al.*, 1995).

Sekundärstruktur:

Jede Untereinheit besteht aus zwei Domänen. Die NAD-Bindungsdomäne besteht aus sechs parallelen β -Faltblätter (β A, β B, β C, β D, β E, β F) mit drei Helices (α B, α C, α G) auf einer Seite und zwei (α D/E, α F) auf der anderen Seite (Rossmann-Faltung). Die katalytische Domäne besteht aus zwei hoch verdrehten antiparallelen β -Faltblättern (β G, β H, β J und β K, β L, β M) und vier umgebenden Helices (α 2F, α 1G, α 2G und α H). (Niefind *et al.*, 1995. Abbildung 1-1.)

Aminosäurezusammensetzung:

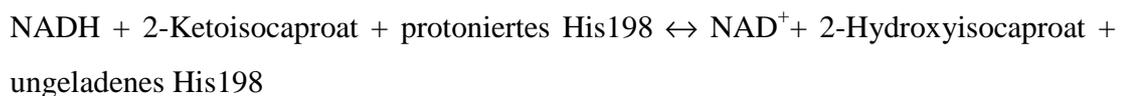
1. EINLEITUNG

Kontaktflächen zwischen Proteinen sind oft hydrophober als die Lösungsmittel exponierten Proteinflächen aber weniger hydrophob als das Innere eines Proteins. In einer Studie waren durchschnittlich 47% der interagierenden Aminosäurereste hydrophobe, 31% polar und 22% geladen (Uetz, P. *et al.*, 2005). Stabile Komplexe haben Kontaktflächen mit hydrophoben Resten, während die Kontaktflächen in instabilen Komplexen eher polare Reste bevorzugen. In der Aminosäurezusammensetzung der L-HicDH sind 52,9% der Aminosäurereste hydrophobe, 24,5% geladen und 22,6% polar.

1.7 Der Reaktionsmechanismus der L-HicDH

Die Reaktion der L-HicDH hat einen geordneten, sequentiellen Mechanismus. Die geöffnete Untereinheit bindet erst NADH und dann 2-Ketoisocaproat, wobei sich der *Coenzym-Loop* schließt. Die Reaktion findet statt, wonach sich der *Coenzym-Loop* öffnet und erst L-2-Hydroxyisocaproat und dann das NAD⁺ entlässt. Die Oxidation von 2-Hydroxyisocaproat läuft entsprechend in der umgekehrten Reihenfolge ab.

In allen vier Untereinheiten der L-HicDH enthält das aktive Zentrum ein NAD⁺, ein Substratmolekül und ein Wassermolekül, homolog zum aktiven Zentrum von L-LDH. In diesem internen, mit Wasser gefüllten Hohlraum findet die Reaktion statt. Die Reaktion von 2-Ketoisocaproat zu L-2-Hydroxyisocaproat geschieht am His198 im aktiven Zentrum (siehe Abbildung 1-3). Dabei dient His198 als katalytische Säure und wird von Asp171 stabilisiert, während Arg174 das Substrat fixiert (Niefind *et al.*, 1995). Zuerst bildet sich der binäre Komplex aus Enzym und NADH, und dann bindet dieser binäre Komplex das Substrat. Während der Reaktion wird ein Hydridion vom NADH auf das C2-Atom des Substrats sowie ein Proton von His189 auf den Carbonylsauerstoff übertragen, so dass formal ein H₂ eingebaut wird. Die Reaktion befindet sich im Gleichgewicht:



1. EINLEITUNG

Im Übergangszustand ist daher die positive Ladung des His198 zum Teil auf das Substrat und das NADH verteilt (Dunn *et al.*, 1991).

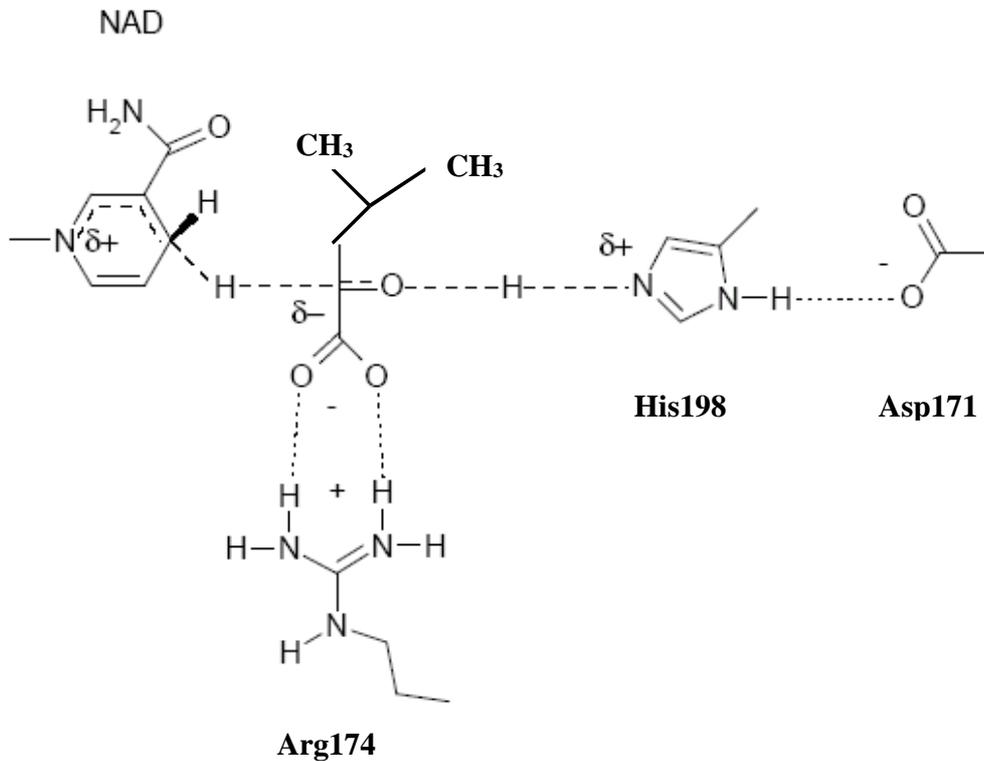


Abbildung 1-3. Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der L-HicDH (Niefind *et al.*, 1995). His198, Asp171 und Arg174 bilden eine katalytische Triade.

1.8 Die biologische Bedeutung der L-HicDH

Die biologische Bedeutung der L-HicDH ist noch nicht eindeutig bestimmt. L-HicDH ist das einzige bekannte natürliche NAD(H)-abhängige Enzym, das L-2-Hydroxyisocaproat umsetzen kann. Aus dem Stoffwechselweg, an dem das Enzym beteiligt ist, kann man

1. EINLEITUNG

vermuten, dass die L-HicDH eine Rolle bei der Leucin-Synthese spielt, und dadurch bei der NAD(H)-Regulation oder im Stickstoffhaushalt eine Rolle spielt. 2-Oxoisocaproat kommt im bakteriellen Leucin-Stoffwechsel vor. Die L-Leucin-Dehydrogenase katalysiert die Reaktion von 2-Oxoisocaproat zu Leucin (Daniel Schlieper, Dissertation. 2002).

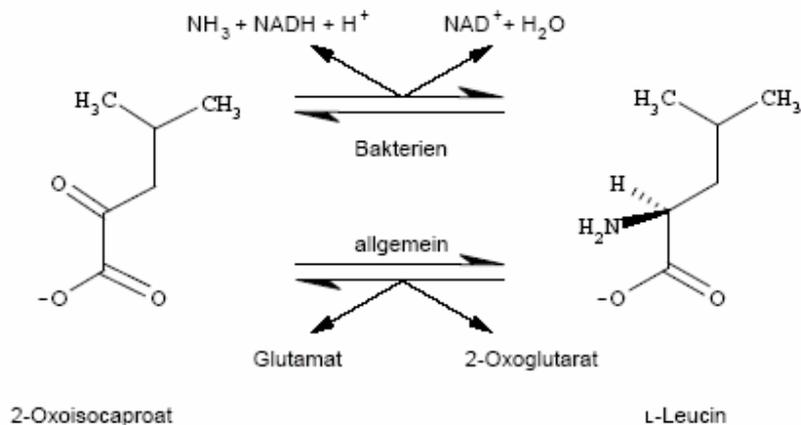


Abbildung 1-4. Die Reaktion von 2-Oxoisocaproat zu Leucin. Die obere Reaktion wird von der Leucin-Dehydrogenase katalysiert und kommt nur in Bakterien vor, die untere wird von der Leucintransaminase katalysiert und ist ein ubiquitär vorkommender Stoffwechselweg (nach Michal, 1999).

1.9 Anwendung der L-HicDH

Die Anwendungsmöglichkeit der L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase wurde von Wandrey *et al.* (1984) beschrieben. Die L-HicDH kann gemeinsam mit der D-HicDH und einer L-Aminosäure Dehydrogenase in einem Enzym-Membran-Reaktor zur Produktion von L-Aminosäuren in industriellem Maßstab eingesetzt werden (Wandrey *et al.*, 1984).

1. EINLEITUNG

Neben ihrer Funktion als Bausteine von Proteinen haben Aminosäuren auch wichtige biologische Funktionen, z.B. als Neurotransmitter, Vorstufen davon oder als Baustein von Peptidantibiotika (z.B. Aktinomycin, Gramicidin) und –hormonen (z.B. Insulin, LHR Hormon). Unnatürliche Aminosäuren gewinnen zunehmend an Bedeutung als Intermediate für neue Pharmazeutika, Lebensmittelzusätze und Agrochemikalien. Im Jahr 1995 wurde der Anteil am Weltmarkt auf 3 Milliarden US \$ geschätzt (Leuchtenberger, 1996), die sich im Wesentlichen auf die Bereiche Lebensmittel (38%), Futtermittel (54%), Medizin und Kosmetik (8%) verteilen (Burkovski *et al.*, 1999).

Die industrielle Herstellung von Aminosäuren erfolgt auf unterschiedlicher Weise und, abhängig von der Natur und dem Bedarf an den jeweiligen Aminosäuren. Die Anwendung von Extraktions- und Fermentationsverfahren beschränkt sich auf proteinogene Aminosäuren, wohingegen chemische und enzymatische Synthesemethoden (Yamada *et al.*, 1988) vor allem für die Bereitstellung unnatürlicher Aminosäuren geeignet sind. Unter den vier Methoden der industriellen Herstellung von Aminosäuren – chemische Synthese, Extraktion, enzymatische Synthese, und Fermentation – erlangt der biotechnologische Prozess zunehmend Aufmerksamkeit.

1.10 Proteinfaltung und Stabilität vermittelnde Kräfte

Kräfte, die Proteinfaltung, Interaktion und Stabilität vermitteln, sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

1. EINLEITUNG

Tabelle 1-1. Proteinfaltung, Interaktion und Stabilität vermittelnde Kräfte

Interaktion	Effekt	Größenordnung	Mechanismus
Elektrostatische Wechselwirkung	destabilisierend	klein	erhöhte Ladungsdichte des gefalteten Zustands
Ionen-Paarung	stabilisierend	intermediär	erteilt strukturelle Spezifität im gefalteten Zustand
Konfigurationale Enthalpie	destabilisierend	groß	setzt Faltung einem kompakten Zustand entgegen
H-Bindung	stabilisierend	intermediär	erteilt strukturelle Spezifität zu interner Architektur
van der Waals	stabilisierend	klein	erleichtert das „Packen“ der Aminosäuren
Hydrophobe Wechselwirkung	stabilisierend	groß	Begünstigt die Formung kompakter globulärer Strukturen

Die Hauptquelle von Stabilität ist die hydrophobe Interaktion und die hauptsächlich destabilisierende Kraft ist die konfigurationale Enthalpie des entfalteten Zustandes.

1.11 Genom-basierte Studien über Protein Thermostabilität

Normalerweise sind die Studien über die Sequenz- und Strukturunterschiede in thermophilen und mesophilen Proteinen erschwert durch mangelhafte Sequenz- und Strukturdaten. Diese Situation ändert sich schnell durch die Verfügbarkeit von kompletten Genomsequenzen von hyperthermophilen Organismen und durch die strukturelle Genomik.

Chakravarty und Vardarajan haben die Aminosäuresequenzen löslicher Proteine im kompletten Genom einiger thermophiler und mesophiler Organismen verglichen (Chakravarty *et al.*,

1. EINLEITUNG

2000). Im Durchschnitt wurde gefunden, dass thermophile Proteine weniger Reste (268 ± 38) als mesophile Proteine (310 ± 16) enthalten. Der große Anteil an geladenen Resten (Arg, Lys, His, Asp, Glu) und der geringe Anteil an ungeladenen Resten (Ser, Thr, Gln, Asn, Cys) in thermophilen Proteinen sind statistisch signifikant. Thompson und Eisenberg haben auch eine signifikante Tendenz für kürzere Sequenzlängen in thermophilen Proteinen beim Vergleich der kompletten Genome einiger mesophiler, thermophiler, und hyperthermophiler Organismen beobachtet (Thompson and Eisenberg, 1999). Sie haben beobachtet, dass die in thermophilen Proteinen vorzugsweise deletierten Sequenzen (*sequence deletion sites*) in Loop-Regionen vorkommen, in den entsprechenden mesophilen Proteinen vorhanden sind. Daraus haben sie geschlossen, dass die *Deletion* exponierter Loops ein natürlicher Mechanismus für die Erhöhung der Protein-Thermostabilität ist, und zusätzlich zur Steigerung elektrostatischer Interaktionen dient.

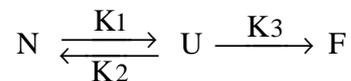
Cambillau und Claverie haben auch den Aufbau von Proteinen aus mesophilen, thermophilen, und hyperthermophilen Organismen verglichen (Cambillau and Claverie, 2000). Sie haben auch eine signifikante Steigerung in dem Anteil geladener Reste (Lys, Arg, Asp, Glu) für Proteine in Hyperthermophilen und in Thermophilen beobachtet. Eine Steigerung des Anteils von geladenen Resten an dem Lösungsmittel- exponierten Resten wurde auch von Haney *et al.* berichtet (Haney *et al.*, 1999).

1.12 Die Protein-Entfaltung

Die Entfaltung von Protein kann entweder reversibel oder irreversibel sein. Das einfachste Modell, das beide Möglichkeiten umfasst, besteht aus zwei Schritten: (1) reversible Denaturierung von dem nativen Protein (N) mit einer Gleichgewichtskonstante $K_{eq} = k_1 / k_2$, die zu einem entfalteten oder teilweise entfalteten Zustand (U) führt; und (2) irreversible Änderung von dem entfalteten Zustand mit einer Geschwindigkeitskonstante k_3 , die zum finalen Zustand

1. EINLEITUNG

(F) führt, der nicht in der Lage ist, in den nativen Zustand zurück zu gelangen. Dieses Modell kann wie folgt dargestellt werden:



Dieses Modell ist bekannt als Lumry-Eyring Modell (Lumry and Eyring 1954). Die möglichen Prozesse, die der irreversible Schritt erzwingt, wie Aggregation, Autolyse, chemische Änderung von Resten, sind von Klibanov und Ahern beschrieben worden (Klibanov *et al.*, 1987; Ahern *et al.*, 1987). Abhängig von den Konstanten k_2 und k_3 können zwei extreme Fälle identifiziert werden:

$k_3 \ll k_2$: Die Entfaltung ist ein *two-state* reversibler Prozess. Detaillierte Informationen über die Energetik und den Mechanismus der Entfaltung können ermittelt werden (Dill *et al.*, 1989; Privalov *et al.*, 1982). Die Gibbsche Freie Energie ($\Delta G = G_U - G_N$) hängt mit der Gleichgewichtskonstante K_{eq} durch die Gleichung:

$$\Delta G = -RT \ln K_{eq}$$

zusammen, und kann auch umformuliert werden zu:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

wobei R die universelle Gas-Konstante, T die Temperatur, ΔH die Enthalpieänderung, ΔS die Entropieänderung sind.

$k_3 \gg k_2$: Die Entfaltung ist ein *two-state* irreversibler Prozess (Sanchez-Ruiz *et al.*, 1988; Sanchez-Ruiz, 1992). Gleichgewichtsthermodynamische Analysen sind nicht anwendbar, und nur die Enthalpie der Entfaltung kann gemessen werden. Es wird generell angenommen, dass die Enthalpie-Änderung von U zu F vernachlässigbar ist, und mit der Enthalpie-Änderung von N zu U vergleichbar ist.

1.13 *Two-state* reversible Entfaltung: Thermodynamik der konformationalen Änderung von Proteinen

Protein-Stabilität hängt von der freien Energie-Änderung zwischen dem gefalteten und entfalteten Status ab und lässt sich nach den oben angeführten Gleichungen wie folgt formulieren:

$$- R T \ln K = \Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

wobei R die universelle Gas-Konstante, K die Gleichgewichtskonstante, ΔG die freie Energieänderung zwischen dem gefalteten und entfalteten Status, ΔH die Enthalpieänderung und ΔS die Entropieänderung vom gefalteten zum entfalteten Status sind. Die Enthalpie-Änderung, ΔH , bezieht sich auf die Bindungsenergie (Dispersionskräfte, elektrostatische Interaktionen, van der Waals Potentiale und Wasserstoff-Brücken) während hydrophobe Interaktionen als Entropie-Größe (ΔS) beschrieben sind. Das Protein wird stabiler mit Steigerung des negativen Wertes der freien Energie, das heißt die freie Energie von entfaltetem Protein (G_U) steigt relativ zu der freien Energie von gefaltetem oder nativem Protein (G_N). Mit anderen Worten, wenn die Bindungsenergie steigt oder die Entropie-Differenz zwischen beide Zustände sinkt, wird das gefaltete Protein noch stabiler. Die gefaltete Konformation des Proteins befindet sich offenbar in einem relativ engen freien Energie-Minimum, und substantielle Störungen dieser gefalteten Konformation benötigen eine signifikante Steigerung der freien Energie.

1. EINLEITUNG

1.14 Thermostabilität und kinetische Stabilität

Die Proteinstabilität ist mit der Energetik von Proteinmolekülen eng verbunden. Die differentielle *scanning*-Kalorimetrie (DSC) zur Untersuchung der thermal induzierten Denaturierung von Proteinen ist eine direkte und präzise Methode, die Proteinstabilität zu charakterisieren.

1.14.1 Bestimmung und Definition der Proteinstabilität

Die native Proteinstruktur ist durch die Primärstruktur, Sekundärstruktur, Tertiärstruktur und Quartärstruktur in mehreren Ebenen festgelegt. Unter physiologischen Bedingungen erreicht das nativ-gefaltete Protein einen energetisch begünstigten Zustand. Dieser native Zustand ist durch eine Reihe von schwachen Wechselwirkungen stabilisiert. Dabei handelt es sich z.B. um van der Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen.

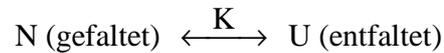
Bisher herrscht noch Unklarheit darüber, welche Wechselwirkungen die Stabilität dominieren. Nach Pace *et al.* (Pace *et al.*, 1996), spielen die Wasserstoffbrückenbindungen und die hydrophoben Wechselwirkungen die Hauptrolle bei der Stabilität. Perl *et al.* behauptet, dass die elektrostatischen Wechselwirkungen hauptverantwortlich für die Stabilität sind (Perl *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu glauben Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2000), dass die van der Waals-Kräfte für die Stabilität von Protein entscheidend sind.

Denaturierende Bedingungen (z.B. hoher Druck, hohe Temperatur) führen zur Entfaltung der Polypeptidkette, und dadurch zum Verlust der nativen Proteinkonformation. Mit der Stabilität eines Proteins ist die Fähigkeit gemeint, diese denaturierenden Einflüsse innerhalb gewisser Grenzen zu tolerieren und die native Konformation aufrecht zu erhalten.

Um die Stabilität von Proteinen beurteilen zu können muss zwischen thermodynamischer und kinetischer Stabilität klar unterschieden werden. Physikalische Biochemiker diskutieren mit der Proteinstabilität vor allem die thermodynamische Stabilität eines Proteins, das sich rasch

1. EINLEITUNG

entfaltet und zurückfaltet. Dieser Vorgang wird vereinfacht als *two-state* Mechanismus betrachtet, der reversibel und kooperativ abläuft:



wobei K die Gleichgewichtskonstante für die Entfaltung ist.

Die einfachsten, hinsichtlich ihrer Stabilität und Faltung ausführlich erforschten Proteine, weisen eine rasche Reversibilität auf, wodurch das experimentelle Design und die theoretische Bearbeitung der Daten vereinfacht sind.

In diesen Fällen, ergibt sich die Stabilität des Proteins aus der Differenz der Gibbschen freien Energie (ΔG) des gefalteten (G_n) und entfalteten (G_u) Zustandes. Die Faktoren, die die Stabilität beeinflussen, sind die relative freie Energie des gefalteten Zustands (G_n) und des entfalteten Zustands (G_u). Je größer ΔG_u ist, desto stabiler ist das Protein.

$$\Delta G_u = G_u - G_n \qquad \text{Gleichung (1)}$$

Die Gibbsche freie Energie (G) besteht aus zwei Größen: der Enthalpie (H) und der Entropie (S):

$$G = H - TS \qquad \text{Gleichung (2)}$$

wobei T die Temperatur in Kelvin darstellt.

Die freie Energiedifferenz der Faltung (ΔG_u) ist typischer Weise sehr klein, in der Größenordnung von 5-15 kcal/mol für ein globales Protein. Im Vergleich dazu beträgt ΔG_u für eine kovalente Bindung 30-100 kcal/mol.

1.14.2 Kinetische Stabilität

1. EINLEITUNG

Die Kinetische Stabilität ist ein Maß für die Geschwindigkeit der Proteinentfaltung. Besonders wichtig ist die Betrachtung dieser Charakteristik für Proteine, die sich sehr langsam entfalten oder irreversibel denaturieren. So kann eine irreversible Denaturierung eintreten, wenn das entfaltende Protein rasch einigen permanenten Änderungen unterworfen wird. Dabei kann es sich z.B. um Aggregation oder proteolytische Degradation handeln.

In solchen Fällen ist die Differenz der freien Energie des gefalteten und des entfalteten Zustandes nicht entscheidend, da es sich um keinen Gleichgewichtsprozess handelt. Wichtig ist die Differenz der freien Energie des gefalteten Proteins und des Übergangszustandes, die als Aktivierungsenergie bezeichnet wird. Die Größe dieser Differenz bestimmt die Geschwindigkeit der Entfaltung.

Im Falle von irreversiblen oder sich langsam entfaltenden Proteinen ist die kinetische Stabilität oder die Geschwindigkeit der Entfaltung besonders wichtig. Ein kinetisch stabiles Protein entfaltet sich langsamer als ein kinetisch instabiles Protein. In kinetisch stabilen Proteinen ist die Hürde der freien Energie höher. Zur Entfaltung ist es nötig, im ersten Schritt die Aktivierungsenergie aufzubringen, um von dem gefalteten Zustand (N) in den Übergangszustand (ÜZ) zu gelangen.

Die thermodynamische und kinetische Stabilität sind in Abbildung 1-5 in einem Energieschema dargestellt (Braxton, 1996).

1. EINLEITUNG

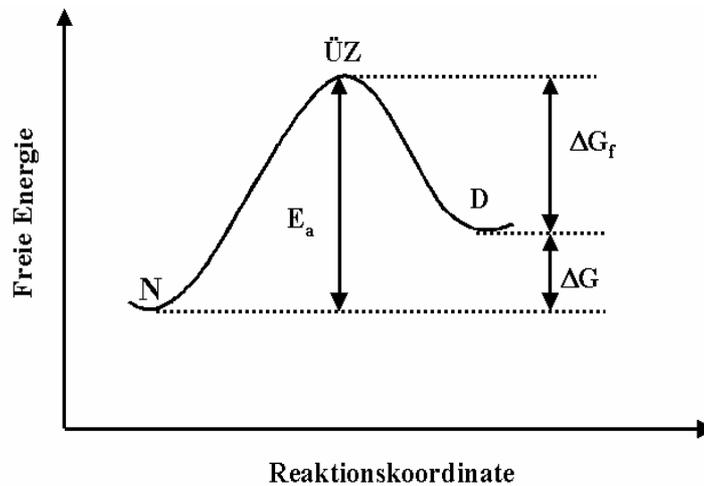


Abbildung. 1-5. Energieschema für die Änderung der freien Energie der Entfaltung. Unter Nativbedingungen ist die Entfaltung des Nativzustandes (N) über den Entfaltungsübergangszustand (ÜZ) zum entfalteten Zustand (D) energetisch ungünstig. Die Differenzen der freien Enthalpien der Zustände beschreiben die Stabilität.

Die thermodynamische Beschreibung der Stabilität setzt ein reversibles Gleichgewicht zwischen nativem (gefaltetem) und denaturiertem (entfaltetem) Protein. im Folgenden als N und D bezeichnet. voraus (Zwei-Zustandsmodell):



Die freie Energie des Entfaltungsgleichgewichts ΔG als Maß der thermodynamischen Stabilität ergibt sich aus den Gleichgewichtskonzentrationen an N und D ($K_{eq} = [D]/[N]$) bzw. aus den Geschwindigkeitskonstanten der Entfaltung K_U und der Faltung K_F (Pace, 1990):

$$\Delta G_{eq} = -R \cdot T \cdot \ln(K_{eq}) = -R \cdot T \cdot \ln\left(\frac{[D]}{[N]}\right) = -R \cdot T \cdot \ln\left(\frac{K_U}{K_F}\right)$$

Dabei bezeichnet R die Gaskonstante und T die absolute Temperatur. Ist in Schema (1-1) die

1. EINLEITUNG

Rückfaltung nicht möglich, so kann nur die Entfaltungskinetik, d.h. die kinetische Beschreibung der Stabilität betrachtet werden:



Die Aktivierungsenergie der Entfaltung E_a als Maß der kinetischen Stabilität beschreibt die Energiebarriere zwischen N und Entfaltungsübergangszustand (ÜZ) und ergibt sich aus der Entfaltungskinetik nach der Eyring-Gleichung zu:

$$E_a = -R \cdot T \cdot \ln\left(\frac{K_U \cdot h}{K_B \cdot T}\right)$$

Dabei stellt K_B die Boltzmann-Konstante ($1.381 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$) und h die Plank-Konstante ($6.626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$) dar. (Eine analoge Beziehung gilt auch für die Aktivierungsenergie der Faltung ΔG_F). Die thermodynamische und die kinetische Stabilität stehen dabei in folgender Relation:

$$\Delta G = E_a - \Delta G_F$$

1.15 Grundlagen und Begriffe

1.15.1 Theoretische Grundlagen der Mikrokolorimetrie

Die Energie bestimmt, welche Moleküle bei einer chemischen Reaktion entstehen oder ob, und in welche Richtung sowie mit welcher Geschwindigkeit eine Reaktion abläuft. Energie ist die Fähigkeit, Arbeit zu verrichten. Dabei gilt der Satz der Energieerhaltung, der besagt, dass Energie nie erschaffen oder vernichtet wird. Es erfolgt lediglich eine Umwandlung von einer Erscheinungsform in eine andere oder ein Transport von einem Ort zum anderen.

1. EINLEITUNG

Jede chemische Reaktion ist mit der Aufnahme oder der Abgabe von Wärme verbunden (freie Enthalpie ΔH der Reaktion). Die Wärmeabgabe/-aufnahme während einer Reaktion kann als Temperaturänderung gemessen werden. Bei der differentiellen *scanning*-Kalorimetrie (DSC) wird die Wärmeaufnahme/-abgabe als Funktion der Temperatur gemessen.

Theoretische Grundlage

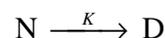
Bei Phasenübergängen der ersten Ordnung wie z.B. die Entfaltung von Proteinen, wird die Übergangstemperatur T_m erreicht, wenn die Wärmekapazität C_p ihren maximalen Wert annimmt. Der Wert der kalorimetrischen Enthalpie (ΔH_{cal}) für den Phasenübergang ist durch Integration der Fläche unter dem Peak bestimmbar.

$$\Delta H_{cal} = \int C_p dT \quad \text{Gleichung (3)}$$

Aus diesem Wert kann die Entropie des Phasenübergangs bestimmt werden:

$$\Delta S = \frac{\Delta H_{cal}}{T_m} \quad \text{Gleichung (4)}$$

Aus ΔH_{cal} , ΔS und T_m können thermodynamische Informationen über den Phasenübergang ermittelt werden. Aber der Phasenübergang von Proteinen enthält nicht nur den initialen und finalen Zustand, sondern in der Tat auch intermediäre Zustände (Lumry-Eyring Modell). Daher ist für die Daten Analyse das *non-two-state* Modell erforderlich. Eine Gleichgewichtskonstante K charakterisiert diesen Prozess:



Die Temperaturabhängigkeit von der Gleichgewichtskonstante wird durch die van't Hoff Gleichung deutlich:

1. EINLEITUNG

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T}\right)_p = \frac{\Delta H_{vH}}{RT^2} \quad \text{Gleichung (5)}$$

Für einen *two-state* Übergang der ersten Ordnung, ist die van't Hoff Enthalpie gleich der kalorimetrischen Enthalpie ΔH_{cal} . Mit anderen Worten, der Wärme-Effekt für den Übergang N \rightarrow D ist die kalorimetrische Enthalpie, die dementsprechend die Verteilung zwischen den zwei Phasen bewirkt. Wenn $\Delta H_{vH} < \Delta H_{cal}$ ist, enthält der Prozess einen thermodynamisch instabilen Zustand, wenn $\Delta H_{vH} > \Delta H_{cal}$ ist, bedeutet dies intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Protein-Monomeren.

Die van't Hoff Enthalpie kann direkt aus den kalorimetrischen Daten berechnet werden (Sturtevant, 1987):

$$\Delta H_{vH} = 4RT_m^2 \frac{C_p^{max}}{\Delta H_{cal}} \quad \text{Gleichung (6)}$$

wobei C_p^{max} das Maximum von C_p bei T_m ist.

ΔH_{cal} hängt von der Peak-Fläche ab, und ΔH_{vH} ist durch die Peak-Schärfe spezifiziert. Ein hoher ΔH_{vH} Wert entspricht einem scharfen Übergang. Ein scharfer Übergang ergibt einen großen Wert ΔH_{vH} , weil C_p^{max} entsprechend groß ist.

Mit der von Microcal angebotenen Software, Origin, kann die Kurve vervollständigt, und die Werte von ΔH_{cal} , ΔH_{vH} und T_m ermittelt werden.

1.15.2 Begriffsdefinitionen

1. Wärmekapazität

$$\text{Wärmekapazität} = \frac{\text{Zugeführte Wärmemenge}}{\text{Temperaturanstieg}} \quad C = \frac{q}{\Delta T} \quad \text{Gleichung (7)}$$

1. EINLEITUNG

wobei C die Wärmekapazität, q die zugeführte Wärmemenge, und ΔT der Temperaturanstieg ist. Jede Substanz hat eine bestimmte Wärmekapazität. Dieser Wert hängt auch von der Stoffmenge ab.

Spezifische Wärmekapazität: $C_s = C/m \text{ (JK}^{-1}\text{g}^{-1}\text{)}$

Molare Wärmekapazität: $C_m = C/n \text{ (JK}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{)}$

2. Innere Energie

Die innere Energie U wird auch als Gesamtenergie bezeichnet und entspricht der Summe aller kinetischen und potenziellen Energiebeiträge der Atome, Ionen und Moleküle eines Systems. Die innere Energie eines isolierten Systems ist konstant.

In der Regel ist die Gesamtenergie eines Systems nicht bekannt, aber die Energieänderungen ΔU sind problemlos messbar:

$$\Delta U = w + q \quad \text{Gleichung (8)}$$

Bei einer isothermen Expansion eines idealen Gases ändert sich U nicht, da der Energieverlust in Form von Arbeit (w) als Wärme (q) zugeführt wird (siehe Abbildung 1-5):

$$q = -w \quad \text{und} \quad \Delta U = 0$$

(Gerhard Ecker, Wien Feb. 2005 Physikalische Chemie)

3. Die Enthalpie

Üblicherweise laufen chemische Reaktionen in offenen Gefäßen, d.h. bei konstantem Druck und nicht bei konstantem Volumen ab. Bei konstantem Druck ist die Enthalpieänderung eines Systems gleich der übertragenen Wärmemenge.

1. EINLEITUNG

Die exothermen Reaktionen führen zu einer Enthalpieabnahme. Die endothermen Reaktionen bewirken eine Enthalpiezunahme.

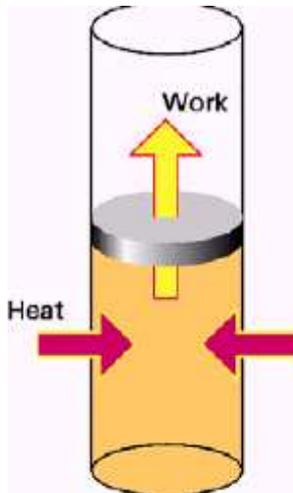


Abbildung 1-6. Arbeit und Wärme

4. Entropie

Die Änderung der Entropie einer Substanz entspricht dem Quotienten aus der Energie, die der Substanz in Form von Wärme reversibel zugeführt wird, und der Temperatur, bei der dieser Prozess abläuft:

$$\Delta S = \frac{q_{rev}}{T} \quad \text{Gleichung (9)}$$

Die Wärme (q) ist die ungerichtete Form von Energie; Die Arbeit (w) ist die gerichtete Form von Energie.

5. Hydrophobe Interaktion

Hydrophobe Interaktionen sind eine Erscheinungsform der Wasserstoffbindungseigenschaften des Wassers. Ausgehend von der empirischen Beobachtung, dass unpolare Moleküle schlecht

1. EINLEITUNG

lösbar in Wasser sind, kann diese Interaktion wahrscheinlich am besten veranschaulicht werden als eine abstoßende Interaktion zwischen unpolaren Gruppen und Wasser. Dies erfolgt, ehe eine direkte Attraktion zwischen diesen Gruppen eintritt. Unpolare, hydrophobe Gruppen im Wasser tendieren dazu, sich zusammenzuballen. Ursache dafür ist ihre Abstoßung gegen Wasser. Eine direkte Affinität der Gruppen zueinander ist nicht nötig. Die Thermodynamik dieser Interaktion ist interessant. Ausgehend von Studien kleiner unpolarer Moleküle ist die Abtrennung von zwei hydrophoben Gruppen im Wasser ein exothermer Prozess. Anders gesagt, obwohl generell Arbeit benötigt wird, um solche Gruppen abzutrennen, wird Wärme in diesem Prozess abgegeben. Dies ist meistens ein Zeichen struktureller Umgestaltung von Wassermolekülen an ihrer molekularen Kontaktfläche. Diesem exothermen Effekt wirkt eine signifikante und thermodynamisch ungünstige Abnahme der Entropie entgegen, die auch den Lösungsmitteln eine strukturelle Umgestaltung zuordnet. Der umgekehrte Prozess, bei dem die Bildung der „hydrophoben Bindung“ von unpolaren Gruppen erfolgt, ist somit „Entropie treibend“ und passiert spontan, selbst wenn er endotherm ist. Enthalpie oder Wärme solcher Prozesse sind auch charakteristisch temperaturabhängig (ΔC_p -Effekt), und damit der starke Beweis für die Rolle solcher Interaktionen bei der Protein-Faltung.

1.16 AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit war es, die Thermostabilitätseigenschaften der L-HicDH zu untersuchen und ein rationales Protein-Design zur Erhöhung der Thermostabilität der L-HicDH anhand eines Thermostabilitätsprogrammes (Leven 1999) zu erstellen.

Die Thermostabilitätseigenschaften der L-HicDH sollten durch kalorimetrische Methoden bei verschiedenen Bedingungen untersucht werden, um dadurch eine optimale Thermostabilitätsbedingung zu finden. In der L-HicDH sollten einige gerichtete Aminosäureaustausche anhand eines Thermostabilitäts-Vorhersage-Programms und anhand rationaler Überlegungen hergestellt werden, die gegenüber dem Wild-Typ eine erhöhte Thermostabilität aufweisen, ohne dass sie in ihrer enzymatischen Aktivität beeinträchtigt werden. Durch die Mutationsexperimente und die kalorimetrischen Untersuchungen sollte ein Überblick über die Energetik der Thermostabilität der L-HicDH und ihrer Mutanten erzeugt werden und die praktische Anwendungsmöglichkeit des Thermostabilitätsprogrammes geprüft werden.

Zur Charakterisierung spezifischer biomolekularer Wechselwirkungen und biologischer Aktivität ist die Kenntnis von thermodynamischen Parametern erforderlich. Daher ist ein Schwerpunkt dieser Arbeit, die thermodynamischen Parameter der L-HicDH zu bestimmen, um die Stabilität der L-HicDH zu charakterisieren.

Proteinstabilität hat zwei Aspekte. Eine ist die konformationale Stabilität (Thermodynamik) und die andere ist die kinetische Stabilität. Schmelzpunkt oder Mittelpunkt der Übergangstemperatur (T_m), Gleichgewichtskonstante (K) und kalorimetrische Enthalpie-Änderung ΔH sind die thermodynamischen Parameter der konformationalen Stabilität. Für die Charakterisierung der kinetischen Stabilität sollte die Aktivierungsenergie des thermal induzierten Denaturierungsprozesses ermittelt werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 2-1. Verwendete Geräte

Technik	Geräte	Firma
Chromatographie	Ni-NTA-Agarose Säule (selbe gepackt) Suoerdex 200HR 10/60 Säule	Qiagen Pharmacia Biotech
Elektrophorese	Power Pac 200	BioRad
Gelphotographie	Photo-Print CN08	LTF
DNA-Sequenzierung	ABIPRISM 310	PE Applied Biosystems
Inkubator	Schüttelinkubator Certomat BS-1 Schüttelinkubator Model G 25 Brutschrank Function line Heizblock HB-130	B.Braun Biotech Int. New Brunswick Sci. Heraeus Unitek
PCR	Mastercycler 5330 (plus)	Eppendorf
pH-Meter	766 Calimatic pH-Elektrode Typ Nr. 6280	Knick Schott-Geräte (Hofheim)
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
Zentrifugen	RC 3B Plus und RC 5B Plus 5417C mit Rotor F45-30-11	Sorvall Eppendorf

2. MATERIAL UND METHODEN

	5810R mit Rotor F34-6-38 Biofuge Pico Z 383 K mit Rotor 220.78 V02	Eppendorf Heraeus Hermle
Isothermale Titerationskalorimetrie	VP-ITC	MicroCal, LLC Northampton, MA, USA
Differentielle <i>Scanning</i> - Kalorimetrie	VP-DSC	MicroCal, LLC Northampton, MA, USA
<i>Circular Dichroism</i> (CD)	JASCO Spectropolarimeter J-715 Version	JASCO, Inc Japan
Ultrafiltrationsröhrchen	Amicon Ultra PL-10 device	Amicon/Milipore
Zellyse	French Pressure Cell Press	Sim-Aminco Spec. Ins.
Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator	H+P (Oberschleissheim)
Reinstwasseranlage	Seralpur DELTA UV	USF Seral

2.1.2 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad zur Analyse und wurden von den Firmen Merk, Sigma, Fluka, Aldrich und Roche bezogen. Restriktionsenzyme und ihre Reaktionspuffer, Vent DNA-Polymerase, T4-DNA Ligase, Klenow Enzym, DNA-Marker stammen von der Firma New England Biolabbs (NEB). Die Oligonukleotide wurden bei Sigma angefertigt. Der SmaI-Linker wurde von der Firma GIBCOBRL bezogen. Ihre Sequenzen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Das Wasser stammt aus einer Reinstwasseranlage und hat eine Leitfähigkeit von 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

2.1.3 Verwendete Puffer

Puffer für die Agarosegelelektrophorese

2. MATERIAL UND METHODEN

TE-Puffer: 10mM Tris, 2mM EDTA, pH 8.0
TAE-Puffer (1×): 40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA
Probenauftragspuffer: 0,25% Bromphenol-blau, 0,25% Xylenecyanol FF, 30% Glycin in Wasser

Puffer für die Proteinreinigung

Lysispuffer: 50 mM Natriumphosphat, pH 7.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol
Waschpuffer: 50 mM Natriumphosphat, pH 7.0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol
Elutionspuffer: 50 mM Natriumphosphat, pH 7.0, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol

Puffer für die SDS-PAGE

SDS-Auftragspuffer: (4×): 8ml 60 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA;
2 ml β -Mercaptoethanol, 1 g SDS
4 mg Bromphenol-blau

SDS-Laufpuffer (NuPAGE MES SDS Laufpuffer): 50 mM MES
50 mM Tris/HCl
0,1% SDS
1 mM EDTA
pH 7,3

2.1.4 Bakterien, Plasmide und Medien

***E. coli*-Stämme:**

2. MATERIAL UND METHODEN

E. coli XL1-Blue: Stratagene, La Jolla, CA, USA, Bullock *et al.*, (Bullock *et al.*, 1987),

Genotyp: *resA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac F' [proAB lacI^qΔM15 Tn10 (Tet^r)]*

E. coli BL21(DE3): Novagen, Studier & Moffatt (Studier & Moffatt, 1986), Genotyp: F⁻ ompT gal hsdSb (*r_b⁻*, *m_b⁻*) dcm (DE3)

Plasmide:

Das Plasmid pET-3d wurde von der Firma Novagen bezogen.

Plasmid pET-LhicDH (siehe Anhang Teil 2) = Template für die Mutagenese

Das Plasmid pCHis-L-HicDH wurde von Shivani Chatterjee konstruiert (Chatterjee *et al.*, 2005).

Medien:

LB-Medium: 10 g Pepton, 5 g Heft-Extrakt, 10 g NaCl, 1 L H₂O, mit 5 M NaOH auf pH 7.0 eingestellt und autoklaviert.

LB-Agarplatten: 500 ml LB-Medium mit 8 g Agar-Agar versetzt und steril autoklaviert; anschließend mit gewünschtem Antibiotikum versetzt. Sterile Petrischalen wurden damit unter der Sterilbank gegossen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1.5 Verwendete Oligonukleotiden

Tabelle 2-2. Oligonukleotide für die Mutagenese, Sequenzierung des Gens und Sequenzierung am Mutationsort

Primer für die Mutagenese	N72F: 5'-CGTGCGCTTCCAAGA <u>AC</u> GCCATTGCGTCTTGG- 3' 5'-CCAAGACGCAATGGCGT <u>TT</u> CTTGGAAGCGCACG- 3' E114L: 5'-GCTGCTGGTAAACTTCAAC <u>AG</u> AGCAAAACGGTCA CCGG- 3' 5'-CCGGTGACCGTTTTGCT <u>CT</u> GTTGAAGTTTACCAG CAGC- 3' G126A: 5'-CCAGATTCCTTCAAGTTTGT <u>AG</u> CGACTGATTGCAC CATGC- 3' 5'-GCATGGTGCAATCAGTC <u>G</u> CTACAAACTTGAAGG AATCTGG- 3' D184E : 5'-CAGAACGTGGATCCAAT <u>T</u> CAAACGCCTCACC AACTG-3` 5'-CAGTTGGTGAGGCGTTT <u>G</u> AATTGGATCCACG TTCTG-3` G244E : 5'-CATAACTCGTGTAGCCCTTT <u>T</u> CATTCAAGACCG TGAAGCC- 3` 5'-GGCTTCACGGTCTTGAAT <u>G</u> AAAAGGGCTACACG AGTTATG- 3` G251A : 5'-GCTGACGTTGCAAC <u>AG</u> CATAACTCGTGTAGCCC- 3` 5'-GGGCTACACGAGTTAT <u>G</u> CTGTTGCAACGTCAGC- 3` E270M : 5'-GCGACGATTTGAGACAACCAAC <u>A</u> TAGCATGCGC GTCAGCC- 3` 5'-GGCTGACGCGCATGCT <u>A</u> TGTTGGTTGTCTCAA
---------------------------	---

2. MATERIAL UND METHODEN

	<p style="text-align: center;">TCGTCGC- 3`</p> <p>D302E : 5`-CATCCGTCGTCAATTCAAGCGTCGTTTCTGC- 3` 5`-GCAGAAACGACGCTTGAATTGACGACGGATG- 3`</p> <p>T305E : 5`-GCTTTTCTTGCTCATCTTCCGTCAAATCAAGCG TCGTTTCTGCC- 3` 5`-GGCAGAAACGACGCTTGATTTGACGGAAGATGA GCAAGAAAAGC- 3`</p> <p>D327K : 5`-GGATCCCCCGGGAGAGTGTTTTACAATTC GTCG- 3` 5`-CGACGAAATTGTGAAAACACTCTCCCGGGG GATCC- 3`</p>
Primer für die Sequenzierung des Gens	<p>Primer 1 : 5`-GCTGATGCTGATGTTGTG- 3`</p> <p>Primer 2 : 5`-CTGATTGCACCATGCTGC- 3`</p> <p>Primer 3 : 5`-GCACGGTAACTACAATTC- 3`</p> <p>T7-Promotor: 5`-TAATACGACTCACTATAGG- 3`</p> <p>T7-Terminator: 5`-GCTAGTTATTGCTCAGCG- 3`</p>
Primer für die Sequenzierung am Mutationsort	<p>seq pHL6-2: 5`-CTGGGGAACATCAAGTTGC- 3`</p> <p>seq pHL6-3: 5`-CGGCCATCGAAGAGGAAGC- 3`</p> <p>T7-Promotor: 5`-TAATACGACTCACTATAGG- 3`</p> <p>T7-Terminator: 5`-GCTAGTTATTGCTCAGCG- 3`</p>
Primer für die Einführung der NcoI- und SmaI-site in L-HicDH Gen	<p>L-Hic-Start: 5`- CAATTTGGGGGATACCATGGCACA- 3`</p> <p>L-Hic-Stop: 5`- CCACTTTTTGTCCCGGGAGAGTGATCC- 3`</p>
SmaI-Linker	5`- d (pCCCCGGGG) – 3`

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1.6 Kits

Tabelle 2-3. Verwendete Kits

Kits	Firma
GFX™ Micro Plasmid Prep Kit	amersham pharmacia biotech
QIAGEN Plasmid Midi Kit (25)	QIAGEN
Big Dye Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit	PE Applied Biosystem
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
NukleoBond Plasmid Purification Kit	Macherey-Nagel
Nucleotrap®	Macherey-Nagel

2. MATERIAL UND METHODEN

2.2. Methoden

2.2.1 Konstruktion des Vektors und Anpassung des Gens

2.2.1.1 Transformation und Präparation des Plasmids pET-SmaI:

0,44µg des pET-3d Plasmids wurde mittels Hitzeschock in 300µl kompetente *E. Coli* XL1-blue Zellen transformiert und durch Vorkultur und Übernachtkultur vermehrt. Das Plasmid wurde mit dem Nukleobond® Kit der Firma Macherey-Nagel präpariert.

2.2.1.2. BamHI-Spaltung

10µg des Plasmids pET-3d wurden mit 60 U *Bam*HI, 5µl NEB-Puffer 2 und 0.5µl BSA in einem Gesamtvolumen von 50µl versetzt. Der Ansatz wurde bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

2.2.1.3. Klenow-Fill-in

Die überhängenden Enden des Plasmids wurden mittels *Klenow*-Enzym aufgefüllt. Dazu wurde das gespaltene Plasmid mit 10 U *Klenow*-Enzym und dNTP-Mix (Endkonzentration 33 µM) versetzt und bei 25°C für 15 min. inkubiert. Anschließend wurde 1µl EDTA (0.5M) zugegeben und die Reaktion bei 75°C abgestoppt. Der Gesamtansatz wurde auf einem Agarose-Gel aufgetragen und die Bande des Fragmentes aus dem Gel mit Hilfe des *Nucleotrap*® Kits nach Herstellerangaben isoliert.

2.2.1.4 Ligation des aufgefüllten Fragments und des SmaI-Linkers

10µl des aufgefüllten Fragments wurden mit 1µl *Sma*I-Linker (1µg/µl), 1 U T4-DNA Ligase und T4-DNA Ligasepuffer in einem Volumen von 15µl gemischt und bei RT drei Stunden inkubiert. Dadurch entsteht eine *Sma*I/*Xma*I-site, welche von 2 *Bam*HI-sites flankiert wird.

2. MATERIAL UND METHODEN

Anschließend wurden 5µl dieses Ansatzes in 100µl *E. coli* XL1-blue kompetente Zellen durch Hitzeschock-Methode transformiert. Der Transformationsansatz wurde auf einer LB/Amp-Agarplatte ausgestrichen. Der nun veränderte Vektor wird in der weiteren Arbeit unter dem Namen pET-SmaI geführt.

2.2.1.5 Mini-Präparation von pET-SmaI

Es wurden 20 Kolonien auf der Transformationsplatte ausgewählt und in 200 ml LB/Amp Medium über Nacht vermehrt. Mittels alkalischer Lyse wurden Minipräparationen der Plasmid-DNAs durchgeführt, und mit *PstI-SmaI*-Spaltung wurde auf Insertion des SmaI-Linkers geprüft. Ein Plasmid mit dem erwarteten Restriktionsmuster wurde mit SmaI nachgespalten und religiert. Es folgte eine Sequenzierung der Ligationsprodukte und ein Klon mit einfacher Linkerinsertion wurde ausgewählt.

2.2.1.6 Einführung der *NcoI-site* und *SmaI-site* in das Gen

Durch PCR mit *mismatch* Primern wurde eine *NcoI-site* am Anfang des Gens und eine *SmaI-site* am Ende des Gens eingeführt. Durch die Einführung der *SmaI-site* wurde das *Stop-Codon* des Gens gleichzeitig eliminiert. Das *L-HicDH*-Gen, das in den Vektor pET-3d subkloniert werden soll, ist zuvor von Lerch (Lerch, 1989) aus der genomischen DNA von *Lactobacillus casei* in den Vektor pHL6 überführt worden. Das Plasmid (5 µg) wurde mit 1µl *L-Hic-Start*-Oligonukleotid (100 pM/µl), *L-Hic-Stop*-Oligonukleotid (100 pM/µl), 2 µl MgSO₄ (100 mM), und 10µl Reaktionspuffer (10x) versetzt (Plasmidkarte siehe Anhang 3). Der Ansatz wurde mit Wasser auf 99 µl aufgefüllt. Nach der initialen Denaturierung wurde 1 µl *Vent Polymerase* zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben. Das PCR Programm ist folgendermaßen aufgebaut:

- (1) 95°C 2 min.
- (2) 95°C 40 sek.

2. MATERIAL UND METHODEN

(3) 57°C 20 sek.

(4) 72°C 1 min. von (2)- bis (4): →35 Zyklen

(5) 8°C 00

Das amplifizierte Fragment wurde durch Ethanolfällung konzentriert und mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *XmaI* doppelt verdaut.

2.2.1.7 Inserierung des Gens in den Vektor

Das von *NcoI* und *SmaI*-sites flankierte L-HicDH-Gen wurde in den ebenfalls *NcoI* und *SmaI* geschnittenen Vektor pET-SmaI inseriert. Aufgrund seiner komplementären überhängenden Enden hybridisierte das nachgeschnittene PCR-Fragment mit den Enden des Vektors. Der Ligationsansatz (9µl Fragment, 4µl Vektor, 1µl T4-DNA-Ligase, und 3.5µl T4-DNA-Ligasepuffer) wurde bei 25°C 30 min. inkubiert. Anschließend wurde dieser Ligationsansatz in XL1-blue transformiert und präparierte Plasmid-DNA wurden durch Restriktionsanalyse auf die Insertion des Gens hin untersucht.

2.2.2 Plasmidpräparation

Das Plasmid pETL-HicDH (Wildtyp) und seine Varianten wurden in *E. coli* XL1-blue transformiert. 3ml Amp/LB-Medium wurden mit einem Klon aus der Amp/LB-Platte angeimpft und nach ca. 7 stündiger Inkubation bei 37°C wurden 2 ml dieser Vorkultur in eine 200 ml Hauptkultur gegeben. Die Hauptkultur wurde über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Übernachtskultur wurde bei 4°C, 4500 rpm 20 min. zentrifugiert. Die Plasmide wurden mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit (25) präpariert. Das Qiagen Plasmid-Präparationsprotokoll basiert auf der modifizierten alkalischen Lyse. Das Plasmid bindet an das QIAGEN Anionenaustauscherharz unter geeigneten „Niedrigsalz“- und pH-Bedingungen und kann durch „Hochsalz“-Puffer eluiert werden. Anschließend wurde das Eluat durch

2. MATERIAL UND METHODEN

Isopropanolfällung konzentriert und entsalzt. Das getrocknete Plasmid wurde in Wasser aufgenommen.

2.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA-Lösung kann photometrisch bei 260 nm bestimmt werden. Zur Überprüfung der Reinheit der DNA-Lösung wurde auch die Extinktion bei 280 nm bestimmt. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen so genannten Reinheitsquotienten E_{260}/E_{280} von 1.8- 2,0.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse des DNA-Fragments wurde ein 1% -iges Agarosegel mit dem Laufpuffer TAE (x1 konzentriert) verwendet. Die DNA-Fragmente werden mit Ethidiumbromid fluoreszierend markiert, angefärbt und fotografiert.

Der DNA-Größenmarker ist der Marker "Lambda DNA-*BstE* II Digest" von *New England Biolabs*.

2.2.5 Herstellung kompetenter Zellen

Kompetente Zellen (*E. coli* XL1-Blue und *E. coli* BL21(DE3)) wurden nach dem Protokoll von Cohen *et al.* hergestellt (Cohen *et al.*, 1972). Es werden jeweils 100 ml LB-Medium mit 1 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Bei einer OD_{550} von 0,5 bis 0,8 werden die Zellen bei 4000 rpm in der Zentrifuge RC 5B Plus (Firma Sorvall) 10 min abzentrifugiert. Die Pellets werden in 12,5 ml eiskaltem 0,1 M $CaCl_2$ resuspendiert und 45 min auf Eis inkubiert. Nach 10 min. Zentrifugation bei 4000 rpm werden die Zellen in 2 ml

2. MATERIAL UND METHODEN

eiskaltem 0,1 M CaCl₂ und 15% Glycerol (v/v) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wird in Aliquots (je 100µl) aufgeteilt und bei -80°C eingefroren.

2.2.6 Hitzeschock-Transformation

Die bei -80°C aufbewahrten kompetenten Zellen wurden auf Eis 10 min aufgetaut. 100 µl kompetente Zellen wurden mit Plasmid-Lösung (ca. 50 -100 ng Plasmid) gemischt und 20 min. auf Eis inkubiert. Nach einer Minute Inkubation bei 42°C wurde der Ansatz 3 min. auf Eis gekühlt. Es wurden 400µl LB-Medium hinzugegeben und der Ansatz eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf einer LB/Amp-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.7 Gerichtete Mutagenese

Die gerichtete Mutagenese des L-HicDH Gens im Plasmid pL-HicDH wurde mit dem „*QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit*“ nach Angaben des Herstellers Stratagene durchgeführt. In einer Mutagenese-Reaktion wurden 20 ng pL-HicDH als *template*, 125 ng der beiden zueinander komplementären Mutagenese-Primer, 2.5 U Pfu-Turbo-DNA-Polymerase, 2.5µl dNTP Mix (10 mM) und 5 µl Reaktionspuffer (10X) gegeben. Der Reaktionsansatz wurde in einem PCR-Reaktionsgefäß mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Die DNA wurde initial bei 95°C 30 sek. denaturiert. Anschließend wurden 18 Zyklen (30 sek. bei 95°C, 1 min. bei 55°C, 11 min. bei 68°C) in der PCR-Maschine durchlaufen. Dabei binden die Primer an die komplementären Sequenzen der Plasmid-DNA und werden durch die Polymerase verlängert. Durch die Replikation beider Plasmidstränge entstehen ungeschlossene zirkuläre Doppelstränge. Aufgrund ihrer Methylierung können die Elternstränge des mutierten Plasmides durch die Restriktionsendonuklease DpnI gespalten werden. Nach der

2. MATERIAL UND METHODEN

Transformation in die XL-1 Blue superkompetenten Zellen werden die Einzelstrangbrüche der mutierten Plasmide *in vivo* geschlossen.

Beim Primer-Design für die gerichtete Mutagenese wurde die folgende Faktoren berücksichtigt:

- (1) Beide Primer müssen die erwartete Mutation enthalten, sind zueinander komplementär und binden an die komplementären Stränge des Plasmids.
- (2) Die Primer sollen 25 bis 45 Basen lang sein und die Schmelztemperatur (T_m) des Primers soll höher als 78°C sein oder 78°C betragen.
- (3) Die erwartete Mutation soll in der Mitte des Primers liegen und an beiden Seiten 10 bis 15 Basen Komplementarität zum *Template* aufweisen.
- (4) Die *E. coli* Aminosäure *Codon-Usage* muss bei der Einführung der mutierten Codons berücksichtigt werden.

2.2.8 Glycerin-Dauerkulturen

In einem Dauerkulturröhrchen wurden $300\mu\text{l}$ LB-Medium/Glycerin (1:1 v/v) mit $700\mu\text{l}$ Kultur (Zellen in Medium) versetzt und bei -80°C eingefroren.

2.2.9 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgte mit farbstoffmarkierten Didesoxynukleotiden und thermostabiler DNA Polymerase nach der Methode von Sanger *et al.* (Sanger *et al.*, 1977). In einem Reaktionsansatz wurden ca. $4\mu\text{g}$ DNA, 10 pmol Sequenzierungsprimer, $4\mu\text{l}$ PCR-Ready-Mix und deionisiertes und autoklaviertes Wasser in einem Gesamtvolumen von $11\mu\text{l}$ gemischt. Die Sequenzierungsreaktion wurde in einer PCR-Maschine mit folgendem Programm: 15 sek. bei 95°C , 15 sek. bei 55°C , 4 min. bei 60°C mit 30 Zyklen durchgeführt. Die PCR-Ansätze wurden mit Ethanol gefällt: Die Ansätze wurden mit $85\mu\text{l}$ Wasser, $10\mu\text{l}$ 3M Natriumacetat pH 5.2 und $250\mu\text{l}$ 100%-ige Ethanol leicht gemischt

2. MATERIAL UND METHODEN

und bei Raumtemperatur 30 min. mit 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 300µl 70%-igem Ethanol gewaschen und erneut mit 14000 rpm 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet an der Luft getrocknet, in 25µl TSR-Puffer (Template Supression Reagent, Sequencer Kit, Applied Biosystems) aufgenommen und in Sequenzierungsgefäße überführt. Die Sequenzieransätze wurden vor der Sequenzierung eine Minute bei 95°C denaturiert und in dem Sequenzierer (ABIPRISM 310) über Kapillargelelektrophorese analysiert.

Die Sequenzierungen zur Identifizierung der Mutanten wurden mit den Primern: seq pHL6-2; Primer: seq pHL6-3 und T7-Promotor, T7-Terminator durchgeführt.

Die Sequenzierungen des gesamten Gens wurden mit den Primern: Primer 1, Primer 2 und Primer 3 in beiden Richtungen vollständig und überlappend durchgeführt.

2.2.10 Expressionsplasmid

Das Expressionsplasmid pCHis-L-HicDH wurde von Shivani Chatterjee konstruiert, wobei ein Fusionsprotein entstand. Am C-Terminus befindet sich eine Aminosäuresequenz EXXYXQS/G, die von der rekombinanten *tabacco etch virus* stammenden Protease (rTEV) erkannt wird. Sie ermöglicht die Abspaltung des folgenden Hexahistidin-Tags.

2.2.11 T7-Expressionssystem

Das T7-RNA-Polymerase-Promotor-System eignet sich besonders zur Überexpression von Genen in *Escherichia coli* (Tabor and Richardson, 1985). Die T7-RNA-Polymerase ist sehr aktiv und sehr selektiv für ihren eigenen Promotor. Im Expressionsvektor pET-3d wird das zu exprimierende Gen unter die Kontrolle des T7-Promotor gestellt. Die Expression erfolgt im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3). Dieser Stamm trägt das Gen für die T7-RNA-Polymerase, welches der Kontrolle des IPTG-induzierbaren *lac*-Promotors unterliegt. Die Induktion der Expression

2. MATERIAL UND METHODEN

der T7-RNA-Polymerase und somit auch des rekombinanten Gens erfolgt durch Zugabe von IPTG (Studier and Moffatt, 1986; Studier *et al.*, 1990).

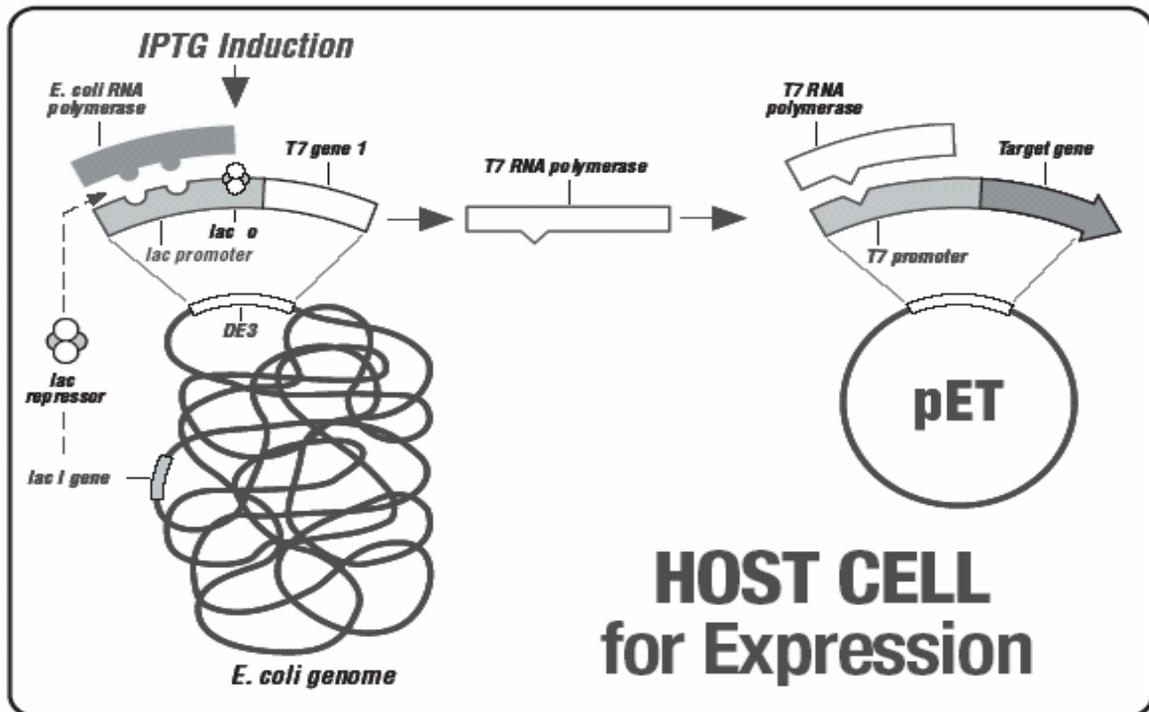


Abbildung 2-1. T7-Expressionssystem (Bildquelle: Novagen) – In der Wirtszelle ist das Gen für die T7-RNA-Polymerase flankiert von DE3-DNA im Bakteriengenom inseriert. Entsprechend modifizierte Stämme sind an der Namensendung DE3 erkennbar. Nach der Induktion mit IPTG löst sich der *lac*-Repressor von der Operatorregion des Zielgens und des T7-RNA-Polymerasegens. Das Zielgen wird dann durch die T7-RNA-Polymerase transkribiert werden.

2. 2. 12 Protein-Expression

Der *E. coli* Stamm BL21 (DE3) wurde für die Protein-Expression verwendet. Sterilisiertes LB-Medium (500 ml) wurde mit transformierten Zellen angeimpft und mit Ampicillin in einer

2. MATERIAL UND METHODEN

Konzentration von 150µg/ml versetzt. Dieser Expressionsansatz wurde bei 37°C im Schüttler mit 200 rpm inkubiert bis die Bakteriendichte einen OD₅₉₅ Wert zwischen 0,5 und 0,8 erreicht hatte. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase und die Protein-Expression wurde durch Zugabe von 500 µl einer 1 molaren Isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranosid Lösung (IPTG) induziert, so dass die Endkonzentration von IPTG in der Expressionskultur 1 mM betrug. Die Kultur wurde weiterhin 3 bis 4 Stunden inkubiert, um eine ausreichende Expression zu gewährleisten. Anschließend wurden die Bakterien 30 min bei 4500 rpm, 4°C abzentrifugiert und das Bakterienzellpellet bei -80°C eingefroren.

2.2.13 Zellaufschluss

Das Zellpellet wurde in entsprechendem Puffer resuspendiert und die Zellen wurden mittels „*French Cell Press*“ aufgeschlossen (1500 psi, 3 Durchläufe). Die aufgeschlossenen Zellen wurden sofort mit 13000 rpm, 4°C für 30 min zentrifugiert und die Proteine wurden aus dem Überstand unmittelbar nach der Zentrifugation gereinigt.

2.2.14 Proteinreinigung durch Metallchelate-Affinitätschromatographie

Die Metallchelate-Affinitätschromatographie (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC) beruht auf der Wechselwirkung von Cystein- oder Histidin-Seitenketten zu Übergangsmetallionen. Dies wird bei der rekombinanten Proteinexpression ausgenutzt, in dem Expressionsvektoren so konstruiert sind, dass sie sechs oder mehr Histidine an die zu exprimierenden Proteine C- oder N- Terminal fusionieren.

Die Reinigung der Fusionsproteine erfolgte unter Verwendung von Chelating Agarose, einer Chromatographie-Matrix mit NTA-Gruppen als Chelatbildnern und Ni²⁺ als Übergangsmetallionen. Nach Angabe des Herstellers wurde eine 5ml Ni-NTA-Agarose Säule mit der Chromatographie-Matrix aus Qiagen in einer leeren Einwegsäule selber gepackt. Die

2. MATERIAL UND METHODEN

lösliche Proteinfraction der entsprechenden Expressionszellen wurde mit einer Flussrate von 1ml/min auf eine vorher mit Lysispuffer äquilibrierten 5ml Ni-NTA-Agarose Säule aufgetragen. Die Säule wurde zunächst mit 20ml Lysispuffer und anschließend mit 20ml Waschpuffer gewaschen. Die Fusionsproteine wurden mit einem Elutionspuffer, der Imidazol, 250mM, enthält, eluiert. Regeneriert und gelagert wurde die Säule entsprechend den Angaben des Herstellers.

2.2.15 Aktivitätsbestimmung der L-HicDH und ihrer Varianten

Die Enzymaktivität von L-HicDH wurde nach der Beschreibung von Schütte *et al.* (Schütte *et al.*, 1984) durch photometrische Messung bestimmt. Das Volumen des Testansatzes wurde auf ein Mikroküvettenvolumen reduziert. Der Testansatz enthält 1ml Testpuffer (0.1M Kaliumphosphatpuffer, pH7.0), 40µl Substratlösung (3.6mg/ml 2-Ketoisokaproat in Testpuffer) sowie 20µl NADH-Lösung (10mg/ml in Wasser). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20µl Enzym gestartet. Man mischt den Testansatz sofort. Die Extinktionsänderung wurde bei der Testtemperatur von 30°C über 1 min. verfolgt.

Das Pharmacia Biotech UV/Visible Spectrophotometer verfolgt automatisch die durch den Umsatz des NADH zu NAD⁺ verursachte Abnahme der Absorption bei 340 nm (1cm Lichtweg).

Die Enzymaktivität wurde mit folgender Formel berechnet:

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

V_{Test}	Testvolumen (1060µl)
V_{Enzym}	Enzymvolumen (20µl)
f	Verdünnungsfaktor

2. MATERIAL UND METHODEN

ΔE_{340}	Extinktionsänderung bei 340 nm
ϵ_{NAD}	molarer Extinktionskoeffizient für NADH/NAD ⁺ (6.22 M ⁻¹ cm ⁻¹)

Die Quarzküvette wurde durch die *Temperature Control Unit* auf 30°C temperiert. Nach dem Start wurden automatisch 12 OD₃₄₀-Messungen im Abstand von 5 Sekunden vorgenommen. Die Daten wurden mit dem Programmpaket SWIFT (Pharmacia) ausgewertet. Alle Messungen wurden 3-mal mit unabhängigen Verdünnungen durchgeführt und der Mittelwert bestimmt.

1 Unit [U] ist definiert als die Enzymmenge, die 1 μmol Substrat unter Verbrauch von 1 μmol NADH in 1 Minute bei 30°C umsetzt. Bezieht man die Enzymaktivität auf eine Volumeneinheit, spricht man von der Volumenaktivität. Ihre Einheit ist [U/L] oder [U/ml]. Bezieht man die Aktivität auf die Enzymmenge erhält man die spezifische Aktivität [U/mg].

2.2.16 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe des „Standard Assays“ von BioRad nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Der Assay enthält das Reagenz Coomassie Brilliant Blue, das mit dem Protein einen gefärbten Komplex bildet, welcher bei 595nm absorbiert. Der Komplexbildung verläuft linear mit zunehmender Proteinkonzentration. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer Eichkurve mit Rinderserumalbumin. Es wurden 200 μl BioRad-Reagenz mit 800 μl Proteinlösung gemischt und nach 5 min Inkubation bei RT die Extinktion bei 595nm gegen einen Blindwert, bestehend aus 200 μl BioRad-Reagenz mit 800 μl H₂O, spektralphotometrisch gemessen. Für eine genaue Messung der Proteinkonzentration werden 3 Bestimmungen durchgeführt, aus dem Mittelwert wurde das Ergebnis berechnet.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.2.17 SDS-PAGE

Das NuPAGE[®] Bis-Tris Elektrophorese System ist ein vorgefertigtes pH neutrales, diskontinuierliches SDS-Polyacrylamid mini-Gel System. Der neutrale pH-Wert von 7,0 während der Elektrophorese gewährleistet eine maximale Stabilität sowohl der Proteine als auch der Gelmatrix und bietet eine bessere Bandenauflösung. Die Konzentration von Acrylamid im Sammelgel beträgt 4% und im Trenngel 4-12%.

Probenvorbereitung:

-Proben (3× Volumen) werden mit 1 Volumen des SDS-Auftragspuffers (4×) gemischt und anschließend bei 95°C für 5 min erhitzt;

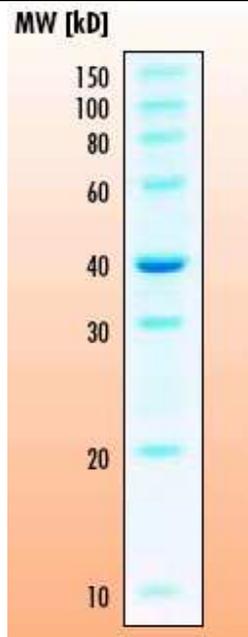
-optimale Endkonzentration von Proteinen: 0.03 mg/ml, benötigt werden 20µl für Gelauftrag

-Proteinmarker: Standard Roti-Mark 10-150 (Firma: Roth)

Trennungsbedingungen: Spannung 200 V
Stromstärke 120 mA
Laufzeit: ca. 30 min

Nach der Trennung wurden die Gele mit Coomassieblau-Färbelösung (50% Ethanol; 10% Essigsäure; 0,1% Coomassieblau) gefärbt, anschließend mit einer Lösung (8% Essigsäure, 25% Ethanol) gewaschen. Als Proteinmarker wurde der Standard Roti[®]-Mark 10-150 (Firma: Roth) verwendet.

2. MATERIAL UND METHODEN



Roti®-Mark 10-150 besteht aus einem Set gentechnisch hergestellter Proteine mit definierten, regelmäßigen Molekulargewichten. Die Proteine sind nicht glykosiliert und zeigen sehr einheitliches Laufverhalten. Roti®-Mark 10-150 eignet sich daher hervorragend zur Molekulargewichtsbestimmung. Die Proteinkonzentrationen sind so eingestellt, dass bei vorschriftsgemäßem Auftrag sehr scharfe und deutliche Banden erzielt werden. Im Minigelsystem (0,75mm Dicke) ist bei Coomassie-Färbung die Auftragsmenge von 5µl ausreichend.

Abbildung 2-2. Roti®-Mark 10-150 von der Firma Roth

2.2.18 Konzentrierung und Umpufferung von Proteinen

Für die Konzentrierung und Umpufferung der Proteine wurden die Ultrafiltrationsröhrchen (Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices) der Firma Amicon Millipore verwendet. Die Ultrafiltrationsröhrchen haben einen *Cut-off*-Wert von 10,000 KDa und die Filtration erfolgt durch Zentrifugation bei 4°C und 4000 × g.

2.2.19 Enzym-Assay

Die Wild-Typ L-HicDH und ihre Mutanten können durch die katalytische Konstanten K_M , K_{cat} und K_{cat}/K_M näher charakterisiert werden. Die Werte ergeben sich aus der klassischen Michaelis-Menten-Kinetik. Diese geht davon aus, dass bei konstanter Enzymmenge die

2. MATERIAL UND METHODEN

Substratkonzentration schrittweise angehoben wird. Mit dem Anstieg des Enzym-Substrat-Komplexes (ES) nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit (initialer Substratumsatz) zu. Wird die Reaktionsgeschwindigkeit im Koordinatensystem als Funktion der Substratkonzentration aufgetragen, erhält man eine hyperbolische Kurve, die sich asymptotisch der Maximalgeschwindigkeit V_{\max} nähert. Bei maximalem initialen Substratumsatz liegt die gesamte Enzymmenge als Enzym-Substrat-Komplex vor. Die dann bestehende Substratsättigung bedingt, dass die Geschwindigkeit nur durch eine Erhöhung der Enzymkonzentration zu steigern ist. Die Konzentration des Substrats, die zur Sättigung führt, ist für jedes Enzym verschieden. Da sich jedoch die experimentelle Bestimmung der Sättigungskonzentration als schwierig erwies, führten Michaelis und Menten (1913) den standardisierten Wert K_M ein. Der auch als Michaeliskonstante bezeichnete K_M -Wert entspricht der Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit. Er stellt somit die Substratkonzentration dar, bei der die Hälfte des vorhandenen Enzyms mit Substrat gesättigt ist.

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Michaelis Menten Gleichung})$$

Mit Hilfe des K_M -Werts lassen sich Aussagen über die Substrataffinität des Enzyms treffen. Ist der K_M -Wert hoch, bedeutet es, dass eine große Substratmenge zur Sättigung des Enzyms erforderlich ist. Das Enzym besitzt eine geringe Affinität zum Substrat. Analog ergibt sich für ein starkes Bindungsbestreben zwischen Enzym und Substrat ein geringer K_M -Wert.

Bestimmung kinetischer Parameter

Die K_M - und V_{\max} -Werte für die L-HicDH und ihrer Mutanten werden aus den experimentell ermittelten Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Substratkonzentrationen durch das Lineweaver-Burk-Diagramm ermittelt, in dem die Michaelis-Menten-Gleichung linearisiert ist. Jede Messung wurde dreimal gemessen und die kinetischen Parameter wurden aus dem Mittelwert der drei Messungen ermittelt.

2. MATERIAL UND METHODEN

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.

$$K_{\text{cat}} = \frac{V_{\max} \text{ MW}}{[E_0] \cdot 60} \quad [\text{S}^{-1}]$$

wobei M_W das Molekulargewicht (Monomer), $[E_0]$ die Enzymkonzentration ist.

Das Verhältnis K_{cat} / K_M ist ein Maß für die katalytische Effektivität des Enzyms bzgl. des jeweiligen Substrates. K_M kann verwendet werden, um die Spezifität eines Enzyms zu bewerten. Kleine K_M -Werte bedeuten feste Bindung; große K_M -Werte bedeuten schwache Bindung. Der K_{cat} -Wert ist eine Geschwindigkeitskonstante erster Ordnung, die $ES \rightarrow E + P$ beschreibt, und ist bekannt als die Wechselzahl, weil er die Anzahl von Substrat-Molekülen beschreibt, die von einem Molekül Enzym pro Sekunde unter optimalen Bedingungen umgesetzt werden kann. Der K_{cat} -Wert ist somit ein direktes Maß des Umsatzes von Substrat zum Produkt unter optimalen Bedingungen, d.h. bei Substrat-gesättigtem Enzym.

Die Umsatzrate einer Reaktion ist von ihrem langsamsten Schritt begrenzt, daher ist der K_{cat} gleich der Geschwindigkeitskonstante des limitierenden Schritts.

Das Verhältnis von K_{cat} / K_M ist ein geeignetes Maß für die Enzym-Effizienz; ein „gutes“ Enzym hat große K_{cat} / K_M -Werte und dies resultiert aus einem großen K_{cat} -Wert und einem kleinem K_M -Wert.

2.2.20 Kalorimetrische Messungen

Die Anzahl kalorimetrischer Messungen an biologischen Macromolekülen hat in den letzten Jahren aufgrund der Entwicklung und der Verfügbarkeit hoch empfindlicher Messgeräte auf dem Gebiet der *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) und der *Isothermal Titration Calorimetry* (ITC) erheblich zugenommen. Gerade diese direkt gemessenen thermodynamischen Daten sind wichtige Ergänzungen zu den Daten, die durch andere

2. MATERIAL UND METHODEN

Techniken wie optische Absorption, Zirculardichroismus und Magnetischer Kernresonanzspektroskopie (NMR) auf indirektem Wege zugänglich sind.

Jede chemische Reaktion ist mit der Aufnahme oder Abgabe von Wärme (freie Enthalpie ΔH der Reaktion) verbunden. Dies gilt für Reaktionen in denen kovalente Bindungen, nicht kovalente Bindungen (H-Brücken, Dipol-Dipol), Ionisierungsprozesse (Deprotonierung), Hydratisierung, Verdünnungen usw. beteiligt sind. Die Wärmeabgabe/-aufnahme während einer Reaktion kann als Temperaturveränderung gemessen werden. Die Enthalpieänderung ΔH von nicht kovalenten Reaktionen ist in der Regel gering und proportional zur Anzahl (molare Konzentration \times Volumen) der reagierenden Moleküle. In der Biochemie arbeitet man oft mit kleinen Mengen (mg) von Proteinen, und die molaren Mengen sind entsprechend niedrig (10-100 nmol). Daher ist die entstehende Wärmeänderung auch entsprechend gering. Mit modernen Mikrokalorimetern ist es möglich eine geringe Wärmeänderung bis zu $1\mu^\circ\text{C}$ zu messen ($1\mu\text{cal}$ = Wärmemenge die notwendig ist um 1 ml Wasser um 10^{-6}°C zu erwärmen!)

2.2.20.1 Differentielle *scanning*-Kalorimetrie (DSC)

Differentielle *scanning*-Kalorimeter (DSC) sind weitverbreitet bei der Bestimmung der Thermodynamik von Phasenübergang und Konformationsänderung in biologischen Systemen, bezogen auf Proteine, Nukleinsäuren, und Lipide. DSC überwacht die Temperaturunterschiede zwischen zwei Gefäßen als eine Funktion der Temperatur mit einer bestimmten Scanrate, eins von beiden enthält die biologische Lösung und das andere Gefäß enthält eine *Reference*-Lösung. Aus einem einzelnen differentialen kalorimetrischen Scan ist es möglich, im Prinzip, die folgenden thermodynamischen Informationen für einen konformationalen Übergang zu bestimmen: die Übergangstemperatur, die Übergangsenthalpie, die Wärmekapazitätsänderung des Übergangs, die Kooperativität, und die Stoichiometrie des Übergangs. Irreversible Übergänge in biologischen Systemen, die kinetisch kontrolliert sind, können auch mit DSC untersucht werden. Geschwindigkeitskonstante und Aktivierungsenergie für die Entstehung des

2. MATERIAL UND METHODEN

finalen irreversiblen Zustands können aus der kinetisch kontrollierten Änderung bestimmt werden.

2.2.20.2. Beschreibung des Gerätes

Für die Untersuchung der thermodynamischen Eigenschaft der L-HicDH und der Thermostabilität der L-HicDH und ihrer Mutanten wurde das Gerät VP-DSC-Microkalorimeter (Firma: MicroCal) verwendet (Abbildung 2-3). Probe und Referenz wurden vor der Messung unter Vakuum vollständig entgast. Die Daten wurden mit dem Auswertungsprogramm (*DSC Data Anylsis in Origin 7.0.; Microcal Incorporated*) ausgewertet.



Abbildung 2-3. Das Gerät VP-DSC-Microkalorimeter der Firma MicroCal

2.2.20.3. DSC Grundlagen

Abbildung 2-4 zeigt den typischen Aufbau eines DSC Instrumentes. In einem DSC Experiment wird eine Protein-Lösung (üblicherweise 1mg/ml oder geringer in modernen Instrumenten)

2. MATERIAL UND METHODEN

mit konstanter Rate in der Kalorimeter Zelle aufgeheizt. Neben der Zelle ist eine identische Referenz-Zelle, die nur Puffer enthält. Der Unterschied der Wärme-Energie-Aufnahme zwischen der Proben-Zelle und der Referenz-Zelle, die für die Erhaltung der gleichen Temperatur benötigt wird, entspricht der Differenz der Wärme-Kapazität. Aus der Differenz der Wärmekapazitäten ergeben sich die Informationen über die Energetik der thermal induzierten Prozessen in der Probe. Es können nur dann genaue thermodynamische Daten ermittelt werden, wenn die Konzentration der Proben exakt gemessen wurde.

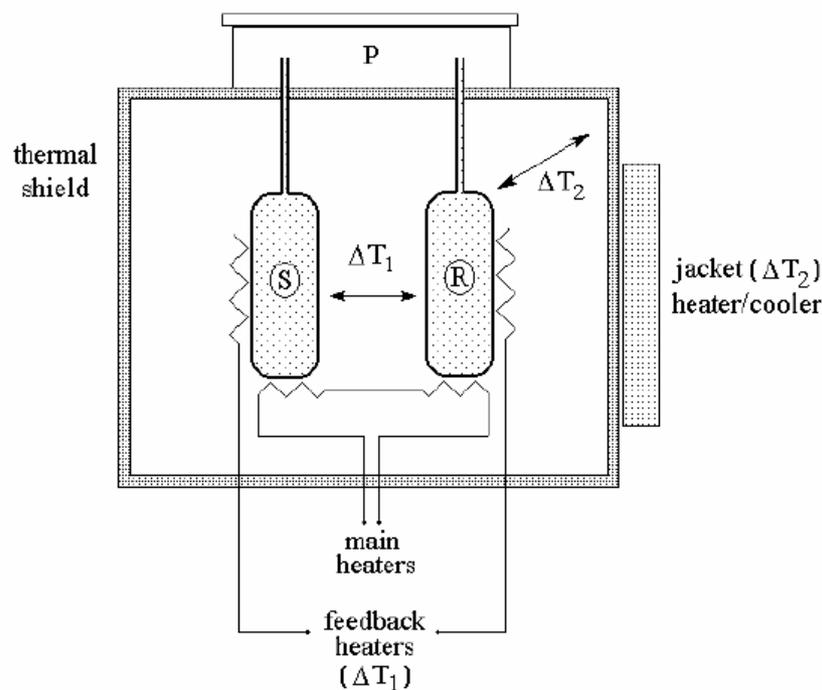


Abbildung 2-4. Aufbau eines typischen DSC (adaptiert aus Alan Cooper, 2000). Zwei identische *Sample* (S) und *Reference* (R) Zelle (jeweils 2ml Volume), die jeweils Protein-Lösung und Puffer enthalten, sind unter erhöhtem atmosphärischen Druck (P) festgehalten. Bei der *up-scan* Operation ist Strom zu dem Zentralheizer weitergeleitet worden, um die Temperatur der Zellen mit konstanter Rate zu erhöhen, während das Erfassen der Temperatur-Differenz (ΔT_1) zwischen Sample und Referenz Zelle und zwischen Zelle und der umliegenden adiabatischen Hülle (ΔT_2) erfolgt. Das Feedback durch den „Hüllen-Heizer“ (jacket heater) ermöglicht der thermalen Schild-Temperatur, sich der Temperatur der Zellen anzupassen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.2.20.4 Durchführung der DSC-Messungen

Die Besonderheit des Gerätes:

Temperatur-Spanne: -10°C bis 130°C

Maximal Scanrate für Erhitzung: 90°C/h

Maximal Scanrate für Abkühlung: 60°C/h

Pufferauswahl

1. Der Puffer soll einen pKa innerhalb von 0.5-1.0 Einheit des Arbeits pH haben.
2. Um die hervorgerufene Wärme zu minimieren, soll der Puffer eine niedrige Ionisationsenthalpie haben, daher sind der Phosphat-Puffer, der Citrat-Puffer und der Acetat-Puffer für die DSC-Messung gut geeignet.
3. Weil DSC-Messungen in einer breiten Temperatur-Spanne durchgeführt werden, soll der pH-Wert des Puffers eine geringe Temperatur-Abhängigkeit haben.

Minimum Volumen/Konzentrationen

Man braucht ~1.2 mL der Lösung um die Zelle aufzufüllen.

Typische Protein-Probenkonzentrationen sind 0.2-2.0 mg/mL.

Proben Vorbereitung:

Proteinlösung und Referenz-Lösung müssen das identische Lösungsmittel enthalten. Die Abgleichung des Lösungsmittels kann einfach durch vollständige Dialyse von Proteinen gegen den Referenz-Puffer erfolgen. Der Referenz-Puffer sollte für die Spülung der Zelle und zur Probenverdünnung bewahrt werden. Die sichtbaren Partikel müssen filtriert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

Nach der Vorbereitung der Lösungen sollen ihre pH-Werte sorgfältig kontrolliert werden. Wenn sie größer als 0.05 pH Einheit abweichen, dann muss man die Lösungen nachträglich einstellen.

Lösungskonzentrationen sollen nach der finalen Vorbereitung bestimmt werden. Exakte Bestimmung der thermodynamischen Parameter ist nur möglich, wenn die Konzentrationen genau bekannt sind.

Einheiten

Die SI-Einheit für Energie ist Joule (J). Somit ist die herkömmliche Einheit KJ/Mol für molare thermodynamische Energie wie zum Beispiel Enthalpie (H), oder freie Energie (G) und J/Mol K für molare Entropie (S) oder Wärmekapazität (Cp). Aber in den USA verwendet man noch das ältere System von Einheiten, das auf der Kalorie basiert und das differentielle *scanning*-Kalorimeter der Firma Microcal ist in diesen Einheiten kalibriert.

Zur Umrechnung:

1 Kalorie = 4.184 J ; die Gas-Konstante $R = 1.987 \text{ Kal Mol}^{-1} \text{ K}^{-1} = 8.314 \text{ J} \cdot \text{Mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

2.2.20.5. Analyse der DSC-Daten

Die DSC-Daten wurden mit der Origin-Software (version 7.0, Microcal Software Inc., USA) analysiert. Die Temperatur am Mittelpunkt der Entfaltungsübergänge (T_m), die kalorimetrische Enthalpie (ΔH_{cal}) und die van't-Hoff-Enthalpie (ΔH_{vh}) der Denaturierung wurden ermittelt. Eine Base-Linie zwischen Pre- und Post-Übergangsregionen wurde aus dem Endotherme subtrahiert, um die Peakfläche zu berechnen, die der kalorimetrischen Enthalpie der Entfaltung entspricht. Die entsprechende van't-Hoff-Enthalpie wurde mit folgender Gleichung berechnet:

$$\Delta H_{vh} = 4RT_m^2 C_{p, .max} / \Delta H_{cal}$$

2. MATERIAL UND METHODEN

wobei $C_{p,max}$ die maximal Peak-Höhe in der Peakfläche des Übergangs, und T_m die Temperatur an $C_{p,max}$ repräsentiert. Die cooperative Ratio (CR) ist durch die Beziehung $CR = \Delta H_{vh} / \Delta H_{cal}$ definiert und wurde verwendet, um die Anzahl der Ablaufschritte in dem Entfaltungsprozess abzuschätzen.

T_m (tatsächlich die Übergangstemperatur) ist definiert als die Temperatur, bei der 50% der Proteinmoleküle entfaltet sind. In einem idealen dynamisch reversiblen *2-state* Gleichgewicht ist T_m die Temperatur, bei der jedes Protein-Molekül die Hälfte seiner Zeit gefaltet und die andere Hälfte ungefaltet vorliegt. Ein hoher T_m -Wert weist darauf hin, dass das Protein eine hohe Stabilität besitzt.

Die calorimetrische Enthalpie (ΔH_{cal}) ist die integrierte Fläche unter dem Thermogram-Peak, der die Wärme-Energie-Aufnahme der Probe beim Übergang abbildet. Ein großes ΔH_{cal} bedeutet, dass eine große Menge Energie für die Entfaltung benötigt wird, sowie, dass das Protein im nativen Zustand eine hohe strukturelle Stabilität besitzt.

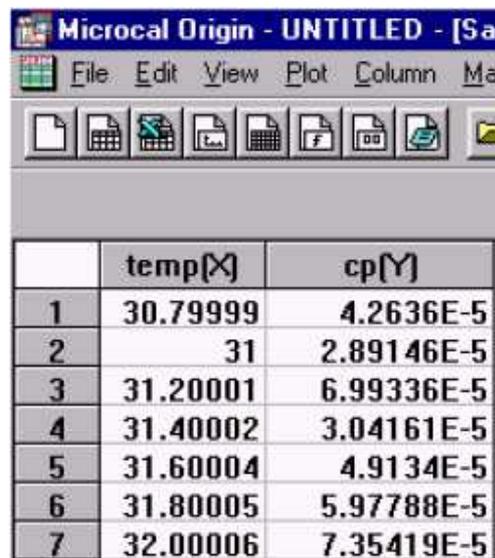
Die van't Hoff Enthalpie (ΔH_{vH}) ist eine Größe zur Abschätzung der Enthalpie des Übergangs und basiert auf einem vermuteten Modell für den Übergangsprozess. Diese Größe ist unabhängig von der Menge an Protein. Es ist ein Maß der Kooperativität des Übergangs: je größer die Kooperativität, desto schärfer der Übergang und desto größer ΔH_{vH} . Ein breiter Übergang liefert hingegen ein niedriges ΔH_{vH} .

Die experimentell bestimmte Enthalpie-Änderung von Proteinentfaltungen repräsentiert die Summe der Enthalpien, die durch die Hydratation der nun Wasser exponierten polaren und unpolaren Gruppen, der Unterbrechung der van-der-Waals-Interaktionen zwischen polaren und unpolaren Gruppen und dem Zerschneiden der Wasserstoffbindungen zustande kommt (Privalov and Makhatadze, 1992; Privalov and Makhatadze, 1993).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.2.20.6. Parameter für die Ermittlung der Aktivierungsenergie

Nach Literaturangaben wurden die Temperaturpunkten im Bereich von $T_m - 2 \leq T \leq T_m + 2$ ausgewählt (Stirpe *et al.*, 2005 und Idakieva *et al.*, 2005). Der Parameter C_p wurde aus den Rohdaten im *worksheet* abgelesen (Abbildung 2-5). Die Parameter Q_t und Q wurden aus der Peakfläche integriert (Abbildung 2-6 und Abbildung 2-7).



	temp[X]	cp[Y]
1	30.79999	4.2636E-5
2	31	2.89146E-5
3	31.20001	6.99336E-5
4	31.40002	3.04161E-5
5	31.60004	4.9134E-5
6	31.80005	5.97788E-5
7	32.00006	7.35419E-5

Abbildung 2-5. DSC-Daten in *worksheet*

2. MATERIAL UND METHODEN

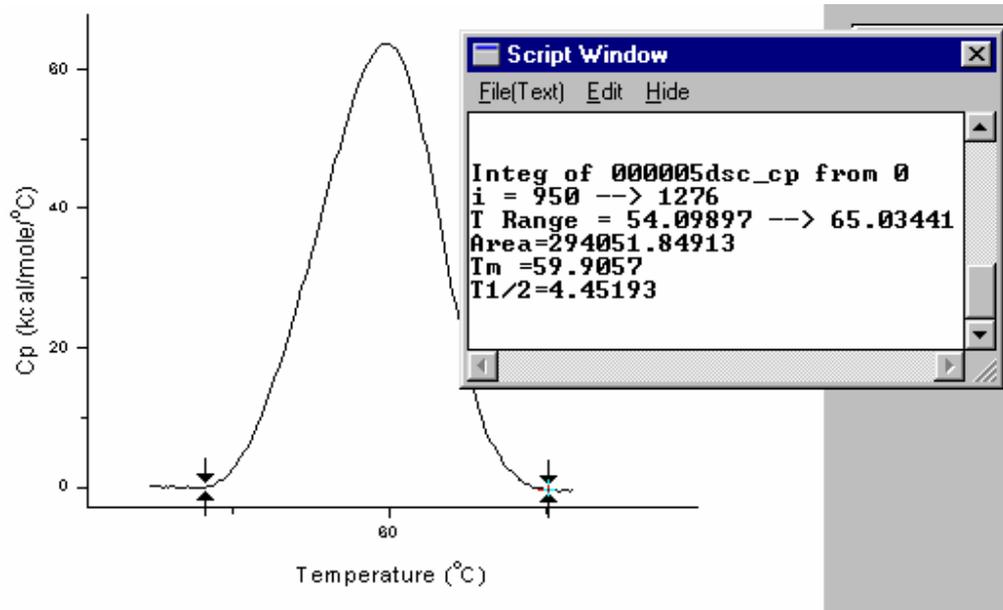


Abbildung 2-6. Die totale Wärme-Energie-Aufnahme der Probe wird durch die Fläche unter dem Thermogram-Peak integriert (Area = Q_t).

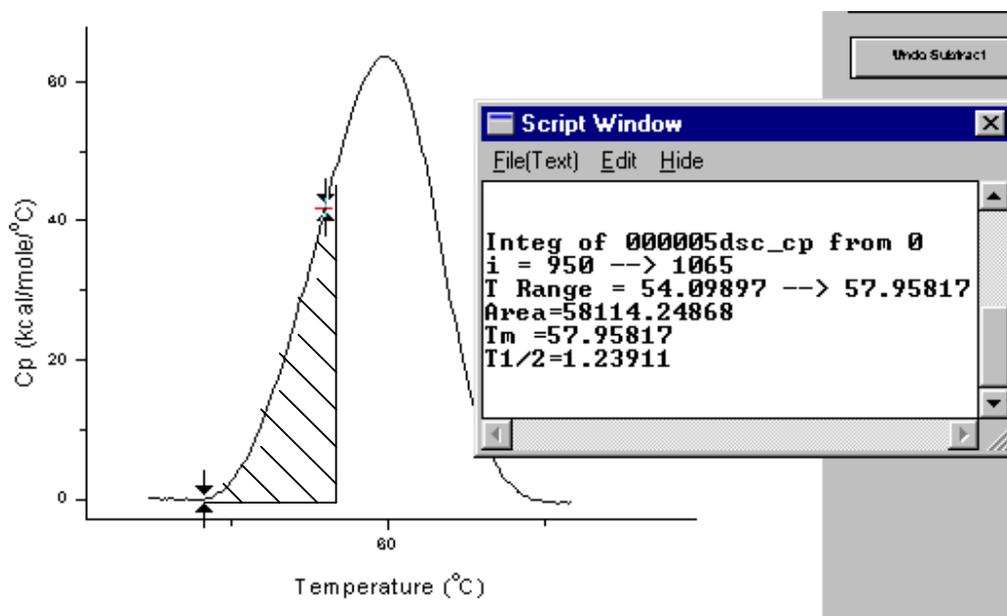


Abbildung 2-7. Die Wärme-Energie-Aufnahme (Q) der Probe bei einer bestimmten Temperatur (T) wird durch die Fläche unter dem Thermogram-Peak integriert (Area = Q ; schraffierter Bereich)

2. MATERIAL UND METHODEN

2.2.21 Schmelzpunktbestimmung mit *Circular-Dichroismus* (CD)

Mit einem circularen Dichroismus-Spektrometer (CD-Gerät) kann man den Schmelzpunkt von Proteinen bestimmen. Bei dieser Schmelzpunktanalyse misst man das CD-Signal einer Proteinlösung bei einer bestimmten Wellenlänge. Dabei nutzt man meist die Auflösung der α -Helix-Struktur des Proteins bei 222 nm ($\alpha\beta$ -Protein). Die Existenz eines isodichoren Punktes zeigt, dass es sich bei einem solchen Übergang um einen direkten Übergang zwischen zwei Zuständen handelt.

Die Messungen erfolgen in 5mM Kaliumphosphat-Puffer. Der pH-Wert liegt bei 7,0 und die Proteinkonzentration beträgt 0.2 mg/ml. Es werden 500 μ l Probe in einer 1 mm breiten Küvette gemessen. Das CD-Signal wird bei 222 nm verfolgt. Den Schmelzpunkt erhält man aus dem Maximum der ersten Ableitung des CD-Spektrums. Das „Daten-Geräusch“ wurde mit der *Jasco j-715 software-Spectra Analyse* geglättet.

Folgende Parameter wurden eingestellt:

Temperaturbereich:	20 – 80°C	Temperaturgradient:	60°C/h
Empfindlichkeit:	100 mdeg	Auflösung:	0,1 °C
Bandweite:	1 nm	Wellenlänge:	222 nm
Response:	1 s	Stickstofffluss:	5 L/min

3. ERGEBNISSE

3.1 Konstruktion von Plasmiden zur Expression des L-HicDH –Wildtyp Proteins und von L-HicDH-Varianten

3.1.1 Konstruktion des Vektors pET-SmaI

Zur Konstruktion eines L-HicDH-Expressionsvektors wurde das Plasmid pET-3d mit BamHI gespalten. Das Analytische Gel zeigt die entsprechende Bande des BamHI gespaltenen pET-3d.

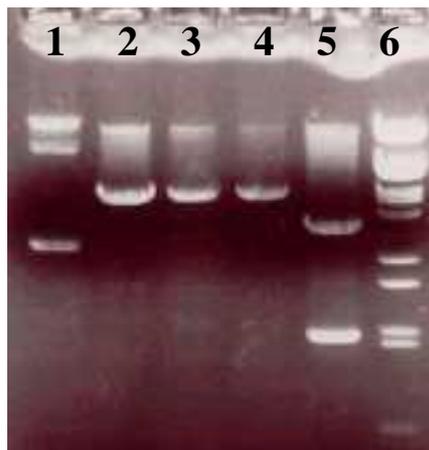


Abbildung 3-1. Analytisches Gel für das Plasmid pET-3d. Spur 1: ungespaltenes pET-3d; Spur 2: mit NcoI gespaltenes pET-3d; Spur 3: mit BamHI gespaltenes pET-3d; Spur 4: mit HindIII gespaltenes pET-3d; Spur 5: mit XbaI und PstI gespaltenes pET-3d; Spur 6: DNA Marker: λ /BstEII.

3. ERGEBNISSE

Die BamHI geschnittene pET-3d-DNA wurde mit Klenow-Enzym zur Erzeugung von „aufgefüllten“ DNA-Enden inkubiert und nach der Gelelektrophorese aus der ausgeschnittenen Agarose-Bande gel-extrahiert (Nucleotrap Kit).

Das so gereinigte Vektorfragment wurde mit einem SmaI-Linker der Sequenz d(pCCCCGGGG) ligiert. Das entstandene Plasmid wurde als pET-SmaI bezeichnet.



Abbildung 3-2. PstI-SmaI-Spaltung des Plasmides pET-SmaI. M: DNA-Größenmarker λ /BstEII; P: Plasmid-SmaI.

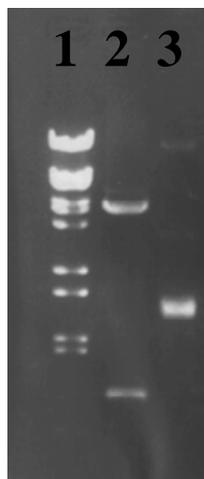
Wie auf dem Gel zu sehen ist, erbrachte eine Spaltung mit PstI und SmaI das erwünschte Spaltungsmuster.

3.1.2 Insertion des L-HicDH-Gens in das Plasmid pET-SmaI

Das L-HicDH Gen wurde durch PCR *mismatch* Primer amplifiziert, wodurch das Gen am Anfang eine NcoI-*site* und am Ende eine SmaI/XmaI-*site* erhielt. Das Stop-Codon des Gens wurde durch Einführung der SmaI/XmaI-*site* eliminiert.

3. ERGEBNISSE

Das SmaI-/NcoI-geschnittene L-HicDH-Genfragment wurde in den SmaI-/NcoI-geschnittenen Vektor pET-SmaI inseriert. Das resultierende Plasmid pET-L-HicDH wurde sequenziert. Ein analytisches Gel zeigt, dass der Einbau des L-HicDH-Gens in den Vektor gelungen ist. Der Vektor ist 5540 bps groß und das Restriktionsmuster zeigt die erwarteten Banden (4.5 kb und 1kb. Plasmidkarte siehe Anhang).



Spur1: DNA-Größenmarker;

Spur2: mit NcoI und
SmaI geschnittene Transkriptionsvektor

Spur3: ungeschnittene Transkriptionsvektor
(pET-L-HicDH)

Abbildung 3-3. Analytisches Gel: NcoI-/SmaI-Spaltung des Plasmides pET-L-HicDH

Das Sequenzierungsergebnis des L-HicDH Gens zeigt, dass die Konstruktion des Vektors, die Anpassungen des Gens durch PCR und die Subklonierung gelungen sind (siehe Anhang).

3.1.3 Insertion der L-HicDH-Varianten in den Vektor pC-His

Da sich die Expression und Aufreinigung der L-HicDH mittels des Vektors pET-L-HicDH und dem Reinigungsprotokoll nach (Schütter *et al.*, 1984) als problematisch erwies, wurden

3. ERGEBNISSE

Vektoren zur C- und N-terminalen Fusion eines Hexahistidintags konstruiert (Chatterjee *et al.*, 2005). Da die Tetramer-Struktur der L-HicDH (Abbildung 1-2) darauf schließen lässt, dass der C-Terminus der Monomere frei zugänglich ist, wurde der Vektor pC-His zur C-terminalen Histag-Fusion ausgewählt. Durch die Anwesenheit einer Erkennungs-Sequenz für die Protease des „Tabacco etch virus = TEV“ macht dieser Expressionsvektor auch die Abspaltung des Hexahistidintags nach der Protein-Expression möglich.

3.2 Expression der L-HicDH und ihrer Varianten

3.2.1 Theoretisch ermittelte Protein-Parameter des L-HicDH-Wildtyp-Proteins

Die Protein-Parameter der L-HicDH mit C-terminalem Histag wurden mit dem Programm ProtParam von ExPASy berechnet.

Aminosäure-Sequenz der L-HicDH mit *C-terminal His-tag* und *TEV-site*:

1	11	21	31	41	51		
1	ARKIGIIGLG	NVGA AVAHGL	IAQGVADDYV	FIDANEAKVK	ADQIDFQDAM	ANLEAHGNIV	60
61	INDWAALADA	DVVISTLGNI	KLQDNPTGD	RFAELKFTSS	MVQSVGTNLK	ESGFHGVLVV	120
121	ISNPVDVITA	LFQHVTGFPA	HKVIGTGTLT	DTARMQRAVG	EAFDL DPRSV	SGYNLGEHGN	180
181	SQFVAWSTVR	VMGQPIVTLA	DAGDIDLAAI	EEEARKGGFT	VLNGKGYTSY	GVATSAIRIA	240
241	KAVMADAHAE	LVVSNRRDDM	GMYSYPALII	GRDGVLAETT	LDLTTDEQEK	LLQSRDYIQQ	300
301	RFDEIVDTLG	TSRENLYFQG	GSHHHHHH				

Anzahl von Aminosäuren: 328

Molekulargewicht: 35269.5

Theoretischer pI: 5.06

Aminosäurezusammensetzung:

Ala (A)	37	11.3%
Arg (R)	14	4.3%
Asn (N)	14	4.3%
Asp (D)	27	8.2%
Cys (C)	0	0.0%

3. ERGEBNISSE

Gln (Q)	15	4.6%
Glu (E)	15	4.6%
Gly (G)	32	9.8%
His (H)	13	4.0%
Ile (I)	22	6.7%
Leu (L)	26	7.9%
Lys (K)	11	3.4%
Met (M)	7	2.1%
Phe (F)	12	3.7%
Pro (P)	6	1.8%
Ser (S)	17	5.2%
Thr (T)	20	6.1%
Trp (W)	2	0.6%
Tyr (Y)	8	2.4%
Val (V)	30	9.1%
Asx (B)	0	0.0%
Glx (Z)	0	0.0%
Xaa (X)	0	0.0%

Gesamte Anzahl von negativ geladenen Reste (Asp + Glu): 42
Gesamte Anzahl von positiv geladenen Reste (Arg + Lys): 25

3.2.2 Mutationsplanung und Herstellung der L-HicDH Varianten

Um die Thermostabilität durch Punktmutationen der L-HicDH zu erhöhen, wurden die unten aufgeführten Mutanten ausgewählt. Dabei wurde das Proteinstrukturanalyseprogramm BRAGI und die Programme zur Berechnung der Aminosäure-Atom-Potentiale (AAP) und Torsionswinkel-Potentiale (TWP) benutzt. Als Strukturmodell wurde die L-HicDH Struktur (Niefind *et al*, 1995, protein data bank accession file: 1HYH) verwendet. Alle ausgewählten Positionen liegen außerhalb des aktiven Zentrums, so dass die Wechselwirkung mit dem Substrat so gering wie möglich beeinflusst wird.

3. ERGEBNISSE

Tabelle 3-1. Aminosäure-Atom-Potentiale und Torsionswinkel-Potential nach Austausch von Aminosäuren in den Mutanten

Nr.	Mutante	AAP nach Austausch	AAP-Bereiche der 20 Aminosäuren	TWP nach Austausch	TWP-Bereich der 20 Aminosäuren
1	G244E	-59.82	-59.82 ↔ 242,53	-1,32	-1,38 ↔ 0
2	D327K	-78.79	-78.79 ↔ 649.88	-0,10	-0,29 ↔ 1,06
3	G126A	-3.17	-3.17 ↔ 54.29	-1,36	-1,36 ↔ 0
4	D302E	-29.59	-31.49 ↔ 323.26	0,60	0 ↔ 1,43
5	N72F	-209.63	-209.63 ↔ 67.81	0,59	0 ↔ 2,06
6	E270M	-207.35	-218.41 ↔ 11.03	0,08	-0,48 ↔ 1,11
7	D184E	-25.26	-25.26 ↔ 302.04	1,08	-2,12 ↔ 11,62
8	T305E	-262.64	-274.41 ↔ 598.92	-0,81	-0,88 ↔ 0
9	G251A	-33.08	-145.80 ↔ 157.05	-1,27	-1,27 ↔ 0

Erläuterung:

Die Namensgebung der Mutanten richtet sich nach der Aminosäure, die ausgetauscht werden soll (erster Buchstabe), der entsprechenden Position, welche durch die Zahl angegeben wird, und der eingesetzten Aminosäure (zweiter Buchstabe).

Die Zahlen in der Spalte „AAP nach Austausch“ sind die Aminosäure-Atom-Potentiale von den eingesetzten Aminosäuren an dieser Position.

Mit dem AAP-Bereich der 20 Aminosäuren wird die Spannbreite der Aminosäure-Atom-Potentiale aller 20 Aminosäuren angegeben.

Je kleiner der Wert ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass der Aminosäureaustausch stabilisierend wirkt. Gleiches gilt für die Torsionswinkel-Potentiale.

3. ERGEBNISSE

Der TWP-Bereich der 20 Aminosäuren bezeichnet die Spannbreite von allen 20 Torsionswinkel-Potentialen an dieser Position.

Rationale Aspekte zur Planung von Mutanten mit erhöhter Thermostabilität

Nr.1: G244E

Das negativ geladene Glu 244 mit den Nachbarresten Lys 58, Lys 245 und Asp 62 bildet eine relativ hydrophile Umgebung. Die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen diesen geladenen Resten könnten die Thermostabilität der L-HicDH erhöhen. Das Aminosäure-Atom-Potential-Programm und das Torsionswinkel-Programm zeigen relativ gute Werte.

Nr.2: D327K

Das negativ geladene Asp 327 befindet sich am C-Terminus der α -Helix H (Nomenklatur siehe Karsten Niefind *et al* 1995) und der Austausch gegen das positiv geladene Lys könnte das Dipolmoment der α -Helix kompensieren. Auch das Aminosäure-Atom-Potential und Torsionswinkel-Programm zeigen günstige Werte.

Nr.3: G126A

Gly 126 befindet sich in der α -Helix D/E (Nomenklatur siehe Niefind *et al*). Glycin hat die Neigung wie Prolin *reverse turns* zu bilden. Alanin ist generell geeignet für α -Helices und in dieser hydrophoben Umgebung ist genug Platz vorhanden. Daher stabilisiert der Austausch die α -Helix D/E. Der Austausch zeigt auch ein günstiges Aminosäure-Atom- und Torsionswinkel-Potential.

Nr.4: D302E und Nr.7: D184E

Asp 302 und Asp 184 liegen auf der Oberfläche des Enzyms. Aufgrund der längeren Seitenkette von Glutamat gegenüber Aspartat wird die elektrostatische Wechselwirkung mit Arg 210 und Arg 292 im Oberflächenbereich des Enzyms erhöht. Bei beiden Aminosäure-

3. ERGEBNISSE

Austauschen ergeben sich günstige Aminosäure-Atom-Potentiale. Die Steigerung der elektrostatischen Wechselwirkung auf der Proteinoberfläche ist eine interessante und relativ neue Strategie, um die Thermostabilität des Proteins zu erhöhen.

Nr.5: N72F und Nr.6: E270M

Asn 72 und Glu 270 befinden sich im Kontaktbereich zwischen den Monomeren der L-HicDH. Phenylalanin und Methionin haben hydrophobe Seitenketten und die Aminosäuren-Austausche könnten durch die Erhöhung der Hydrophobizität im Kontakt-Bereich die Thermostabilität des Enzyms erhöhen. Beide Austausche haben gute Aminosäure-Atom-Potential Werte.

Nr.8: T305E

Das negativ geladene Glutamat kompensiert das Dipolmoment der α -Helix H und erhöht die Anzahl der geladenen Seitenketten auf dem Oberflächenbereich des Enzyms. Weiterhin bewirkt der Austausch verbesserte Werte für das Aminosäure-Atom-Potential und Torsionswinkel- Potential.

Nr.9: G251A

Glycin 251 liegt im Kontaktbereich zwischen den Monomeren der L-HicDH und in der α -Helix 3G. Alanin ist generell günstiger als Glycin in α -Helices und hat günstigere Aminosäure-Atom- und Torsionswinkel-Potential Werte auf dieser Position. Der vorhandene Platz ist ausreichend für den Austausch.

3. ERGEBNISSE

3.2.3 SDS-PAGE für Wild-Typ L-HicDH und ihrer Mutanten

Die Protein-Expression von Wild-Typ L-HicDH und ihrer Mutanten wurde mit SDS-PAGE kontrolliert. Das Gelfoto (Abbildung 3-4) zeigt, dass nahezu alle Proteine eine einzige Bande aufweisen und diese Ergebnisse als Reinheitskontrolle dienen können.

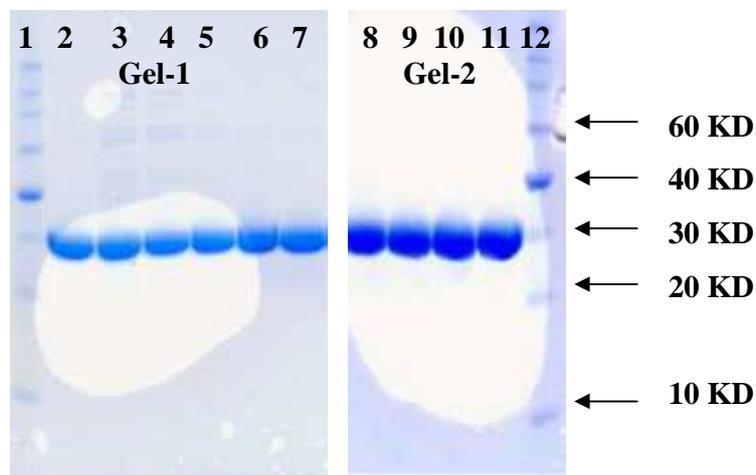


Abbildung 3-4. SDS-Polyacrylamidgele für die Wild-Typ L-HicDH und ihre Mutanten. **Gel-1:** Spur 1: Roti-Mark; Spur 2: Wild-Typ; Spur 3: Thr305Glu; Spur 4: Asp302Glu; Spur 5: Gly251Ala; Spur 6: Asp184Glu; Spur 7: Gly126Ala; **Gel-2:** Spur 8: Asp327Lys; Spur 9: Glu270Met; Spur 10: Gly244Glu; Spur 11: Asn72Phe; Spur 12: Roti-Mark. (Auftrag der Proteine in einer Konzentration von 30µg/Probe).

3.3 Enzymaktivität der L-HicDH und ihrer Varianten

3.3.1 Enzymaktivität der L-HicDH in Abhängigkeit von pH-Wert

3. ERGEBNISSE

Der Enzymassay wurde in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer bei 30°C bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Die Enzymaktivität der Wild-Typ L-HicDH ist in Abbildung 3-5 dargestellt. Abbildung 3-5 zeigt, dass die Aktivität der Wild-Typ L-HicDH ein pH-Optimum bei pH 7,5 hat und bei unter pH 5 oder über pH 9 einen erheblichen Aktivitätsverlust erleidet.

Tabelle 3-2. Enzymaktivität (spezifische Aktivität: U/mg) der Wild-Typ L-HicDH bei verschiedenen pH-Werten (Rohdaten siehe A.5 im Anhang)

pH-Wert	spezifische Aktivität: U/mg	pH-Wert	spezifische Aktivität: U/mg
5,0	34 ± 0,14	7,5	177 ± 0,41
5,5	40 ± 0,34	8,0	140 ± 0,30
6,0	60 ± 0,51	8,5	126 ± 0,62
6,5	96 ± 0,08	9,0	76 ± 0,75
7,0	169 ± 0,36		

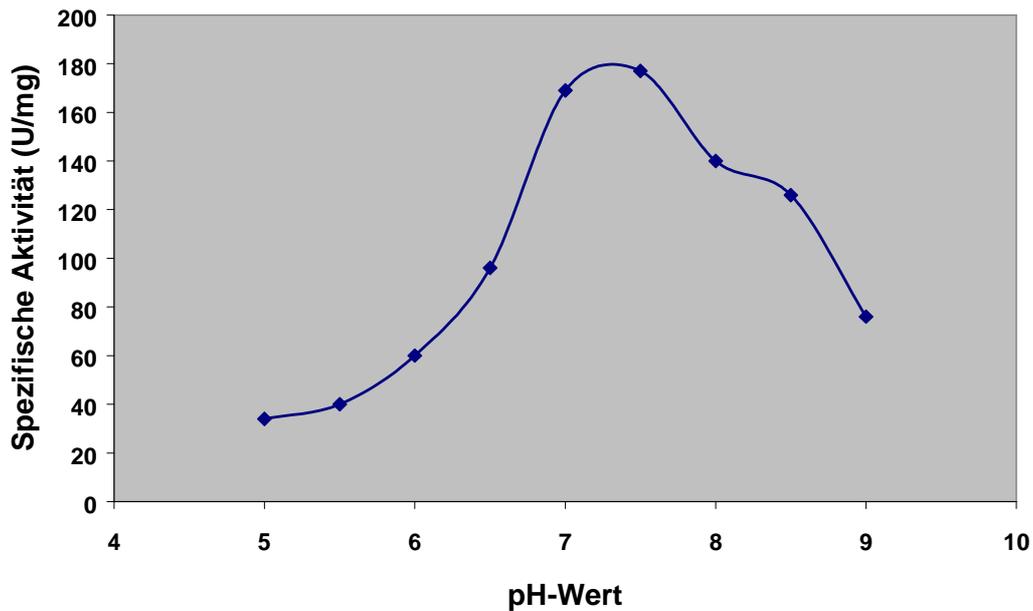


Abbildung 3-5. Enzymaktivitätskurve der Wild-Typ L-HicDH bei 30°C und verschiedenen pH-Werten

3.3.2 Enzymaktivität der L-HicDH in Abhängigkeit von der Temperatur

3. ERGEBNISSE

Der Enzymassay wurde in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.5 bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Die Enzymlösungen wurden bei den entsprechenden Temperaturen für 10 Minuten vorinkubiert. Der Enzymassay wurde in einer temperierten Küvette bei der entsprechenden Temperatur durchgeführt. Die Enzymaktivität von L-HicDH Wild-Typ ist in Abbildung 3-6 dargestellt. Abbildung 3-6 zeigt, dass die Aktivität der L-HicDH Wild-Typ ein Temperatur-Optimum bei 37°C hat und bei Temperatur über 42°C erheblichen Aktivitätsverlust erleidet.

Tabelle 3-3. Enzymaktivität (spezifische Aktivität: U/mg) der Wild-Typ L-HicDH bei verschiedenen Temperaturen (Rohdaten siehe **A. 5** im Anhang)

Temperatur	spezifische Aktivität	Temperatur	spezifische Aktivität
20°C	129 ± 1,38 U/mg	37°C	185 ± 2,10 U/mg
27°C	157 ± 2,10 U/mg	42°C	138 ± 0,70 U/mg
32°C	161 ± 1,88 U/mg	49°C	4 ± 0,014 U/mg

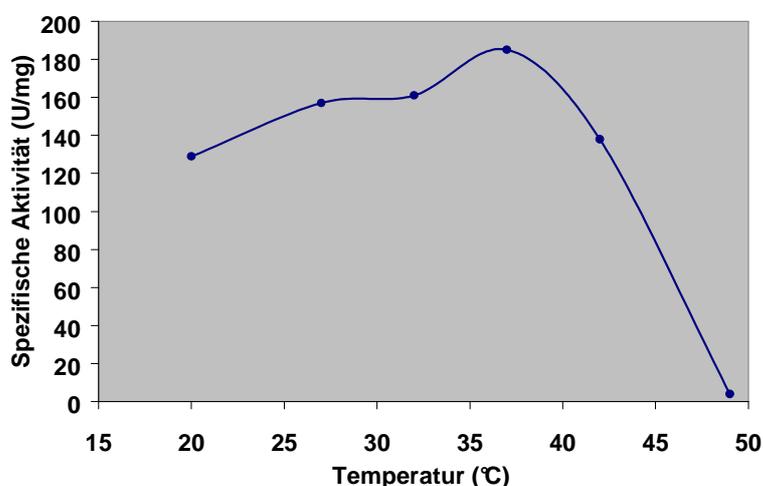


Abbildung 3-6. Enzymaktivitätskurve der Wild-Typ L-HicDH bei verschiedenen Temperaturen

3. ERGEBNISSE

3.3.3 Enzymaktivität (spezifische Aktivität in U/mg) der Wild-Typ L-HicDH und ihrer Varianten in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die Enzymaktivität der Wild-Typ L-HicDH und ihrer Mutanten ist abhängig von pH-Bedingungen. Die spezifische Aktivität der L-HicDH und ihrer Mutanten wurde bei pH 6,0, pH 7,0 und pH 8.0 gemessen.

Tabelle 3-4. Enzymaktivität (spezifische Aktivität: U/mg) der L-HicDH und ihrer Mutanten bei verschiedenen pH-Bedingungen (Rohdatenmaterial siehe **A. 5** im Anhang)

Enzym	bei pH 6.0	bei pH 7.0	bei pH 8.0
Wild-Typ	60 ± 0,51	169 ± 0,36	140 ± 0,30
Thr305Glu	24.2 ± 1,48	59.7 ± 0,42	54 ± 0,65
Asp184Glu	202 ± 2,10	184 ± 11,50	105 ± 6,40
Asp302Glu	163,9 ± 8,84	160,6 ± 10,20	98 ± 9,80
Gly251Ala	131 ± 1,15	167 ± 9,60	110 ± 3,90
Gly126Ala	148 ± 2,70	143 ± 2,70	83 ± 1,20
Asp327Lys	207,5 ± 5,28	202 ± 4,44	241 ± 14,20
Glu270Met	105,9 ± 8,06	182 ± 10,40	149 ± 11,40
Gly244Glu	133,4 ± 8,60	72,8 ± 7,70	1,4 ± 0,07
Asn72Phe	10,9 ± 0,70	3,2 ± 0,18	1,4 ± 0,30

Zum besseren Vergleich der Enzymaktivitäten von Wild-Typ und Mutanten werden in der folgenden Abbildung die Werte graphisch dargestellt. Die unterschiedlichen farbigen Säulen zeigen die Enzymaktivitäten bei unterschiedlichen pH-Bedingungen.

3. ERGEBNISSE

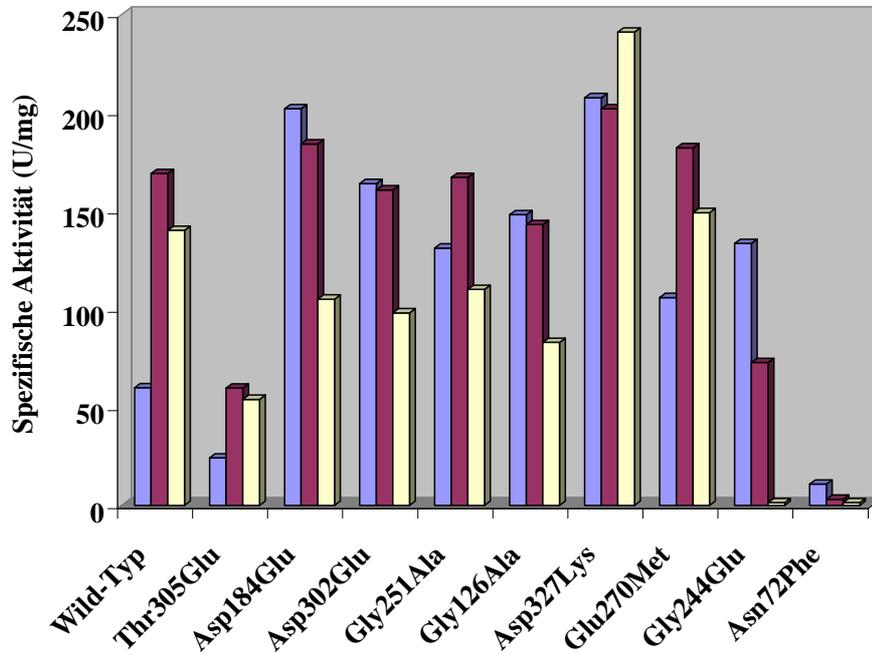


Abbildung 3-7. Enzym-Aktivität der Wild Typ L-HicDH und ihrer Mutanten bei unterschiedlichen pH-Bedingungen (blaue Säule: bei pH 6.0; braune Säule: bei pH 7.0; gelbe Säule: bei pH 8.0)

3.4 Enzym-Assay für L-HicDH und ihrer Mutanten

Die Wild-Typ L-HicDH und ihre Mutanten wurden in Hinsicht auf die kinetischen Konstanten K_M , K_{cat} und K_{cat} / K_M näher charakterisiert.

3. ERGEBNISSE

Tabelle 3-5. Kinetische Parameter der L-HicDH Wild-Typ und ihrer Mutanten
(Rohdatenmaterial siehe A. 6 im Anhang)

Enzym	V_{\max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$)	K_M (μM)	K_{cat} (S^{-1})	K_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)
L-HicDH Wild-Typ	3848.45	56.23	160.35	$2,85 \times 10^6$
Thr305Glu	2264.5	74	105.7	$1,43 \times 10^6$
Asp302Glu	3373.52	58.15	158.83	$2,73 \times 10^6$
Gly251Ala	5091,29	89,53	194	$2,17 \times 10^6$
Asp184Glu	3133,68	34,8	145	$4,17 \times 10^6$
Gly126Ala	5796,5	105,43	172,5	$1,64 \times 10^6$
Asp327Lys	14330.75	202,49	622,92	$3,08 \times 10^6$
Glu270Met	6141,41	80,99	245,88	$3,04 \times 10^6$
Gly244Glu	11795,47	441,13	279,70	$6,34 \times 10^5$
Asn72Phe	85,21	56,82	2,72	$4,79 \times 10^4$

3. ERGEBNISSE

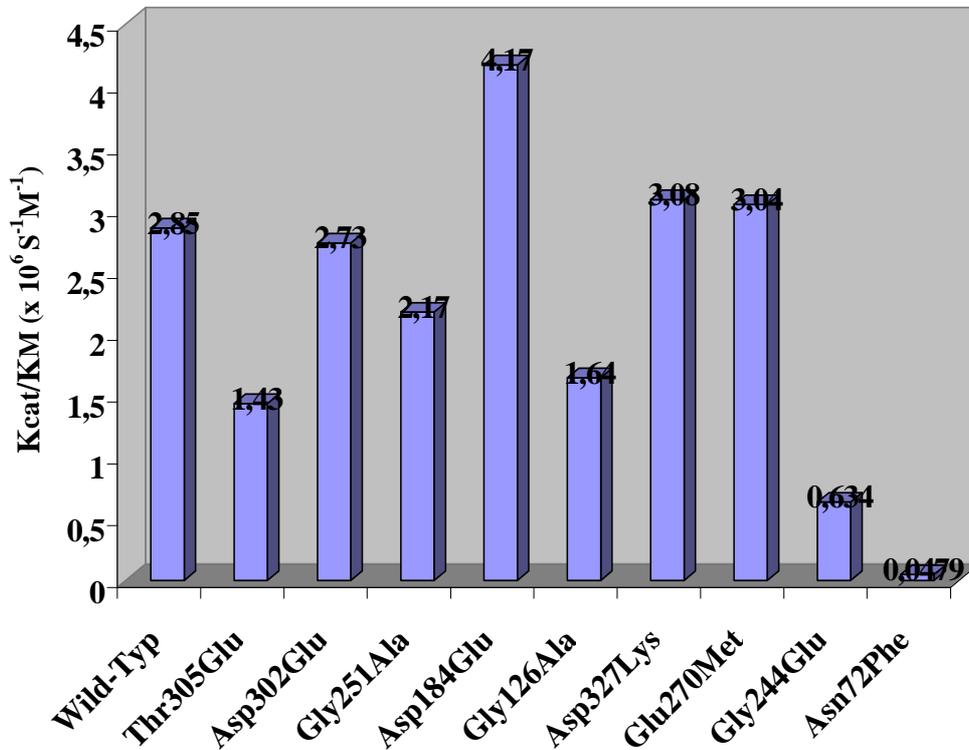


Abbildung 3-8. Vergleich der enzymatischen Effizienzen der Wild-Typ L-HicDH und ihrer Mutanten, charakterisiert durch die K_{cat}/K_M -Werte

3.5 Thermostabilität der L-HicDH bei der Anwesenheit von NADH

Die Thermostabilität der Wild-Typ L-HicDH und einiger Mutanten der L-HicDH wurden bei unterschiedlichen Bedingungen mit DSC untersucht, in der der Schmelzpunkt des Enzyms in

3. ERGEBNISSE

unterschiedlichen pH-Bedingungen, in Anwesenheit von NADH mit verschiedenen Konzentrationen gemessen wurde.

Tabelle 3-6. Mit DSC gemessenen T_m -Werte der Wild-Typ L-HicDH bei verschiedenen pH-Werten mit verschiedenen Konzentration von NADH

NADH-Konzentration (mM)	bei pH 6,0	bei pH 7,0	bei pH 8,0
0	$61,66 \pm 0,0132$	$52,97 \pm 0,0085$	$45,16 \pm 0,0067$
0,5	$65,34 \pm 0,0116$	$59,17 \pm 0,0051$	$46,81 \pm 0,0043$
1,0	$67,06 \pm 0,0076$	$61,11 \pm 0,0069$	$50,68 \pm 0,0083$
2,0	$68,09 \pm 0,0073$	$62,13 \pm 0,0076$	$53,15 \pm 0,0075$
3,0	$68,93 \pm 0,0066$	$63,90 \pm 0,0064$	$53,95 \pm 0,0084$

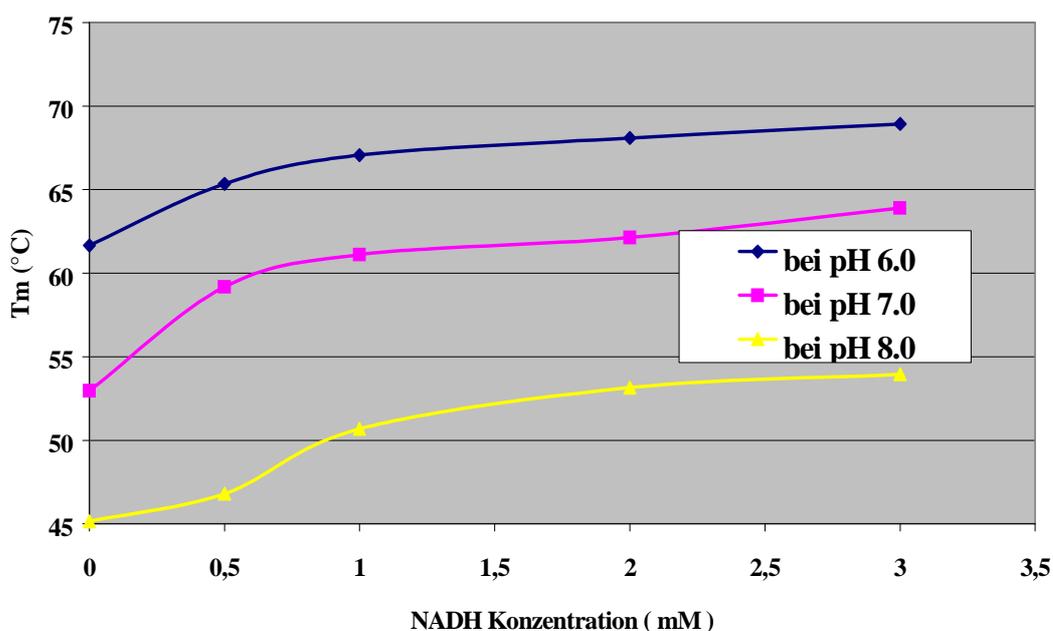


Abbildung 3-9. Die Thermostabilität der Wild-Typ L-HicDH bei verschiedenen pH-Werten mit verschiedenen Konzentrationen von NADH

3. ERGEBNISSE

3.6 Thermale Entfaltung der L-HicDH und ihrer Mutanten

3.6.1. Thermostabilitätsparameter der L-HicDH und ihrer Mutanten

Die thermale Entfaltung der L-HicDH und ihrer Mutanten wurde mit DSC gemessen und die thermodynamischen Parameter der L-HicDH und ihrer Mutanten wurden mit dem Programm Origin ausgewertet. Die thermale Entfaltung der L-HicDH und ihrer Mutanten wurde bei unterschiedlichen pH-Bedingungen (pH 6.0, pH 7.0 und pH 8.0) gemessen und jede Messung wurde dreimal durchgeführt. Die thermodynamischen Parameter wurden aus der einzelnen Mess-Datei ausgewertet und nachfolgend wurden die Durchschnittswerte der thermodynamischen Parameter ermittelt.

Tabelle 3-7. Thermostabilitätsparameter der L-HicDH und ihrer Mutanten (Ergebnisse der DSC-Messungen für allen Mutanten; Protein-Konzentration: 1mg/ml, Puffer: Elutionspuffer; bei pH 6.0, pH 7.0 und pH 8.0; Scan-Rate: 60°C/h; ΔH : Enthalpie-Änderung; ΔH_v : van't-Hoff-Enthalpie-Änderung)

Protein	pH-Wert	File	Tm (°C)	ΔH (Kal/Mol)	ΔH_v (Kal/Mol)	$\Delta H/\Delta H_v$
Asp327Lys	pH 7.0	240405a.dsc	55.36	1.98E5	1.93E5	1.026
Asp327Lys	pH 7.0	240405b.dsc	55.39	1.97E5	1.94E5	1.015
Asp327Lys	pH 7.0	250405.dsc	55.35	1.96E5	1.928E5	1.017
Asp327Lys	pH 6.0	250405a.dsc	62.81	2.13E5	2.21E5	0.964
Asp327Lys	pH 6.0	250405b.dsc	62.74	2.11E5	2.182E5	0.967
Asp327Lys	pH 6.0	260405.dsc	62.87	2.15E5	2.20E5	0.977
Asp327Lys	pH 8.0	270405.dsc	43.80	2.39E5	2.42E5	0.988
Asp327Lys	pH 8.0	260405a.dsc	43.82	2.45E5	2.44E5	1.004
Asp327Lys	pH 8.0	270405a.dsc	43.88	2.37E5	2.4E5	0.988
Wild-Typ	pH 8.0	270405b.dsc	44.05	2.22E5	2.29E5	0.969
Wild-Typ	pH 8.0	280405.dsc	44.12	2.24E5	2.25E5	0.996
Wild-Typ	pH 8.0	280405a.dsc	44.03	2.16E5	2.20E5	0.982
Wild-Typ	pH 7.0	280405b.dsc	55.07	2.07E5	2.06E5	1.005
Wild-Typ	pH 7.0	280405c.dsc	55.05	2.06E5	2.01E5	1.025
Wild-Typ	pH 7.0	280405d.dsc	55.12	1.96E5	1.98E5	0.990
Wild-Typ	pH 6.0	290405.dsc	62.50	2.21E5	2.26E5	0.978
Wild-Typ	pH 6.0	290405a.dsc	62.53	2.22E5	2.27E5	0.978

3. ERGEBNISSE

Wild-Typ	pH 6.0	290405b.dsc	62.62	2.22E5	2.27E5	0.978
Gly244Glu	pH 7.0	300405a.dsc	48.08	2.1E5	2.08E5	1.010
Gly244Glu	pH 7.0	010505.dsc	48.11	2.16E5	2.10E5	1.029
Gly244Glu	pH 7.0	010505a.dsc	48.31	2.1E5	2.14E5	0.981
Gly244Glu	pH 6.0	010505b.dsc	49.10	2.48E5	2.49E5	0.996
Gly244Glu	pH 6.0	020505.dsc	49.04	2.42E5	2.41E5	1.004
Gly244Glu	pH 6.0	020505b.dsc	49.16	2.48E5	2.44E5	1.016
Gly244Glu	pH 8.0	020505c.dsc	46.21	2.16E5	2.24E5	0.964
Gly244Glu	pH 8.0	020505d.dsc	46.15	2.23E5	2.21E5	1.009
Gly244Glu	pH 8.0	030505.dsc	46.06	2.27E5	2.19E5	1.037
Gly251Ala	pH 7.0	030505a.dsc	61.29	2.72E5	2.68E5	1.015
Gly251Ala	pH 7.0	030505b.dsc	61.26	2.69E5	2.69E5	1.000
Gly251Ala	pH 7.0	030505c.dsc	61.25	2.61E5	2.68E5	0.974
Gly251Ala	pH 6.0	030505d.dsc	65.79	2.7E5	2.71E5	0.996
Gly251Ala	pH 6.0	040505.dsc	65.85	2.82E5	2.73E5	1.033
Gly251Ala	pH 6.0	040505a.dsc	65.77	2.8E5	2.73E5	1.026
Gly251Ala	pH 8.0	040505b.dsc	48.37	1.58E5	1.58E5	1.000
Gly251Ala	pH 8.0	050505.dsc	48.40	1.55E5	1.52E5	1.020
Gly251Ala	pH 8.0	050505a.dsc	48.39	1.47E5	1.51E5	0.974
Glu270Met	pH 7.0	060505.dsc	55.27	2.16E5	2.17E5	0.995
Glu270Met	pH 7.0	060505a.dsc	55.34	2.21E5	2.16E5	1.023
Glu270Met	pH 7.0	060505b.dsc	55.36	2.2E5	2.15E5	1.023
Glu270Met	pH 6.0	070505.dsc	60.81	2.58E5	2.51E5	1.028
Glu270Met	pH 6.0	070505a.dsc	60.81	2.52E5	2.52E5	1.000
Glu270Met	pH 6.0	080505.dsc	60.89	2.53E5	2.55E5	0.992
Glu270Met	pH 8.0	080505a.dsc	41.82	1.88E5	1.89E5	0.995
Glu270Met	pH 8.0	090505.dsc	41.76	1.89E5	1.85E5	1.022
Glu270Met	pH 8.0	090505a.dsc	41.78	1.85E5	1.87E5	0.989
Thr305Glu	pH 7.0	090505b.dsc	54.96	1.98E5	1.96E5	1.010
Thr305Glu	pH 7.0	090505c.dsc	54.84	1.96E5	1.92E5	1.021
Thr305Glu	pH 7.0	100505.dsc	54.81	1.90E5	1.94E5	0.979
Thr305Glu	pH 8.0	100505a.dsc	44.02	2.00E5	2.08E5	0.962
Thr305Glu	pH 8.0	100505b.dsc	44.06	2.03E5	2.04E5	0.995
Thr305Glu	pH 8.0	100505c.dsc	44.01	2.10E5	2.05E5	1.024
Thr305Glu	pH 6.0	110505.dsc	62.47	2.31E5	2.25E5	1.027
Thr305Glu	pH 6.0	110505a.dsc	62.47	2.27E5	2.27E5	1.000
Thr305Glu	pH 6.0	110505b.dsc	62.42	2.27E5	2.23E5	1.018
Gly126Ala	pH 7.0	120505.dsc	53.80	1.92E5	1.98E5	0.970
Gly126Ala	pH 7.0	120505a.dsc	53.72	1.94E5	1.92E5	1.010
Gly126Ala	pH 7.0	120505b.dsc	53.82	1.94E5	1.97E5	0.985
Gly126Ala	pH 6.0	120505c.dsc	61.67	2.22E5	2.27E5	0.978
Gly126Ala	pH 6.0	130505.dsc	61.64	2.23E5	2.24E5	0.996

3. ERGEBNISSE

Gly126Ala	pH 6.0	130505a.dsc	61.56	2.24E5	2.24E5	1.000
Gly126Ala	pH 8.0	130505b.dsc	42.01	1.75E5	1.75E5	1.000
Gly126Ala	pH 8.0	130505c.dsc	41.72	1.78E5	1.76E5	1.011
Gly126Ala	pH 8.0	140505.dsc	41.74	1.70E5	1.74E5	0.977
Asp302Glu	pH 8.0	140505a.dsc	42.67	1.95E5	1.98E5	0.985
Asp302Glu	pH 8.0	150505.dsc	42.59	2.03E5	1.97E5	1.030
Asp302Glu	pH 8.0	150505a.dsc	42.49	1.92E5	1.94E5	0.990
Asp302Glu	pH 7.0	150505b.dsc	52.09	1.84E5	1.81E5	1.017
Asp302Glu	pH 7.0	160505.dsc	52.19	1.86E5	1.86E5	1.000
Asp302Glu	pH 7.0	160505a.dsc	52.20	1.81E5	1.85E5	0.978
Asp302Glu	pH 6.0	160505b.dsc	60.23	2.20E5	2.15E5	1.023
Asp302Glu	pH 6.0	170505.dsc	60.05	2.09E5	2.12E5	0.986
Asp302Glu	pH 6.0	170505a.dsc	60.23	2.11E5	2.15E5	0.981
Asp184Glu	pH 6.0	170505b.dsc	59.63	2.35E5	2.29E5	1.026
Asp184Glu	pH 6.0	170505c.dsc	59.57	2.33E5	2.26E5	1.031
Asp184Glu	pH 6.0	170505d.dsc	59.60	2.33E5	2.29E4	1.017
Asp184Glu	pH 7.0	180505.dsc	52.28	1.93E5	1.94E5	0.995
Asp184Glu	pH 7.0	180505a.dsc	52.09	1.96E5	1.90E5	1.032
Asp184Glu	pH 7.0	180505b.dsc	52.22	1.96E5	1.91E5	1.026
Asp184Glu	pH 8.0	190505.dsc	41.57	2.02E5	1.96E5	1.031
Asp184Glu	pH 8.0	190505a.dsc	41.61	2.03E5	1.97E5	1.030
Asp184Glu	pH 8.0	190505b.dsc	41.59	1.95E5	1.98E5	0.985
Asn72Phe	pH 8.0	190505c.dsc	39.13	1.47E5	1.40E5	1.050
Asn72Phe	pH 8.0	200505.dsc	39.14	1.35E5	1.45E5	0.931
Asn72Phe	pH 8.0	200505a.dsc	39.29	1.42E5	1.42E5	1.000
Asn72Phe	pH 6.0	200505b.dsc	44.21	1.31E5	1.29E5	1.016
Asn72Phe	pH 6.0	200505c.dsc	44.43	1.27E5	1.30E5	0.977
Asn72Phe	pH 6.0	210505.dsc	44.35	1.17E5	1.16E5	1.009
Asn72Phe	pH 7.0	220505.des	43.59	1.46E5	1.47E5	0.993
Asn72Phe	pH 7.0	220505a.dsc	43.55	1.49E5	1.40E5	1.064
Asn72Phe	pH 7.0	230505.dsc	43.38	1.30E5	1.32E5	0.985

3. ERGEBNISSE

Durchschnittswert der drei Messungen

Tabelle 3-8. Der Durchschnittswert der drei Messungen (Protein-Konzentration: 1mg/ml, Puffer: Elutionspuffer; Scan-Rate: 60°C/h; ΔH : Enthalpie-Änderung; ΔH_v : van't-Hoff-Enthalpie-Änderung)

Protein	pH-Wert	Tm (°C)	ΔH (Kal/Mol)	ΔH_v (Kal/Mol)	$\Delta H/\Delta H_v$
Asp327Lys	pH 6.0	62.81 ± 0,065	2.13E5 ± 0,020E5	2.20E5 ± 0,039E5	0.969
Asp327Lys	pH 7.0	55.37 ± 0,021	1.97E5 ± 0,010E5	1.93E5 ± 0,006E5	1.019
Asp327Lys	pH 8.0	43.83 ± 0,042	2.40E5 ± 0,042E5	2.42E5 ± 0,020E5	0.993
Wild-Typ	pH 6.0	62.55 ± 0,062	2.22E5 ± 0,006E5	2.27E5 ± 0,006E5	0.978
Wild-Typ	pH 7.0	55.08 ± 0,036	2.03E5 ± 0,061E5	2.02E5 ± 0,040E5	1.007
Wild-Typ	pH 8.0	44.07 ± 0,047	2.21E5 ± 0,042E5	2.25E5 ± 0,045E5	0.982
Gly244Glu	pH 6.0	49.10 ± 0,060	2.46E5 ± 0,035E5	2.45E5 ± 0,040E5	1.005
Gly244Glu	pH 7.0	48.17 ± 0,125	2.12E5 ± 0,035E5	2.11E5 ± 0,031E5	1.007
Gly244Glu	pH 8.0	46.14 ± 0,075	2.22E5 ± 0,056E5	2.21E5 ± 0,025E5	1.003
Gly251Ala	pH 6.0	65.80 ± 0,042	2.77E5 ± 0,064E5	2.72E5 ± 0,012E5	1.018
Gly251Ala	pH 7.0	61.27 ± 0,021	2.67E5 ± 0,057E5	2.68E5 ± 0,006E5	0.996
Gly251Ala	pH 8.0	48.39 ± 0,015	1.53E5 ± 0,057E5	1.54E5 ± 0,038E5	0.998
Glu270Met	pH 6.0	60.84 ± 0,046	2.54E5 ± 0,032E5	2.53E5 ± 0,021E5	1.007
Glu270Met	pH 7.0	55.32 ± 0,047	2.19E5 ± 0,026E5	2.16E5 ± 0,010E5	1.014
Glu270Met	pH 8.0	41.79 ± 0,031	1.87E5 ± 0,021E5	1.87E5 ± 0,020E5	1.002
Thr305Glu	pH 6.0	62.45 ± 0,029	2.28E5 ± 0,023E5	2.25E5 ± 0,020E5	1.015
Thr305Glu	pH 7.0	54.87 ± 0,079	1.95E5 ± 0,042E5	1.94E5 ± 0,020E5	1.003
Thr305Glu	pH 8.0	44.03 ± 0,026	2.04E5 ± 0,051E5	2.06E5 ± 0,021E5	0.994
Gly126Ala	pH 6.0	61.62 ± 0,057	2.23E5 ± 0,010E5	2.25E5 ± 0,017E5	0.991
Gly126Ala	pH 7.0	53.78 ± 0,053	1.93E5 ± 0,012E5	1.96E5 ± 0,032E5	0.988
Gly126Ala	pH 8.0	41.82 ± 0,162	1.74E5 ± 0,040E5	1.75E5 ± 0,010E5	0.996
Asp302Glu	pH 6.0	60.17 ± 0,104	2.13E5 ± 0,059E5	2.14E5 ± 0,017E5	0.997
Asp302Glu	pH 7.0	52.16 ± 0,061	1.84E5 ± 0,025E5	1.84E5 ± 0,026E5	0.998
Asp302Glu	pH 8.0	42.58 ± 0,090	1.97E5 ± 0,057E5	1.96E5 ± 0,021E5	1.002
Asp184Glu	pH 6.0	59.60 ± 0,030	2.34E5 ± 0,012E5	2.28E5 ± 0,017E5	1.025
Asp184Glu	pH 7.0	52.20 ± 0,097	1.95E5 ± 0,017E5	1.92E5 ± 0,021E5	1.018
Asp184Glu	pH 8.0	41.59 ± 0,020	2.00E5 ± 0,043E5	1.97E5 ± 0,010E5	1.015
Asn72Phe	pH 6.0	44.33 ± 0,111	1.25E5 ± 0,072E5	1.25E5 ± 0,078E5	1.000
Asn72Phe	pH 7.0	43.51 ± 0,112	1.42E5 ± 0,102E5	1.40E5 ± 0,075E5	1.014
Asn72Phe	pH 8.0	39.19 ± 0,090	1.41E5 ± 0,060E5	1.42E5 ± 0,025E5	0.994

3. ERGEBNISSE

3.6.2 pH-Abhängigkeit

Die thermale Denaturierung der L-HicDH und ihrer Mutanten ist pH abhängig. Die thermale Stabilität von L-HicDH und ihrer Mutanten wurde mit DSC bei verschiedenen pH-Werten (pH 6.0, pH 7.0 and pH 8.0) untersucht.

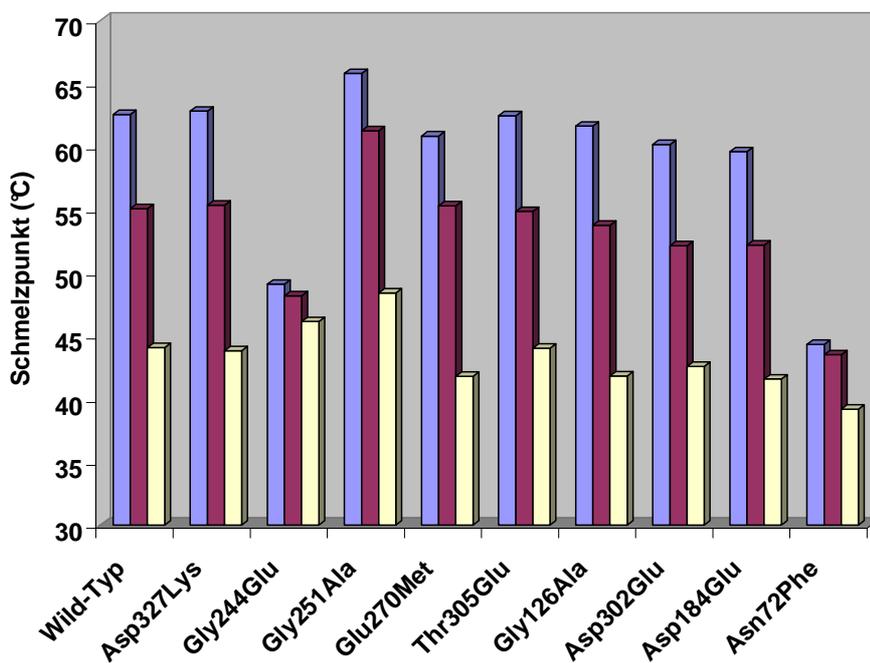


Abbildung 3-10. Schmelzpunkte (T_m) der L-HicDH und ihrer Mutanten bei pH 6.0 (blaue Säule), pH 7.0 (rote Säule) und pH 8.0 (weiße Säule) (Daten siehe Tabelle 3-8)

3. ERGEBNISSE

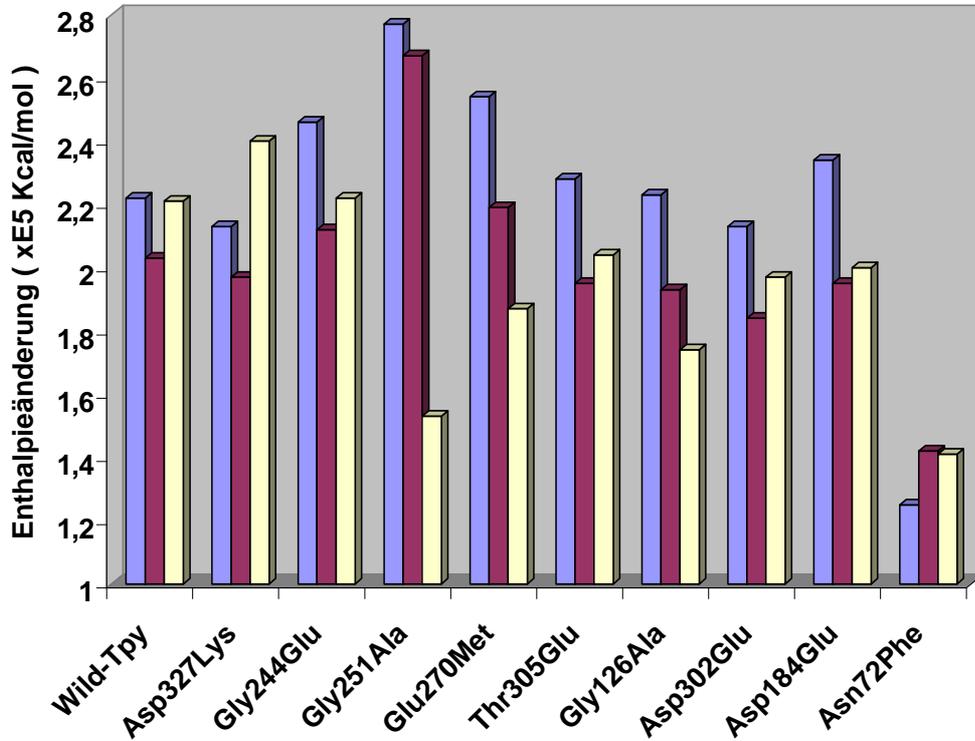


Abbildung 3-11. Enthalpieänderung der L-HicDH und ihrer Mutanten bei pH 6.0 (blaue Säule), pH 7.0 (rote Säule) und pH 8.0 (weiße Säule) (Daten siehe Tabelle 3-8)

3.6.3. Reproduzierbarkeit der DSC-Messung

Die Reproduzierbarkeit und die Genauigkeit der DSC-Messungen können aus den Messergebnissen vom Wild-Typ erfasst werden.

Die Größe und die Quelle der Fehler aller Messungen haben gezeigt, dass sie unter $\pm 0.014^\circ\text{C}$ bei T_m und $\pm 1\%$ bei beiden Enthalpien liegen. Diese statistischen Fehler, die durch die Software bei der Auswertung des einzelnen Thermogramme produziert wurden, sind im

3. ERGEBNISSE

Allgemeinen sehr niedrig, da sie die experimentellen Daten mit einer theoretischen Kurve vergleicht (Andreas Matouschek *et al.*, 1994). Die Genauigkeit der Messungen wurde kontrolliert, indem die Messungen dreimal mit der gleichen Probe durchgeführt wurden. Die Reproduzierbarkeit der DSC-Messungen bei gleichen Bedingungen kann auch durch die Überlagerung der Messkurven veranschaulicht werden (Abbildung 3-12).

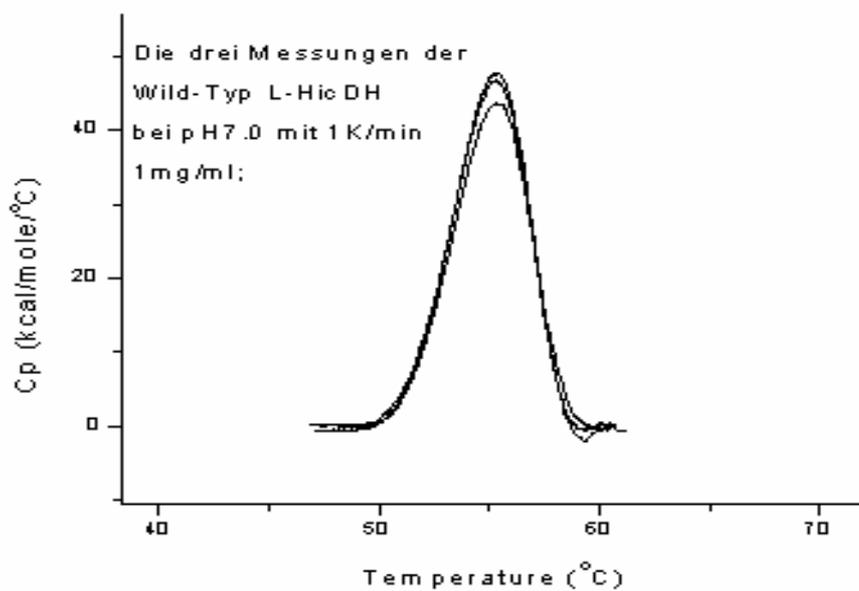


Abbildung 3-12. Reproduzierbarkeit der DSC-Messungen bei gleichen Bedingungen.

3. ERGEBNISSE

3.7 CD-Messungen der L-HicDH und ihrer Mutanten zwecks T_m -Bestimmung

Um die mit DSC gemessenen Schmelzpunkte des L-HicDH Wild-Typs und dessen Mutanten zu überprüfen, wurden der L-HicDH Wild-Typ und einige Mutanten im gleichen Puffer (5 mM Kaliumphosphat-Puffer) und bei verschiedenen pH-Bedingungen vermessen.

Tabelle 3-9. Übereinstimmung der DSC- und CD-Messung im gleichen Puffer: 5 mM Kaliumphosphat-Puffer

Protein	PH-Wert	T_m in der CD-Messung	T_m in der DSC-Messung
Thr305Glu	7,0	59.4	59.63
Asp327Lys	8,0	54.8	55.94
Asp327Lys	7,0	58.6	59.31
Gly251Ala	6.0	58,8	59,82
Wild-Typ	7.0	60,2	59,65
Wild-Typ	8.0	56,2	55.94
Wild-Typ	6.0	56,8	57,23
Gly126Ala	8.0	53,4	54.82
Asp302Glu	7.0	58,6	58,00

3. ERGEBNISSE

1. Mutante Thr305Glu

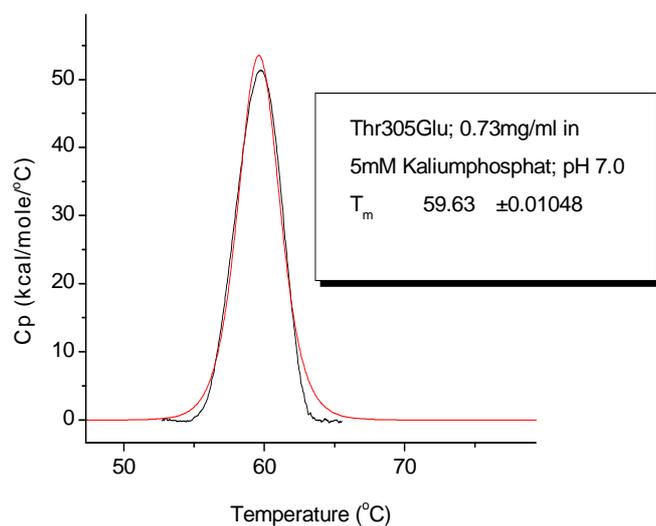


Abbildung 3-13. DSC-Messung der Mutante Thr305Glu in 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0 (Die theoretische, durch das Programm Origin vorgegebene Kurve ist in Rot abgebildet)

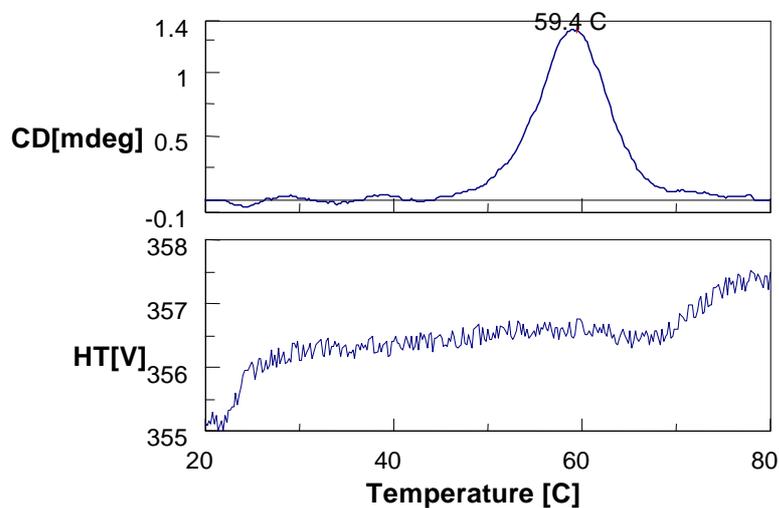


Abbildung 3-14. CD-Messung von Mutante Thr305Glu in 5 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.0

3. ERGEBNISSE

2. Mutante Asp327Lys

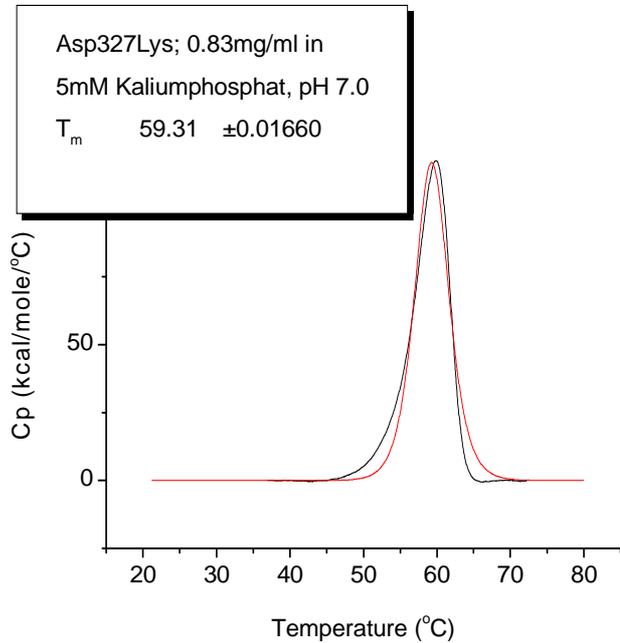


Abbildung 3-15. DSC-Messung von Mutante Asp327Lys in 5 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.0 (Die theoretische durch das Programm Origin vorgegebene Kurve ist in Rot abgebildet)

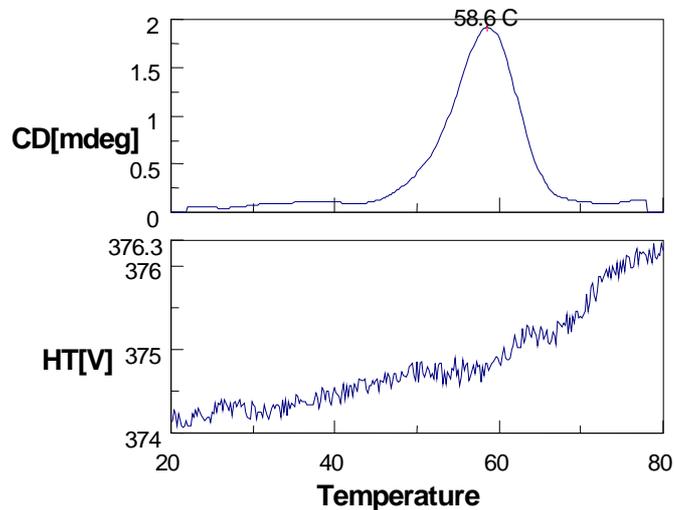


Abbildung 3-16. CD-Messung von Mutante Asp327Lys in 5 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.0

3. ERGEBNISSE

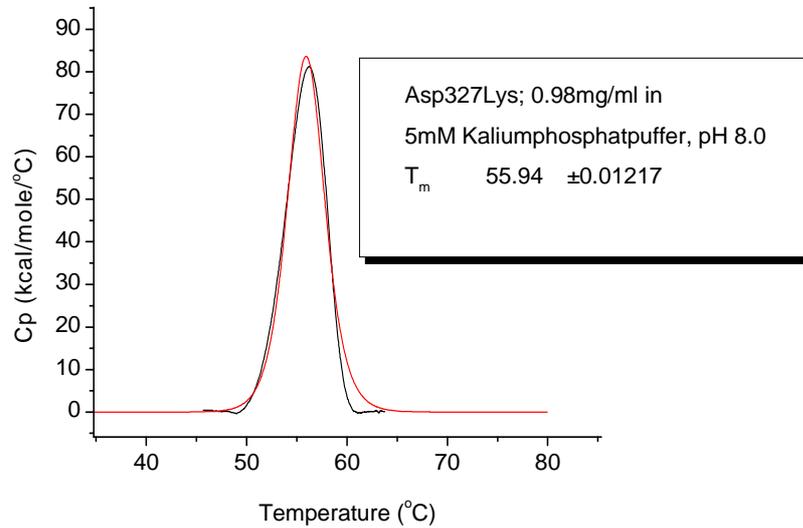


Abbildung 3-17. DSC-Messung von Mutante Asp327Lys in 5 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 8.0

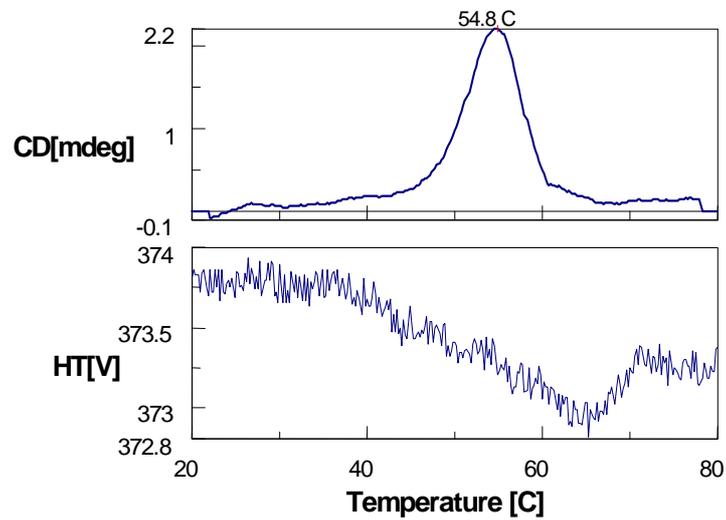


Abbildung 3-18. CD-Messung von Mutante Asp327Lys in 5 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 8.0

3. ERGEBNISSE

3. Wild-Typ L-HicDH

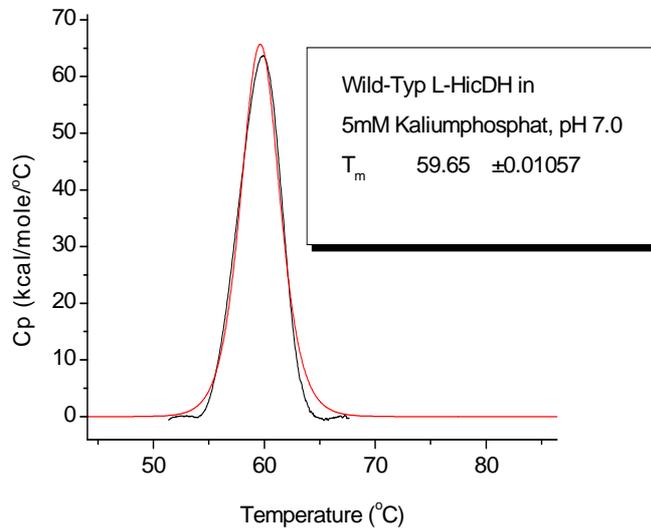


Abbildung 3-19. DSC-Messung der Wild-Typ L-HicDH in 5 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.0

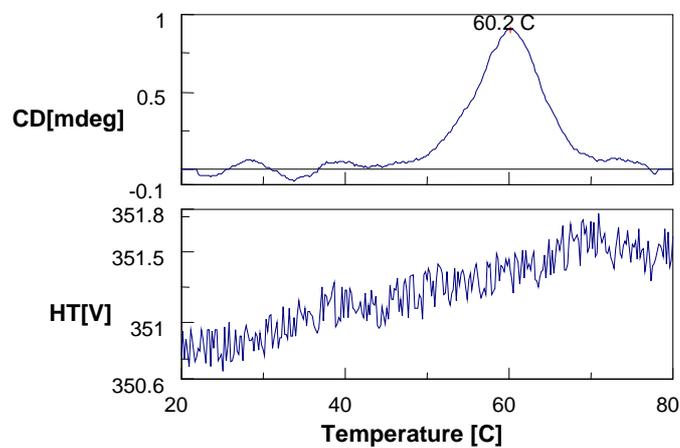


Abbildung 3-20. CD-Messung der Wild-Typ L-HicDH in 5 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.0

3. ERGEBNISSE

3.8 Charakterisierung der Denaturierung der Wild-Typ L-HicDH und ihrer Mutanten

Die Denaturierung der Wild-Typ L-HicDH und ihrer Mutanten wurde durch die differentielle *scanning*-Kalorimetrie untersucht und charakterisiert.

3.8.1 Abhängigkeit der Übergangstemperatur von der *Scan-Rate*

Bei der thermalen Entfaltung der Wild-Typ L-HicDH und ihrer Mutanten wurde gefunden, dass die thermal induzierte Entfaltung abhängig ist von der *Scan-Rate*, bei der die DSC-Messung vorgenommen wird. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es sich bei der Entfaltung um einen zwei-Schritt irreversibelen Denaturierungsprozess handelt.

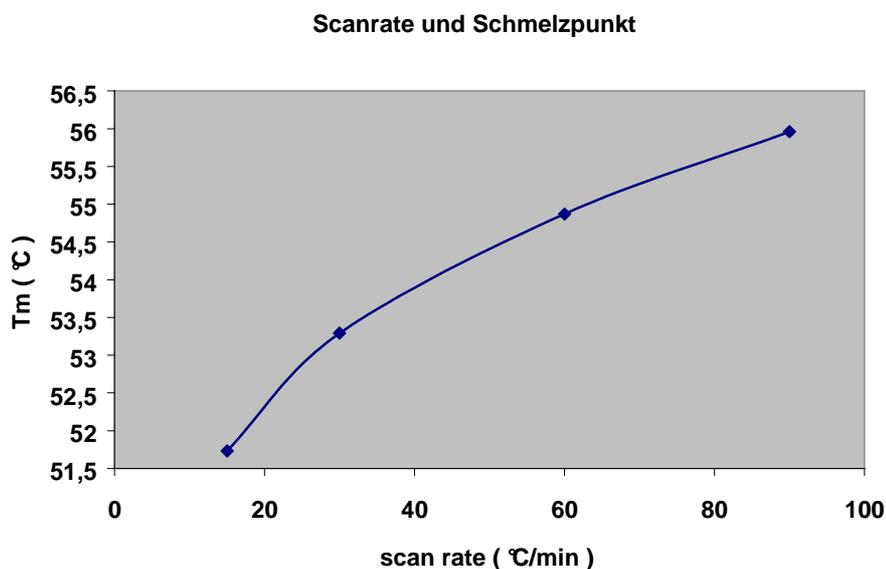


Abbildung 3-21. Abhängigkeit der thermal induzierten Entfaltung von der Scan-Rate bei der DSC-Messung der Wild-TypL-HicDH

3. ERGEBNISSE

Tabelle 3-10. *Scan-Rate* und T_m von DSC-Messungen der Entfaltung des L-HicDH Wild-Typ-Proteins

Scanrate	T_m (°C)
15°C/h	52.14
30°C/h	53.45
60°C/h	55.14
90°C/h	55.89

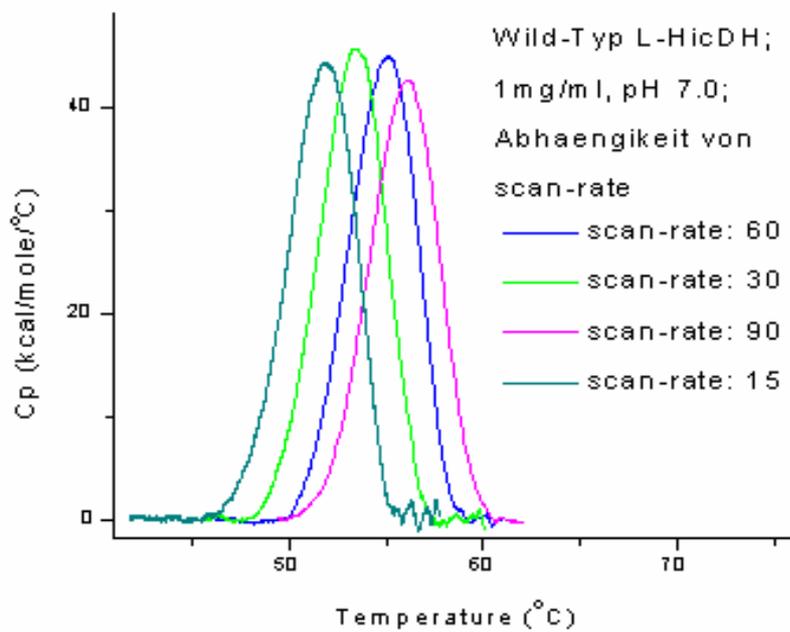


Abbildung 3-22. Überlagerung der DSC-Spektren der Entfaltung der Wild-Typ L-HicDH bei unterschiedlichen *Scan-Rate*

3. ERGEBNISSE

3.8.2 Irreversibilität

Üblicherweise wird eine Reversibilität der Denaturierung gezeigt, indem nach dem Abkühlen der bereits im DSC vermessenen Probe ein weiterer Scan durchgeführt wird. Ist die zweite Kurve vergleichbar mit der ersten ist die Entfaltung reversibel (Sanz, JM *et al.*, 1993).

Auch in meiner Arbeit wurde die Reversibilität geprüft, indem das Protein sowohl nach vollständiger Denaturierung als auch nach dem Erhitzen bis zum T_m , zunächst abgekühlt und dann noch einmal gescannt wurde. Das zweite Thermogramm zeigt keinen thermalen Effekt. Das bedeutet, dass die thermal induzierte Denaturierung von L-HicDH und ihrer Mutanten irreversibel ist und es kein thermodynamisches Gleichgewicht in diesem Prozess gibt. Unmittelbar nach dem endothermalen Peak der Entfaltung von Proteinen ist die Spur der irreversiblen und exothermalen Aggregation sichtbar.

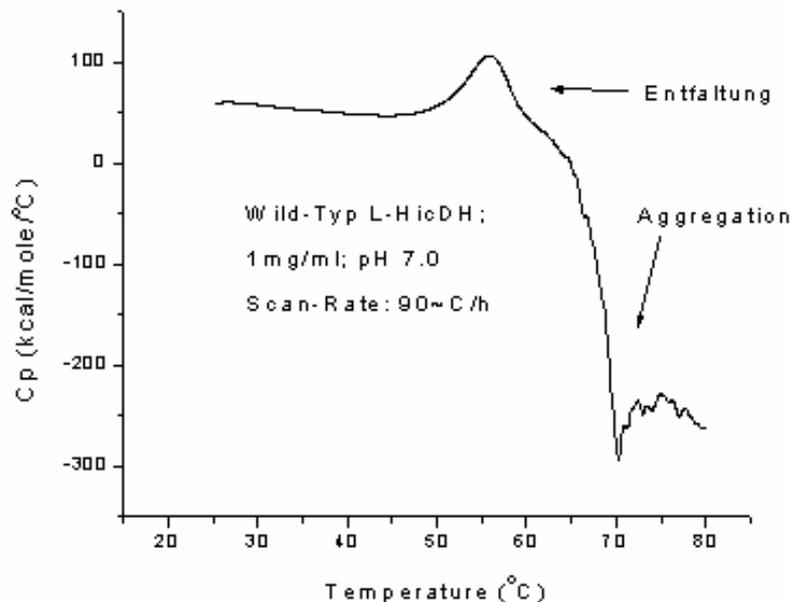


Abbildung 3-23. Die thermale Denaturierung der Wild-Typ L-HicDH bei pH 7.0 zeigt einer typischen exothermen Spur direkt nach dem endothermen Entfaltungspike bei hoher Temperatur.

3. ERGEBNISSE

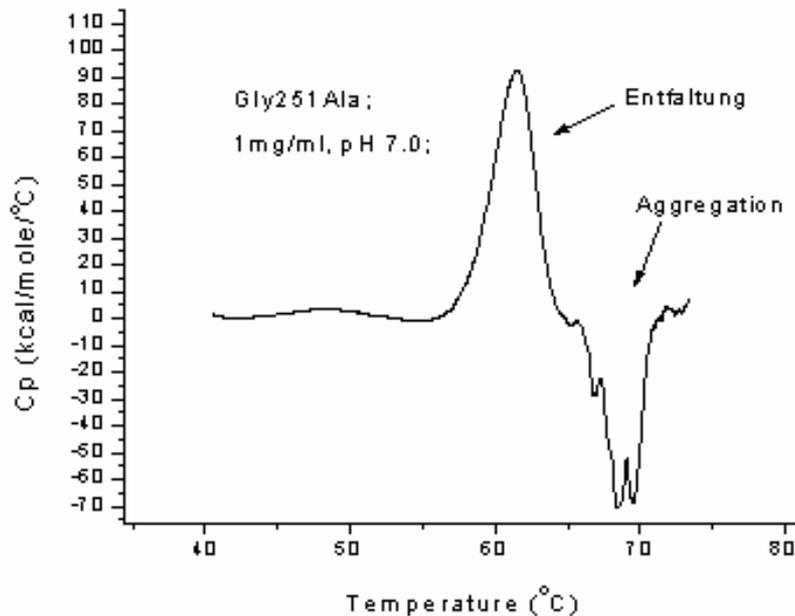


Abbildung 3-24. Die thermale Denaturierung von Gly251Ala bei pH 7.0 zeigt einen typischen exothermen Verlauf direkt nach dem endothermen Entfaltungspeak bei hoher Temperatur.

3.8.3. Extreme Kooperativität

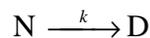
Das Verhältnis $\Delta H/\Delta H_v$ ist ein Indikator für die Kooperativität der Entfaltung. Die Nähe dieses Verhältnisses zu 1 ist ein Kriterium eines Ein-Schritt-Überganges. Das heißt, dass die Konzentration aller Intermediate zwischen dem nativen und denaturierten Zustand sehr niedrig ist und die Denaturierung dem Prinzip von „*all-or-nothing*“ folgt. Alle DSC-Messungen zeigen eine extreme Kooperativität der thermal induzierten Entfaltung der L-HicDH und ihrer Mutanten (Tabelle 3-7 und Tabelle 3-8).

3. ERGEBNISSE

3.8.4 Aktivierungsenergie der Entfaltung der Wild-Typ L-HicDH

Ermittlung der Aktivierungsenergie mit der Arrhenius-Analyse

Es wurde vermutet, dass die thermal induzierte Entfaltung der L-HicDH ein irreversibler Prozess ist und durch die Entfallungskonstante k kinetisch bestimmt ist:



wobei N der native Zustand, D der entfaltete Zustand, und k eine kinetische Konstante der 1. Ordnung sind, die sich nach der Arrhenius-Gleichung mit der Temperatur ändert. J. M. Sanchez-Ruiz *et al* (1988) hat eine mathematische Ausarbeitung für dieses Model gemacht und nach dieser mathematischen Ausarbeitung gibt es mehrere Methoden für die Berechnung der Aktivierungsenergie dieses kinetischen Prozesses (Sanchez-Ruiz *et al.*, 1988; Kishore, N. *et al.* 1998; Stirpe *et al.*, 2005). Um die Aktivierungsenergie zu ermitteln wurden die von Sanchez-Ruiz *et al.* beschriebenen Methoden (Sanchez-Ruiz *et al.*, 1988) angewendet (siehe Anhang **A.8** Theoretische Grundlagen). Im Folgenden sind 3 Methoden zur Bestimmung der Aktivierungsenergie beim Wild-Typ L-HicDH –Protein und ihrer Mutanten zur Anwendung gekommen.

Methode 1:

Die Geschwindigkeitskonstante dieses Prozesses bei einer bestimmten Temperatur kann durch die Anwendung folgender Gleichung ermittelt werden:

$$k = v C_p / (Q_t - Q)$$

wobei v (K/min) die Scan-Rate, C_p die überschüssige Wärme-Kapazität, Q_t die totale Wärme des Prozesses und Q die absorbierte Wärme bei einer bestimmten Temperatur sind. Mit den

3. ERGEBNISSE

Parametern C_p , Q_t , Q und mit der oben erwähnten Gleichung kann die Gleichgewichtskonstante k bei verschiedenen *scan*-Raten berechnet werden (Daten siehe Anhang 7). Damit kann ein Arrhenius Plot mit $\ln k$ versus $1/T$ hergestellt werden, und daraufhin kann ein Wert für die Aktivierungsenergie (E) aus der Steigung des Arrhenius Plots berechnet werden. Im Arrhenius Plot ist die Steigung gleich E/R . Der Mittelwert der Aktivierungsenergie der thermalen Entfaltung der Wild-Typ L-HicDH liegt bei $476,18 \pm 38$ kJ/mol (Abbildung 3-25).

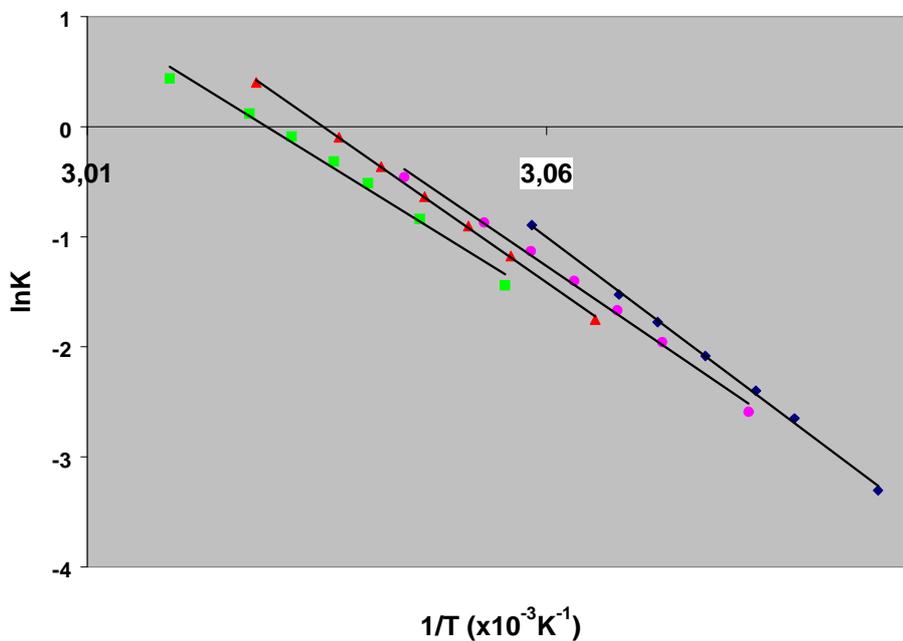


Abbildung 3-25. Arrhenius Plot der DSC-Daten mit unterschiedlichen Scan-Raten. Die Messungen wurden bei pH 7.0 mit der Protein-Konzentration 1.00mg/ml durchgeführt. Datenpunkte der unterschiedlichen *scan*-Raten: (■) 1,5 K/min; (▲) 1,0 K/min; (●) 0,5 K/min; (◆) 0,25 K/min (Rohdaten siehe im Anhang A.7).

3. ERGEBNISSE

Methode 2:

Nach diesem kinetischen Modell wird die absorbierte Wärme mit der Temperatur in Beziehung gebracht:

$$\ln[\ln Q_t / (Q_t - Q)] = E/R (1/T_m - 1/T)$$

daher sollte ein Plot von $\ln[\ln Q_t / (Q_t - Q)]$ versus $1/T$ eine gerade Linie ergeben und die Steigung dieser Grade ist $- E/R$. Vier Grade wurden aus den DSC-Daten mit vier unterschiedlichen Scan-Raten hergestellt, die durchschnittliche Aktivierungsenergie betrug dabei $584,79 \pm 14$ kJ/mol (Abbildung 3-26).

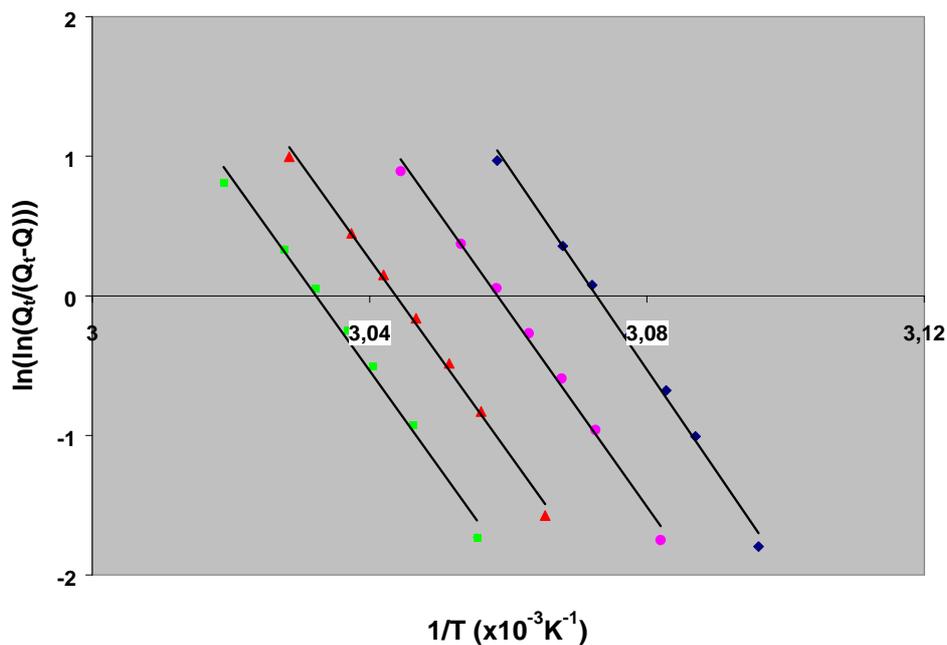


Abbildung 3-26. Plot von $\ln [\ln Q_t / (Q_t - Q)]$ versus $1/T$. Die vier Grade wurden aus vier DSC Scans berechnet, die bei unterschiedlicher scan-Rate 1.5 K/min(■), 1 K/min(▲), 0.5 K/min(●) und 0.25 K/min(◆) gemessen wurden (Rohdaten siehe im Anhang A.7).

3. ERGEBNISSE

Methode 3:

Aus der Wärmekapazität C_p^m bei T_m , kann die Aktivierungsenergie nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$E = R T_m^2 C_p^m / (Q_t - Q_m) = e R T_m^2 C_p^m / Q_t$$

Mittels dieser Gleichung kann die Aktivierungsenergie aus den DSC-Daten berechnet werden, die aus vier Messungen mit unterschiedlichen *scan*-Raten (1.5 K/min, 1 K/min, 0.5 K/min und 0.25 K/min) entnommen wurden. Anschließend wurde eine durchschnittliche Aktivierungsenergie von $553,34 \pm 8$ kJ/mol ermittelt.

Die gesamte Ermittlung der Aktivierungsenergie der thermal induzierten L-HicDH wurde in Tabelle 4-5 aufgelistet. Nach Literaturangaben wurden die Temperaturpunkte im Bereich von $T_m - 2 \leq T \leq T_m + 2$ ausgewählt (siehe Methodenteil, Seite 58).

Tabelle 3-11. Ermittlung der Aktivierungsenergie der Wild-Typ L-HicDH mittels Arrhenius-Analyse (Einheit für Aktivierungsenergie: kJ/Mol)

ν (K/min)	Methode 1	Methode 2	Methode 3
0,25	520,43	604,89	564,19
0,5	471,78	582,51	552,56
1,0	483,90	575,71	550,81
1,5	428,62	576,04	545,78
Mittelwert	$476,18 \pm 38$	$584,79 \pm 14$	$553,34 \pm 8$

3. ERGEBNISSE

3.8.5 Aktivierungsenergie der Entfaltung der Mutanten der L-HicDH

Ermittlung der Aktivierungsenergie der Mutanten mittels Arrhenius-Analyse

Die Aktivierungsenergie der Mutanten der L-HicDH wurden aus den DSC-Daten ermittelt. Die DSC-Messungen wurden mit der Protein-Konzentration von 1mg/ml und der Scan-Rate von 60°C/h (1K/min) bei pH 7,0 durchgeführt. Die Berechnung der Geschwindigkeitskonstante K erfolgte nach der Gleichung:

$$K = v C_p / (Q_t - Q)$$

Die Aktivierungsenergie (E) der Mutanten wurde mit drei unterschiedlichen Methoden berechnet und dann wurde der Mittelwert ermittelt:

(1) Methode 1: Berechnung der Aktivierungsenergie (E) mit der Steigung des Arrhenius-Plots: Steigung des Arrhenius-Plots = $-E/R$ (siehe Seite 93)

(2) Methode 2: Berechnung der Aktivierungsenergie aus dem Plot von $\ln[\ln Q_t / (Q_t - Q)]$ versus $1/T$ (siehe Seite 95)

(3) Methode 3: Berechnung der Aktivierungsenergie (E) mit der Gleichung : $E = eR T_m^2 C_p^m / Q_t$ (siehe Seite 96)

Tabelle 3-12. Bestimmung der Aktivierungsenergie der Mutanten aus der Arrhenius-Analyse mit verschiedenen Methoden (Einheit: kJ/Mol; Scan-Rate: 1K/min; Rohdaten siehe im Anhang A.7).

Protein	Methode 1	Methode 2	Methode 3	Mittelwert
Gly251Ala	641,23	750,44	748,00	713,22 ± 62
Gly244Glu	581,22	560,91	584,60	575,58 ± 13
Asp327Lys	480,06	554,18	540,02	524,75 ± 39
Glu270Met	557,84	615,46	622,15	598,48 ± 35
Gly126Ala	487,92	579,49	556,88	541,43 ± 48

3. ERGEBNISSE

Thr305Glu	497,46	585,65	553,56	545,56 ± 45
Asp302Glu	483,40	518,93	507,74	503,36 ± 18
Asp184Glu	467,48	558,61	538,26	521,45 ± 48
Ans72Phe	316,51	416,56	386,38	373,15 ± 51

Methode 1: Aus dem Plot $\ln k$ gegen $1/T$

Methode 2: Aus dem Plot $\ln(\ln(Q_t/(Q_t-Q)))$ gegen $1/T$

Methode 3: mit der Gleichung $E = eRC_p^m T_m^2 / Q_t$

Die durch rationales Protein-Design für eine Stabilisierung des Wildtyp-Proteins vorhergesagten Mutationen Gly251Ala, Gly244Glu und Glu270Met führten mit einer Erhöhung der Aktivierungsenergie von 90-180kJ/mol, 38-86 kJ/mol bzw. 60-77 kJ/Mol zu einer deutlichen kinetischen Stabilisierung. Mutante Gly251Ala weist einen deutlich erhöhten T_m -Wert auf.

Im Gegensatz dazu wurde das Enzym L-HicDH durch die Mutation Asn72Phe mit einer Verringerung der Aktivierungsenergie von 150-165 kJ/Mol destabilisiert. Die übrigen vorhergesagten Mutationen zeigten keinen Effekt auf die kinetische Stabilität des Proteins.

3. ERGEBNISSE

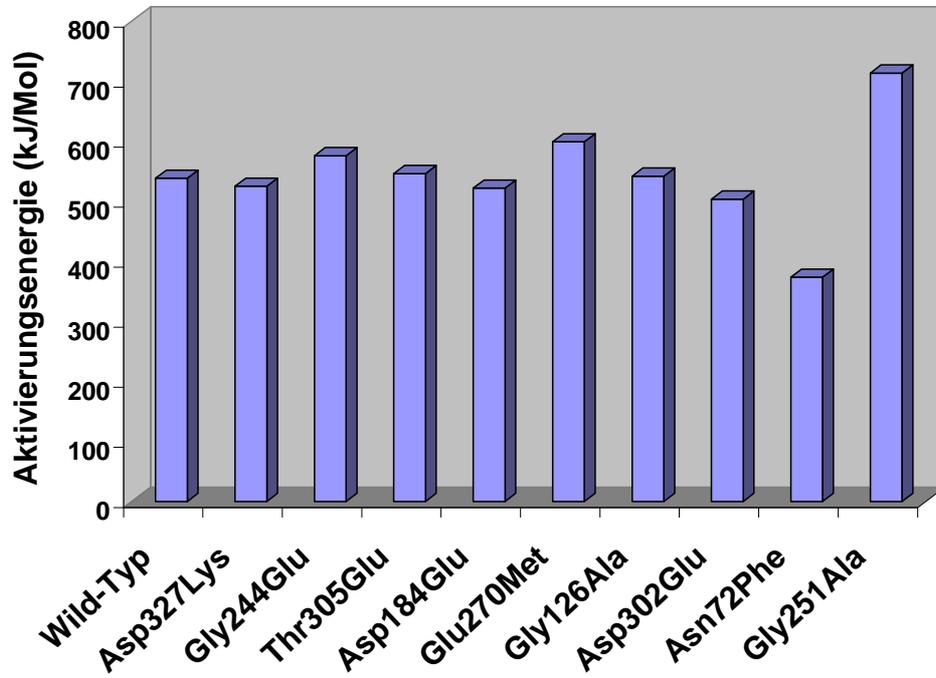


Abbildung 3-27. Vergleich der Aktivierungsenergie der Wild-Typ L-HicDH und ihrer Mutanten

3. ERGEBNISSE

3.8.6 Stabilitätsberechnung mit CUPSAT

CUPSAT (Cologne University Protein Stability Analysis Tool) ist ein Werkzeug zum Vorhersagen der Änderungen in der Proteinstabilität nach Punktmutationen. Dieses Werkzeug ist eine verbesserte Version des Vorhersageprogramms von Leven (Leven, 1999) und wurde von Parthiban Vijayarangakannan weiter entwickelt (Dissertation, Uni-Köln, 2005). Das Vorhersagemodell verwendet Aminosäure-Atompotentiale und Torsionswinkelverteilung, um die Aminosäureumgebung des Mutationsortes zu berechnen. Außerdem kann das Vorhersagemodell in der Aminosäureumgebung Lösungsmittelzugänglichkeit und Sekundärstrukturbesonderheiten des Proteins berücksichtigen.

Die Mutanten der L-HicDH wurden mit diesem Werkzeug analysiert, dadurch wurden die Lösungsmittelzugänglichkeit, der Effekt der Mutation auf die Stabilität und die $\Delta\Delta G$ vorhergesagt.

Mutante Glu270Met

Kette	SS Element	Lösungsmittel-zugänglichkeit	Effekt der Mutation	vorhergesagte $\Delta\Delta G$
A	Faltblatt	18,89 %	destabilisierend	4,93
B	Faltblatt	17,74 %	destabilisierend	6,4
C	Faltblatt	18,32 %	destabilisierend	5,88
D	Faltblatt	18,32 %	destabilisierend	5,32

Mutante Gly251Ala

Kette	SS Element	Lösungsmittel-zugänglichkeit	Effekt der Mutation	vorhergesagte $\Delta\Delta G$
A	Helix	0,0 %	stabilisierend	-3,37
B	Helix	0,0 %	stabilisierend	-3,5
C	Helix	0,0 %	stabilisierend	-3,27
D	Helix	0,0 %	stabilisierend	-4,01

3. ERGEBNISSE

Mutante Gly244Glu

Kette	SS Element	Lösungsmittel-zugänglichkeit	Effekt der Mutation	vorhergesagte $\Delta\Delta G$
A	Helix	22,87 %	destabilisierend	1,84
B	Helix	17,79 %	destabilisierend	2,43
C	Helix	17,79 %	stabilisierend	-7,71
D	Helix	19,06 %	stabilisierend	-4,97

Mutante Asp327Lys

Kette	SS Element	Lösungsmittel-zugänglichkeit	Effekt der Mutation	vorhergesagte $\Delta\Delta G$
A	sonstig	61,76 %	stabilisierend	-1,65
B				
C	sonstig	92,3 %	stabilisierend	-1,55
D	Helix	95,07 %	stabilisierend	-0,3

Mutante Thr305Glu

Kette	SS Element	Lösungsmittel-zugänglichkeit	Effekt der Mutation	vorhergesagte $\Delta\Delta G$
A	Helix	77,87 %	destabilisierend	0,11
B	Helix	74,98 %	stabilisierend	-0,26
C	Helix	86,52 %	destabilisierend	0,03
D	Helix	75,7 %	stabilisierend	-0,49

Mutante Gly126Ala

Kette	SS Element	Lösungsmittel-zugänglichkeit	Effekt der Mutation	vorhergesagte $\Delta\Delta G$
A	Helix	0,0 %	stabilisierend	-0,67
B	Helix	0,0 %	stabilisierend	-0,89
C	Helix	0,0 %	stabilisierend	-1,41
D	Helix	0,0 %	stabilisierend	-1,6

3. ERGEBNISSE

Mutante Asp302Glu

Kette	SS Element	Lösungsmittel-zugänglichkeit	Effekt der Mutation	vorhergesagte $\Delta\Delta G$
A	sonstig	80,5 %	stabilisierend	-0,56
B	sonstig	73,56 %	stabilisierend	-0,92
C	sonstig	70,09 %	stabilisierend	-0,61
D	sonstig	65,93 %	destabilisierend	0,47

Mutante Asp184Glu

Kette	SS Element	Lösungsmittel-zugänglichkeit	Effekt der Mutation	vorhergesagte $\Delta\Delta G$
A	sonstig	74,25 %	stabilisierend	-1,08
B	sonstig	77,03 %	stabilisierend	-0,91
C	sonstig	77,72 %	stabilisierend	-1,84
D	sonstig	78,42 %	stabilisierend	-1,16

Mutante Asn72Phe

Kette	SS Element	Lösungsmittel-zugänglichkeit	Effekt der Mutation	vorhergesagte $\Delta\Delta G$
A	Helix	4,1 %	stabilisierend	-1,33
B	sonstig	5,46 %	destabilisierend	2,29
C	Helix	4,78 %	stabilisierend	-1,57
D	sonstig	4,1 %	stabilisierend	-1,11

* Erläuterung: SS Element = Sekundärstrukturelement; sonstig = nicht Helix und nicht Faltblatt;

Einheit für $\Delta\Delta G$: Kcal/Mol

ΔG : Die Differenz der Gibbsschen freien Energie (ΔG) des gefalteten (G_N) und entfalteten (G_U) Zustandes ($\Delta G = G_U - G_N$). Je größer ΔG ist, desto stabiler ist das gefaltete Protein.

$\Delta\Delta G$: Die Differenz der Gibbsschen freien Energie der Mutante ($\Delta G_{\text{Mutante}}$) und des Wild-Typs ($\Delta G_{\text{Wild-Typ}}$): $\Delta\Delta G = \Delta G_{\text{Mutante}} - \Delta G_{\text{Wild-Typ}}$. Je größer $\Delta\Delta G$ ist, desto stabiler ist die Mutante.

3. ERGEBNISSE

Nach der CUPSAT-Berechnung, wenn der $\Delta\Delta G$ –Wert innerhalb $\pm 0,5$ Bereich liegt, kann keine Aussage über den Effekt der Mutationen getroffen werden.

Tabelle 3-13. Durchschnittswerte der Daten aus CUPSAT

Mutante	Lösungsmittel-Zugänglichkeit	Effekt der Mutation	vorhergesagte $\Delta\Delta G$ (Kcal/Mol)
Glu270Met	18,32 %	destabilisierend	5,63
Gly251Ala	0,0 %	stabilisierend	-3,54
Gly244Glu	19,38 %	In den Untereinheiten A, B: destabilisierend; In den Untereinheiten C, D: stabilisierend	-2,10
Asp327Lys	83,0 %	stabilisierend	-1,17
Thr305Glu	78,77 %	In den Untereinheiten B, D: stabilisierend; In den Untereinheiten A, C: destabilisierend	-0,15
Gly126Ala	0,0 %	stabilisierend	-1,14
Asp302Glu	72,52 %	In den Untereinheiten A, B, C: stabilisierend; In der Untereinheit D: destabilisierend	-0,41
Asp184Glu	76,86 %	stabilisierend	-1,25
Asn72Phe	4,61 %	In den Untereinheiten A, C, D: stabilisierend; In der Untereinheit B: destabilisierend	-0,43

4. DISKUSSION

4.1 Konstruktion des Vektors und Anpassung des Gens

Das Plasmid pET-3d wurde durch BamHI-Spaltung, Klenow-Fill-in und Ligation mit SmaI-*Linker* umkonstruiert. Eine SmaI-Schnittstelle wurde in das Plasmid eingebaut. Das Ergebnis der Sequenzierung des neuen Plasmids zeigte, dass seine Konstruktion erfolgreich durchgeführt wurde. Die Einführung der NcoI-*site* und SmaI-*site* in das Gen und das Einfügen des Gens in den Vektor wurde ebenfalls durch Sequenzierung überprüft. Da die Restriktionsenzyme SmaI und XmaI gleiche Schnittstellen und Schnittmuster haben, können diese beiden Enzyme gleichwertig verwendet werden. Die nachfolgenden Protein-Expressionen zeigen, dass dieses Plasmid ein gut einzusetzender Expressionsvektor ist.

4.2 Konstruktion des Expressionsvektors für L-HicDH mit His-Tag

Expressionsvektoren für L-HicDH Wild-Typ und deren Mutanten mit C-terminalen Hexahistidin-Tag wurden von Shivani Chatterjee *et al* konstruiert (Chatterjee *et al.*, 2005). In dieser Dissertation wurden die L-HicDH und ihre Mutanten mit diesen Expressionsvektoren exprimiert. Betrachtet man die Struktur der L-HicDH (RCSB Protein-Datan Bank; Accession No. 1HYH) scheint der Anhang des His-Tags an den N-Terminus ungeeignet, da dieser in dem Kontaktbereich der Monomere des Tetramers verborgen ist. Der C-Terminus von L-HicDH ist jedoch Lösungsmittel-exponiert und frei zugänglich.

Die Protein-Reinigung der L-HicDH ohne Tag ist aufwendig und schließt Ammonium-Sulfat-Fällung, Entsalzung, Anionenaustauscher-Chromatographie und Gel-Filtration (Feil *et al.* 1994) ein. Der C-terminale His-Tag ermöglicht eine zufriedenstellende Reinigung in einem Schritt

4. DISKUSSION

mittels Affinitätschromatographie. Die Parameter der L-HicDH sind im Ergebnisteil dieser Arbeit unter Punkt 4.2 dargestellt.

4.3 Expression und Reinigung der L-HicDH und ihrer Mutanten

Die Wild-Typ L-HicDH und ihre Mutanten wurden in *E. Coli* BL21(DE3) exprimiert. Es liegt als lösliches Protein im Cytoplasma vor, wobei die Bildung von Einschlusskörpern, so genannten *Inclusion Bodies*, nicht beobachtet wurde. Daher befand sich das Enzym nach dem Aufschluss der Zellen mit Hilfe der „French-Press“ und anschließender Zentrifugation im Überstand des Zell-Lysats. An dem C-Terminus der Wild-Typ L-HicDH und deren Mutanten wurde ein His-Tag angehängt, was ermöglichte das Enzym in einem Schritt zu reinigen. Die Reinigung des Enzyms aus dem Zell-Lysat erfolgte über eine Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose. Die durch Ni-NTA-Agarose gereinigte Wild-Typ L-HicDH und deren Mutanten wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Trennung wurde das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt, und zeigte eine einzelne Bande bei etwa 35 KDa. Die Reinheit der L-HicDH und ihrer Mutanten ist somit zufriedenstellend.

4.4 Enzymaktivität

4.4.1 Spezifische Enzymaktivität der L-HicDH Wild-Typ und deren Mutanten in Abhängigkeit vom pH-Wert

Die Eigenschaften von Proteinen können durch die lokale physikalische und chemische Umgebung beeinflusst werden, in der sie sich befinden. Wichtige Faktoren sind pH-Wert,

4. DISKUSSION

Salze, Lösungsmittel und Temperatur. Der Faktor, der die Aktivität vieler Enzyme hauptsächlich beeinflusst, ist der pH-Wert, da Enzyme die für die katalytischen Funktionen geeigneten Protonierungszustände benötigen. Diese hängen ganz entscheidend vom jeweiligen pH-Wert ab. Bei stark basischen oder sauren Bedingungen können die Proteine erheblich destabilisiert werden, wodurch das aktive Zentrum des Enzyms die für seine katalytischen Eigenschaften geeigneten Protonierungszustände oder seine Struktur verliert. Daher zeigt die Wild-Typ L-HicDH bei Bedingungen unter pH 5 bzw. über pH 9 einen erheblichen Aktivitätsverlust. Bei einem pH-Wert unterhalb von 5 und oberhalb von 9 wurde Aggregationen der Wild-Typ L-HicDH und ihrer Mutanten beobachtet. In Tabelle 3-2 und Abbildung 3-7 sind die spezifischen Aktivitäten von Wild-Typ L-HicDH und ihren Mutanten bei verschiedenen pH-Bedingungen zu sehen. Im Vergleich hat die Mutante Asp327Lys die höchste Aktivität bei pH 6,0, pH 7,0 und pH 8,0. Ein Grund hierfür ist, dass das positiv geladene Lys das Dipolmoment der α -Helix kompensiert und diese Kompensierung und die Einführung einer positiven Ladung in diesem Bereich die für den katalytischen Mechanismus geeigneten Protonierungszustände begünstigt. Die Mutante Asp184Glu und Glu270Met zeigen erhöhte Aktivität bei allen pH-Bedingungen. Die anderen vier Mutanten Gly251Ala, Gly126Ala, Gly244Glu und Asp302Glu besitzen bei pH 6,0 eine höhere Aktivität als die Wild-Typ L-HicDH. Bei den Mutanten Thr305Glu und Ans72Phe haben sich die Enzymaktivitäten durch den Austausch von Aminosäuren erheblich verringert. Für Mutante Asn72Phe ist es möglich, dass die Enzymstruktur durch die große Seitenkette von Phenylalanin erheblich beeinflusst wird. In Mutante Thr305Glu wurde ein Threonin durch ein negativ geladenes Glutamat ausgetauscht. Die mögliche Ursache für die im Vergleich zum Wild-Typ erniedrigte Aktivität ist, dass die negativ geladene Seitenkette an dieser Position mit dem Asp306 und Glu307 zu einer ungünstigen Ladungsverteilung innerhalb der α -Helix H führt, wodurch die Struktur der katalytischen Domäne erheblich geändert wird.

4. DISKUSSION

4.4.2 Auswirkung der Temperatur auf die Enzymaktivität der L-HicDH Wild-Typ und ihre Thermostabilität

Die Auswirkung der Temperatur auf die Enzymaktivität und Thermostabilität des Enzyms liefert unterschiedliche Informationen über das Enzym. Die Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität der L-HicDH wurde untersucht (Abbildung 3-6.) und die maximale Temperatur, bei der das Enzym seine Aktivität erhalten kann, wurde in der Nähe von 50°C gefunden. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Schütte *et al* gemessenen Ergebnis (Schütte *et al*, 1984) überein. Unter diesen Bedingungen zeigt das Enzym in DSC-Messungen einen T_M -Wert von 59.65°C. Dies bedeutet, dass der Schmelzpunkt des Enzyms und die maximale Temperatur der Enzymaktivität unterschiedlich sind und die Temperatur bereits großen Effekt auf die Enzymaktivität hat, bevor sie den Schmelzpunkt erreicht, also bevor das Enzym durch thermale Entfaltung seine Aktivität verliert.

4.4.3 Effekt von Mutationen auf die kinetischen Parameter

Tabelle 3-3 und Abbildung 3-8 repräsentieren das Fließgleichgewicht (*steady-state*) der katalytischen Eigenschaften der Wild-Typ L-HicDH und ihrer Mutanten. Alle Mutanten zeigen unterschiedliche Enzym-Aktivitäten, im Vergleich zum L-HicDH-Wild-Typ Enzym, obwohl die gezielten Mutationen außerhalb des aktiven Zentrums liegen. Thermostabilisierung eines Enzyms stellt eine Herausforderung für das Protein-Design dar, weil die Substrat-Geometrie des aktiven Zentrums und das molekular-dynamische Verhalten während der enzymatischen Reaktion oft sehr auf maximale katalytische Effizienz ausgerichtet ist (Kraut *et al.*, 2003, Daniel *et al.*, 2003). Daher muss die Design-Methode in der Lage sein, für thermostabilisierende Mutanten jeden *Shift* in der Hauptkette innerhalb einer bestimmten Faltung zu minimieren, die die Struktur des aktiven Zentrums oder ihre Flexibilität stören könnte. Aus den Ergebnissen über die katalytischen Eigenschaften der Mutanten kann man

4. DISKUSSION

sagen, dass die Mutanten Asp327Lys, Glu270Met, Gly251Ala, Gly126Ala, Asp184Glu und Asp302Glu diese strukturellen Anforderungen erfüllen.

Der K_M -Wert der Mutanten liegt oberhalb des K_M -Werts der Wild-Typ L-HicDH. Dieses Ergebnis bedeutet, dass die Bindungsaffinitäten der Mutanten zum Substrat durch den Austausch der jeweiligen Aminosäure im Vergleich zum Wild-Typ gesunken sind. Nur die Mutante Asp184Glu zeigt eine verbesserte Bindungsaffinität zum Substrat mit einem K_M Wert von 34,8 μM .

Der K_{cat} -Wert der Mutanten wurde durch den Austausch der Aminosäure unterschiedlich beeinflusst. Bei den Mutanten Thr305Glu, Asp184Glu und Asn72Phe ist der K_{cat} -Wert gesunken; bei den Mutanten Asp327Lys, Glu270Met, Gly251Ala, Gly126Ala und Gly244Glu ist er gestiegen.

Die Mutante Asn72Phe zeigt einen kleinen Wert der maximalen Umsatzgeschwindigkeit, obwohl die Bindungsaffinität des Enzyms zum Substrat ähnlich der der Wild-Typ L-HicDH ist. Die Mutante besitzt durch die geringere Umsatzrate eine verminderte Enzym-Effizienz. Die Mutante Gly244Glu besitzt eine geringe Bindungsaffinität zum Substrat, wodurch die Mutante eine geringe Enzym-Effizienz zeigt.

Die Mutanten Asp327Lys, Asp184Glu und Glu270Met zeigen hohe maximale Umsatzgeschwindigkeiten, wodurch sie höhere Enzym-Effizienzen besitzen als der Wild-Typ. Die Mutanten Asp302Glu und Gly251Ala zeigen eine Enzym-Effizienz im Bereich des Wild-Typs.

Aus dem Vergleich von K_M -, K_{cat} - und K_{cat}/K_M Wert der Mutanten mit dem Wild-Typ ist zu sehen, dass sechs Mutanten für die Thermostabilisierung des Enzyms unter vergleichbaren katalytischen Eigenschaften geeignet sind. Diese Mutanten sind: Gly126Ala, Asp184Glu, Gly251Ala, Glu270Met, Asp302Glu und Asp327Lys.

4. DISKUSSION

4.5 Der Effekt der Anwesenheit des Liganden (NADH) auf die Thermostabilität der L-HicDH

Der T_m -*Shift* steigt mit der Ligandkonzentration selbst über die Schmelztemperatur ohne Ligand. Dieser Effekt tritt selbst dann auf, wenn das Protein bereits mit Liganden gesättigt ist. Eine Erklärung könnte sein, dass die Bindungen zwischen Ligand und Protein das Protein in einer stabilen Konformation hält. Wenn dies der Fall wäre, dann würde jedoch keine weitere Stabilisierung entstehen, sobald alle Proteine gesättigt sind. Aus thermodynamischer Sicht ergibt sich die gesteigerte Stabilität aus der zusätzlichen freien Energie, die zum Zeitpunkt der Entfaltung für die Entfernung des Liganden aus dem Protein benötigt wird. Diese freie Energie besitzt eine Komponente, die sich aus der Entropie des Mischens von abgelösten Liganden in der Lösung ergibt. Dieser Wert hängt nicht von der Proteinkonformation aber von der relativen Konzentration des freien Liganden in der Lösung ab.

4.6 Thermale Entfaltung der L-HicDH und ihrer Mutanten

Die thermale Entfaltung der L-HicDH und ihrer Mutanten wurde mit der differentiellen *Scanning*-Kalorimetrie bei verschiedenen pH-Bedingungen untersucht und die thermodynamischen Parameter T_M , ΔH_{cal} und ΔH_{vH} ermittelt. Mit Hilfe dieser Werte kann die Thermostabilität der L-HicDH und ihrer Mutanten verglichen werden.

Ein großes ΔH bedeutet, dass eine große Menge von Energie für die Entfaltung benötigt wird, dies wiederum bedeutet, dass das Protein im nativen Zustand eine hohe strukturelle Stabilität besitzt. Ein hoher T_m deutet ebenfalls an, dass das Protein eine hohe Stabilität besitzt.

4. DISKUSSION

Im Vergleich zum Wild-Typ hat die Mutante Gly251Ala bei allen drei pH-Bedingungen durch erhöhte T_M -Werte eine erhöhte Thermostabilität gezeigt, nämlich bei pH 6,0 mit einer Erhöhung von 3,25°C auf 65,80°C, bei pH 7,0 mit 6,19°C auf 61,27°C und bei pH 8,0 mit 4,32°C auf 48,39°C. In diesem Vergleich reicht die Spannweite der Temperaturunterschiede von 44,07°C (Wild-Typ bei pH 8,0) bis 65,80°C (Gly251Ala bei pH 6,0) bei den verschiedenen pH-Bedingungen. Das Thermostabilisierungsdesign der L-HicDH hat bei Mutante Gly251Ala erfolgreich zu einem erhöhten Schmelzpunkt geführt. Gleichzeitig hat diese Mutante für eine industrielle Anwendung geeignete katalytische Eigenschaften.

Die anderen sechs Mutanten Asp327Lys, Glu270Met, Thr305Glu, Gly126Ala, Asp320Glu und Asp184Glu besitzen nahezu gleiche Schmelzpunkte wie der Wild-Typ bei den verschiedenen pH-Bedingungen.

Die Mutante Asn72Phe hat niedrigere Schmelzpunkte bei den pH-Bedingungen als der Wild-Typ, Mutante Gly244Glu hat einen höheren Schmelzpunkt mit 46,14°C bei pH 8,0 als der Wild-Typ, aber bei pH 7,0 und pH 6,0 einen niedrigeren Schmelzpunkt als das L-HicDH-Wildtyp-Protein.

Auf die kalorimetrische Enthalpie bezogen zeigen die Mutanten Gly251Ala und Glu270Met deutliche Steigerungen der Enthalpieänderungen bei pH 6,0 und pH 7,0, bei pH 8,0 jedoch liegt die Enthalpieänderungen niedriger als beim Wild-Typ.

Weitere bemerkenswerte Erhöhungen der Enthalpieänderung sind bei den Mutanten Asp327Lys bei pH 8,0, Gly244Glu bei pH 6,0, Thr305Glu bei pH 6,0 und Asp184Glu bei pH 6,0 zu sehen. Bei der Mutante Asp327Lys ist verständlich, dass die Einführung der positiven Ladung an der Oberfläche die Thermostabilität der Mutante im sauren Milieu erhöht ist. Bei den Mutanten Gly244Glu, Thr305Glu und Asp184Glu hat die Einführung der negativen Ladung an der Oberfläche des Enzyms eine stabilisierende Wirkung bei basischen Bedingungen.

Die Mutante Asn72Phe zeigt im Vergleich zum Wild-Typ sehr niedrige Enthalpieänderungen und T_M bei allen pH-Bedingungen. Offensichtlich ist die Stabilität des Proteins durch den Aminosäure-Austausch erheblich nachgelassen. Phenylalanin hat eine große aromatische

4. DISKUSSION

Seitenkette. Diese große Seitenkette könnte die kompakte Packung des Proteins stören und dadurch die Verlauf der Hauptkette geändert werden kann. Diese Strukturänderung führt auch zu einem erheblichen Aktivitätsverlust in dieser Mutante.

Kräfte, die zur Proteinstabilität beitragen, sind ein weit diskutiertes Thema. Diese Kräfte schließen beispielsweise die elektrostatischen Wechselwirkungen ein. Ungünstige Ladungsverteilungen auf der Proteinoberfläche können zur Destabilisierung von Proteinen führen. Andererseits können die elektrostatischen Wechselwirkungen zur Proteinstabilisierung beitragen, indem ionische Wechselwirkungen (Salzbrücken) zwischen solchen Resten ausgebildet werden, die gegenseitig geladen sind.

4.7. CD-Messungen

Um die mit DSC gemessenen Schmelzpunkte der Wild-Typ L-HicDH und ihrer Mutanten zu überprüfen, wurden die Schmelzpunkte der Wild-Typ L-HicDH und einiger Mutanten mit DSC und CD in gleichem Puffer (5mM Kaliumphosphat ohne Salz) bei verschiedenen pH-Bedingungen gemessen. Die erhaltenen Ergebnisse stimmen für die einzelnen Proteine überein. Alle CD-Messungen wurden mit *up-scan* (20 → 80°C) und *down-scan* (80 → 20°C) in beide Richtungen durchgeführt, wobei keine Messung mit *down-scan* isodichoren Punkten gefunden wurden. Hiermit ist die Irreversibilität der Denaturierung überprüft worden.

4.8 Charakterisierung der Denaturierung der Wild-Typ L-HicDH

Für eine vollständige Charakterisierung eines Proteins benötigt man Informationen über die Energetik des Systems. Diese Information kann mit Hilfe von thermalen Denaturierungsuntersuchungen erhalten werden. Differentielle Scanning Kalorimetrie (DSC)

4. DISKUSSION

ist ein Beispiel für eine effiziente Methode zur Abschätzung der Proteinstabilität und der Interaktion zwischen Untereinheiten (Privalov *et al.*, 1986, Ladbury and Chowdhry, 1998).

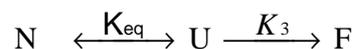
pH-Abhängigkeit

Das differentielle *scanning*-Kalorimetrie (DSC) ermöglicht eine direkte Erforschung des Einflusses vom pH auf die Thermostabilität von Proteinen. Ein Faktor, der die Aktivität vieler Enzyme in großem Maße beeinflusst, ist der pH-Wert. Für solche Enzyme gilt, dass die katalytischen Reste in ihrem aktiven pH Bereich die geeigneten Protonierungszustände haben. Mit den raschen Fortschritten in der strukturellen Biologie kann der Mechanismus der biologischen Funktionen von Proteinen durch die molekularen Kräfte beschrieben werden. Jedoch garantiert die Erkenntnisse der Protein-Struktur allein keine exakte Vorhersage der Funktion und biologischen Aktivität.

Zur völligen Charakterisierung spezifischer biomolekularer Wechselwirkungen und der biologischen Aktivität werden thermodynamische Parameter benötigt. Thermodynamik liefert Informationen über energische Kräfte, die die biomolekularen Wechselwirkungen antreiben.

Scan-Rate Abhängigkeit

Die *Scan-Rate*-Abhängigkeit kann als ein Indikator für eine zumindest zum Teil kinetische Kontrolle eines Schmelzprozesses betrachtet werden. Das Lumry-Eyring-Reaktionsschema ist ein Modell, das für die Modellierung der irreversiblen Denaturierung verwendet werden kann. In diesen Modell führt ein natives Protein (N) zwei Übergänge durch: eine Gleichgewichtsübergang zu einem entfalteten Zustand (U), die einen kinetischen Übergang zu einem irreversibel denaturierten Zustand (F) durchführt:



Irreversibilität

4. DISKUSSION

Da die thermal induzierte Denaturierung von L-HicDH und seiner Mutanten irreversibel ist und es kein thermodynamisches Gleichgewicht in diesem Prozess gibt, kann die Gibbsche-Energie nicht aus dem ersten Scan extrahiert werden (Sanchez-Ruiz *et al.*, 1988). Die thermal induzierte Entfaltung kleiner, monomerer, globulärer Proteine ist meistens reversibel und kann durch ihre Stabilität thermodynamisch charakterisiert werden (Privalov, P.L., 1979; Murphy and Freire, 1992). In dieser Arbeit wurde die Stabilität der L-HicDH und ihrer Mutanten durch irreversible Denaturierung in Hinblick auf ihre kinetische Stabilität hin charakterisiert. Aus der Analyse der DSC-Daten mit dem „Ein-Schritt irreversiblen Modell“ können auch die thermodynamischen Parameter, z.B. der Schmelzpunkt und die Enthalpie-Änderung ermittelt werden.

Extreme Kooperativität

Es wird allgemein angenommen, dass extreme Kooperativität nur in den kleinen Molekülen mit dichter Verpackung der Gruppen erzielt wird (Privalov, P.L, 1992 *Protein Folding*). Dieses ist offensichtlich nicht der Fall für die große multimeren L-HicDH. Diese extreme Kooperativität ergibt sich aus dem gleichzeitigen Zerfallen aller strukturellen Elemente und der außergewöhnlichen Entfaltung dieses großen Proteins (D'Amico, S., *et al.*, 2001). Dies wiederum reflektiert die Stabilisierungsrolle der Oligomerisierung in diesem Enzym.

Ursache für die irreversible Denaturierung

Ursache für die irreversible Proteindenaturierung könnte die Aggregation von Protein, Deaminierung von Asparagin und/oder Glutaminresten, Isomerisierung von Prolinresten, Abtrennung von Untereinheiten, sowie Autolyse sein (Ahern *et al.*, 1985; Zale *et al.*, 1986; Abbildung 5-1). Irreversible Denaturierung wird generell auf diese Veränderungen zurückgeführt und schließt das Protein in einem Zustand (der finale Zustand: F) ein. In diesem finalen denaturierten Zustand ist das Protein nicht in die Lage zur nativen Struktur zurückzufalten (Sanchez-Ruiz, 1995; Klibanov *et al.*, 1987). Obwohl die thermal induzierte Denaturierung keine Reversibilität besitzt, kann das DSC-Thermogramm für die thermale

4. DISKUSSION

Denaturierung einiger Proteine anhand der van't Hoff-Gleichung interpretiert werden (Manly *et al.*, 1985; Edge *et al.*, 1985; Hu *et al.*, 1987). Eine Voraussetzung hierfür ist, dass eine irreversible Änderung des entfalteten Zustandes mit kleinem Wärmeeffekt bei einer Temperatur eintritt, die höher ist als die Temperatur, bei der sich der kalorimetrische Übergang ereignet (Sanchez-Ruiz *et al.*, 1988).

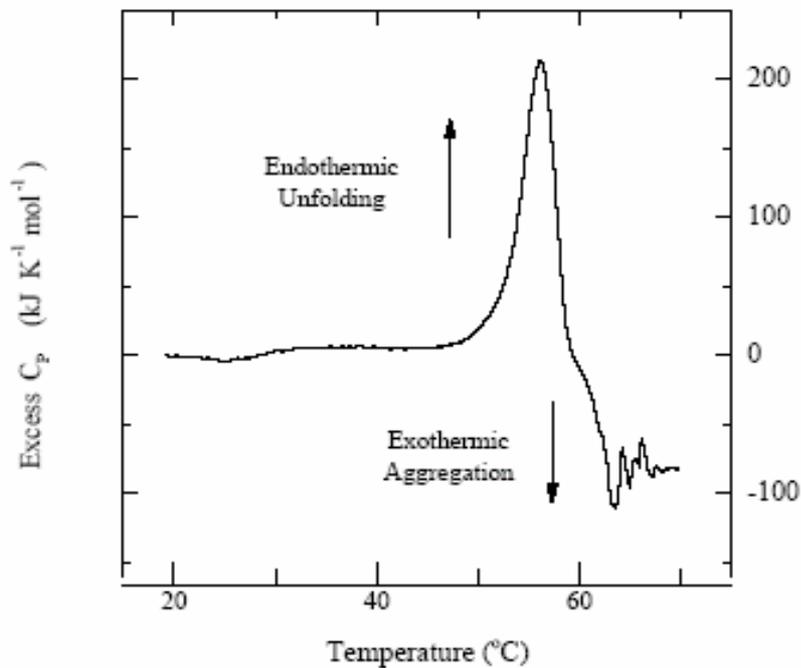


Abbildung 4-1. Irreversible Denaturierung von Protein durch Aggregation (Übernommen aus Alan Cooper, 2000)

Die Reversibilität der thermalen Denaturierung der L-HicDH und seiner Mutanten wurde durch einen *Rescan* geprüft, bei der das Protein sowohl nach völliger Denaturierung als auch nach der Erhitzung bis zum T_m und der darauf folgenden langsamen Abkühlung ein weiteres mal gemessen wurde. Das zweite Thermogramm zeigt keinen thermalen Effekt. Im Thermogramm

4. DISKUSSION

der ersten Messung ist jedoch eine typische exotherme Aggregationsspur erkennbar (Abbildung 3-23 und Abbildung 3-24 im Ergebnisteil.)

Thermodynamische Stabilität und kinetische Stabilität

Proteinstabilität umfasst sowohl thermodynamische als auch kinetische Aspekte. Die thermodynamische Stabilität von Proteinen könnte grenzwertig (*marginal*) sein (Fersht, *et al.*, 1999; Taverna, *et al.*, 2002). Die meisten globulären Proteine sind grenzwertig stabil mit einem ΔG (Differenz der freien Energie zwischen dem gefalteten und entfalteten Zustand) von ca. -10 kcal/mol, was gesteigerte Funktionalität darstellt, da grenzwertige Stabilität mit gesteigerter Proteinflexibilität korreliert werden könnte (Taverna, *et al.*, 2002). Die kinetische Stabilität eines Proteins resultiert aus der Energiehürde, die zwischen gefaltetem und entfaltetem Zustand existiert. Ist diese Hürde hoch, macht dies die Entfaltungsreaktion langsam, wodurch der gefaltete Zustand des Proteins selbst dann stabilisiert wird, wenn die thermodynamische Stabilität gering ist (Forrer *et al.*, 2004). Forrer *et al.* haben auf molekularer Ebene gezeigt, dass Protein-Oligomerisierung eine natürliche Strategie ist, um kinetische Stabilität zu erreichen (Forrer *et al.*, 2004).

Ein Effekt der Proteinkonzentration auf den T_m -Wert der Denaturierung der tetrameren L-HicDH wurde nicht beobachtet. Dies bedeutet, dass die Dissoziation der Tetramere vor dem Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt nicht stattfindet. Nach dem Geschwindigkeitsbestimmenden Übergangspeak ist kein weiterer Peak im DSC-Thermogram beobachtet worden. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass das gefaltete Tetramer direkt und spontan zu den entfalteten Monomeren umgewandelt wurde. Das heißt mit anderen Worten, dass die thermal induzierte Denaturierung von L-HicDH eng mit der Dissoziation der Untereinheiten verbunden ist.

Aktivierungsenergie des kinetisch bestimmenden Schritts

Die Aktivierungsenergie der thermalen Entfaltung der Wild-Typ L-HicDH wurde mit drei unterschiedlichen Methoden bestimmt. Die Werte der Aktivierungsenergie wurden mit einem

4. DISKUSSION

Mittelwert von $538,10 \pm 55,88$ kJ/Mol bestimmt (Tabelle 3-9). Diese Abweichung zeigt, dass das Ein-Schritt-Modell kein realistisches Modell beschreibt (Kurganov *et al.*, 1997; Sanchez-Ruiz *et al.*, 1988; Lyubarev *et al.*, 1998; Stirpe *et al.*, 2005). Andererseits ist das irreversible Ein-Schritt-Modell ein Sonder Fall des Lumry-Eyring-Modells. Bei diesem Fall sollte ein zusätzlicher Intermediat-Schritt berücksichtigt werden. Dieser kann sowohl reversibel wie irreversibel sein (Stirpe *et al.*, 2005). Stirpe *et al.* analysierten das klassische Lumry-Eyring-Modell in zwei Schritten. Die mit dem reversiblen Schritt assoziierte Enthalpie-Änderung (ΔH_U) und die mit dem irreversiblen Schritt assoziierte Enthalpie-Änderung (ΔH_F) wurden durch eine optimale Kurvenanpassung ermittelt. Trotz der großen Abweichung könnte der Ausgangswert der Aktivierungsenergie bei dieser Kurvenanpassung aus der Arrhenius-Analyse abgeschätzt werden (Stirpe *et al.*, 2005; Guzzi, R. *et al.*, 1996).

In dieser Arbeit wurde die Aktivierungsenergie der thermal induzierten Denaturierung der L-HicDH von 538,10 kJ/Mol mit Hilfe der Arrhenius-Analyse abgeschätzt. Dieser Wert stellt den Mittelwert der Methoden 1, 2 und 3 dar.

Hydrophobizität in Zusammenhang mit der tetrameren Struktur

Durch die rasch steigenden strukturellen Informationen über Proteine, ist ersichtlich geworden, dass hydrophobe Effekte dominant treibende Kräfte in der Protein-Faltung sind (Sandeep Kumar *et al.*, 2000 und Dill, K. A. 1990). Daher wird vermutet, dass thermophile Proteine wesentlich hydrophober sind (Haney *et al.*, 1997) und im Vergleich zu ihren mesophilen Gegenstücken ein größerer Teil der Oberfläche aufgrund von Oligomerisierung bedeckt ist (Salminen *et al.*, 1996).

Einige Strukturvergleiche an mesophilen und thermophilen Proteinen haben ähnliche Ergebnisse gezeigt, wozu reduzierte Oberflächen und eine gestiegene Anzahl von verdeckten Resten (d.h. dichte Packung des Proteins) gehören. Kontaktflächen zwischen Proteinen sind oft hydrophober als ihre Außenseiten; aber weniger hydrophob als das Innere eines Proteins. In einer Studie waren 47% der interagierenden Aminosäurereste hydrophob, 31% polar und 22%

4. DISKUSSION

geladen (Uetz, P. *et al.*, 2005). Stabile Komplexe haben Kontaktflächen mit hydrophoben Resten, während die Kontaktflächen in instabilen Komplexen eher polare Reste bevorzugen. In der Aminosäurezusammensetzung der L-HicDH sind 52,9% der Aminosäurereste hydrophob, 24,5% geladen und 22,6% polar. Dieser höhere Anteil an hydrophoben Aminosäureresten kann durch Tetramerisierung in dem Kontaktbereich oder durch Einbettung im Inneren des Proteins erklärt werden.

Der Großteil der Stabilitätsforschung ist auf die thermodynamische Charakterisierung kleiner, monomerer, globulärer Proteine fokussiert (Privalov, P.L., 1979; Murphy and Freire, 1992). Wegen des hohen Maßes an Irreversibilität der Entfaltung und der Komplexität des gesamten Prozesses, gibt es wenige Untersuchungen zu oligomeren Proteinen.

In den letzten Jahren sind die Mechanismen, die die hohe Stabilität von Proteinen aus hyperthermophilen Organismen verursachen, intensiv erforscht worden. Ein Großteil der bisher erhaltenen Daten stammt aus thermophilen Proteinen, deren dreidimensionale Struktur mit ihren mesophilen Gegenstücken verglichen worden ist. Diese Vergleiche zeigen, dass die Thermostabilität eines Proteins eine Eigenschaft ist, die nur winzige strukturelle Änderungen benötigt, wodurch eine Optimierung stabilisierender hydrophober und /oder hydrophiler Interaktionen erreicht wird (Spasov *et al.*, 1995; Jaenicke and Bohm, 1998). Interaktionen zwischen den Untereinheiten stabilisieren das gesamte Protein. Steif *et al.* berichten, dass die Wechselwirkungen der Untereinheiten einen signifikanten Beitrag zur Stabilisierung von dimeren Proteinen liefern (Steif C *et al.* 1993). Aus der gesamten Untersuchung der thermal induzierten Denaturierung der L-HicDH und ihrer Mutanten kann man eine Schlussfolgerung ziehen. Es gibt nämlich einen engen Zusammenhang zwischen Stabilität und Hydrophobizität: man kann durch Erhöhung der Hydrophobizität im Kontaktbereich zwischen den Tetrameren eine gesteigerte Stabilität der L-HicDH erzielen. Ein Beweis für diesen Zusammenhang stellt die Stabilisierung der L-HicDH durch die Mutanten Gly251Ala und Glu270Met dar. Bei der Mutante Gly251Ala und der Mutante Glu270Met befindet sich die Position der Mutationen in den Kontaktstellen der Tetramere. Die kleinen hydrophoben Aminosäuren Alanin und Methionin erhöhen die Hydrophobizität dieses Bereiches. Aufgrund der Dissoziation der

4. DISKUSSION

Tetramere, die zur irreversiblen Denaturierung führt, hat die Stabilisierung der tetrameren Struktur höchste Priorität bei dem Protein-Design zur Erhöhung der Thermostabilität der L-HicDH. Für eine weitere Stabilisierung der L-HicDH oder eine Stabilisierung von oligomeren Proteinen ist diese Strategie bedeutend.

4.9 Vergleich der Stabilität der Wild-Typ L-HicDH und ihrer Mutanten

4.9.1 Vergleich der Mutanten mit den Statistischen Daten aus *ProTherm*

Die thermodynamische Datenbank *ProTherm* gibt statistische Daten über die Häufigkeit von Aminosäureresten an der Mutationsstelle (Tabelle 4-1) an. Aus diesen Daten kann man einen Überblick über den gezielten Austausch der Aminosäuren gewinnen. Hieraus ergeben sich einige Favoriten für die Thermostabilisierung von Proteinen.

4. DISKUSSION

Tabelle 4-1. Häufigkeit der Aminosäurereste an den Mutationsstellen (Aus ProTherm)

To																					
	Gly	Ala	Val	Leu	Ile	Cys	Met	Phe	Tyr	Trp	Pro	Ser	Thr	Asn	Gln	Asp	Glu	Lys	Arg	His	
From	Gly	---	205	55	5	0	9	0	10	2	6	9	54	2	4	24	26	17	6	15	5
	Ala	76	---	108	54	22	19	26	21	7	10	72	66	46	6	15	16	7	21	4	8
	Val	66	361	---	230	233	38	62	76	29	15	6	44	78	25	0	24	11	8	22	11
	Leu	26	260	105	---	76	37	38	50	2	4	17	4	14	1	4	13	28	3	10	3
	Ile	29	178	356	208	---	23	62	87	11	6	7	20	57	3	0	6	19	9	0	0
	Cys	4	123	16	26	1	---	2	2	2	1	0	100	86	0	0	0	4	0	0	0
	Met	17	50	33	119	43	1	---	17	0	0	0	0	6	1	0	6	6	16	3	2
	Phe	5	115	16	100	14	3	10	---	60	42	0	16	3	17	0	4	2	5	0	5
	Tyr	25	82	4	24	2	19	1	165	---	58	4	10	4	6	8	9	1	4	2	9
	Trp	0	24	0	14	0	3	0	66	57	---	0	0	0	0	5	0	0	0	1	7
	Pro	60	125	5	17	2	5	0	4	2	4	---	29	8	4	5	4	3	2	5	3
	Ser	25	163	17	12	10	20	2	13	6	2	6	---	24	14	4	61	5	8	20	17
	Thr	31	153	90	9	53	25	7	15	9	0	3	92	---	18	14	16	58	1	29	17
	Asn	30	111	5	5	47	1	11	4	0	0	0	26	9	---	4	88	14	2	11	9
	Gln	31	45	2	22	3	3	2	3	4	0	9	5	1	2	---	7	24	14	12	4
	Asp	40	136	8	9	6	27	4	7	3	5	10	20	10	124	11	---	33	8	9	21
	Glu	41	202	56	36	4	8	15	23	26	3	6	15	10	11	58	23	---	25	27	11
	Lys	80	141	20	8	19	7	34	43	18	27	20	9	14	21	17	12	70	---	58	35
	Arg	36	96	0	7	0	19	15	3	0	0	1	8	2	0	16	0	65	25	---	65
	His	37	89	4	46	0	4	0	5	12	2	20	6	21	46	25	18	12	4	12	---

0-50: Blau ; 51-100: Magenta ; >100: Rot

Laut dieser statistischen Daten sind die Mutanten Gly126Ala und Gly251Ala. Bevorzugte Kandidaten für eine erhöhte Thermostabilität (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2. Häufigkeit der ausgewählten Mutanten in ProTherm

Mutanten	Häufigkeit in ProTherm	Mutanten	Häufigkeit in ProTherm
Asp327Lys	8	Gly126Ala	205
Gly244Glu	17	Asp302Glu	33
Thr305Glu	58	Asn72Phe	4
Asp184Glu	33	Gly251Ala	205
Glu270Met	15		

* Erläuterung: *ProTherm* gibt die Häufigkeit des Aminosäure-Austausches aber nicht in Abhängigkeit von der Position an.

4. DISKUSSION

4.9.2 Typische Aktivierungsenergie für die Proteinfaltung

Im Vergleich zu typischen Aktivierungsenergien der Entfaltung von nativen Proteinen, die in den letzten Jahren in der Literatur beschrieben worden sind, ist die Aktivierungsenergie von 525-538 KJ.mol⁻¹ der Wild-Typ L-HicDH relativ hoch (Arnould *et al.*, 1998; Baier and McClements, 2001; Banerjee and Kishore, 2004; Baptista *et al.*, 2000; Bell *et al.*, 1995; Das *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2003; Kar *et al.*, 2002; Kaushik *et al.*, 2002; Kidric *et al.*, 2002; Mehta *et al.*, 2003a,b; Shin *et al.*, 1998). Der Überblick von Literaturwerten zeigt, dass native Proteine eine Aktivierungsenergie der Proteinfaltung generell im Bereich von 100–500 kJ/mol besitzen. Das heißt, dass der native tetramere Zustand der L-HicDH kinetisch sehr stabil ist. Die Mutationen Gly251Ala, Gly244Glu und Glu270Met führen zu einer weiteren Erhöhung der kinetischen Stabilität. Vor allem führt die Mutation Gly251Ala nicht nur zur kinetischen Stabilisierung, sondern auch zur höheren Thermostabilität.

4. DISKUSSION

4.9.3 Strategie zur Stabilisierung von Proteinen

Die Strategie zur Stabilisierung von Proteinen ist in den letzten Jahren immer weiter entwickelt worden. In dieser Arbeit wurde die Stabilisierung von L-HicDH durch spezifische Mutagenese vorgenommen. Die Strategie, die dahinter stand, war die Erhöhung der Hydrophobizität im Kontaktbereich zwischen den Tetrameren oder im Inneren des Proteins. Am Beispiel der Mutanten Gly251Ala und Glu270Met führte diese Strategie nicht nur zur kinetischen Stabilisierung, sondern auch zur Thermostabilisierung. Die Erhöhung der Aktivierungsenergie bei den Mutanten Gly251Ala und Glu270Met zusammen mit der Erhöhung vom Schmelzpunkt der Mutante Gly251Ala und der Erhöhung der kalorimetrischen Enthalpieänderung bei den Mutanten Gly251Ala und Glu270Met sind Beweise für den Erfolg dieser Strategie. Darüber hinaus behielten die stabilisierten L-HicDH Varianten ihre Enzymaktivität (Abbildung 3-7 und Abbildung 3-8).

4.9.4 Vorhersageprogramme für die Stabilität von Proteinen

Das angewendete Vorhersageprogramm CUPSAT und das Programm von Leven zur Berechnung der Aminosäure-Atom- und Torsionswinkel-Potentiale zeigten eine gute Übereinstimmung mit den Messergebnissen der untersuchten Mutanten. Dadurch bestätigte sich die Vorhersagegenauigkeit dieser Programme. Es kann sich somit als sehr hilfreich erweisen, um nach weiteren Stabilisierungsmöglichkeiten der L-HicDH oder anderer Proteine mittels Aminosäureaustauschs zu suchen.

In CUPSAT wird Lösungsmittel-Zugänglichkeit als Maß der Kompaktheit verwendet (*volume*). CUPSAT kann dieses verbessern, indem es C α -Atom-Packung als Maß der Kompaktheit verwendet. Dies könnte effizient sein, um die Raumbeanspruchung der Aminosäuren zwischen dem Wild-Typ und den Mutanten zu unterscheiden. Zum Beispiel beansprucht die Aminosäure Phenylalanin der Mutante Asn72Phe wegen ihrer großen aromatischen Seitenkette einen größeren Raum als die im Wildtyp vorliegende Aminosäure

4. DISKUSSION

Asparagin. Diese Volumenänderung könnte nicht in der Berechnung der Änderung der Gibbschen freien Energie in Betracht gezogen werden, in der man die Lösungsmittel-Zugänglichkeit verwendet.

In der Mutante Glu270Met befinden sich die Mutationsorte in den Untereinheiten innerhalb 20 Å. CUPSAT hat die $\Delta\Delta G$ jeder Untereinheiten im Tetramer getrennt berechnet. Die Mutationsorte befinden sich in den Kontaktbereichen zwischen den Monomeren. Das bedeutet, dass die Mutation in der einzelnen Untereinheit zwar destabilisierend wirken kann, aber in der als gesamtes betrachteten tetrameren Struktur durch eine Erhöhung der Hydrophobizität des Kontaktbereiches einen stabilisierenden Effekt zeigen kann.

5. ZUSAMMENFASSUNG

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die L-2-Hydroxyisocaproat Dehydrogenase (L-HicDH, E.C. 1.1.1.27) aus *Lactobacillus confusus* ist eine NAD(H)-abhängige Oxidoreduktase und katalysiert die reversible und stereospezifische Umwandlung von 2-Ketocarbonsäuren zu den entsprechenden 2-Hydroxycarbonsäuren. Die homotetramere L-HicDH, der an ihren C-Terminus ein Hexahistidin-Tag angehängt wurde, wurde durch heterologe Expression in *Escherichia Coli* produziert und gereinigt. Die molekulare Masse betrug 35 KDa pro Untereinheit.

Die thermal induzierte Denaturierung der L-HicDH wurde durch differentielle *scanning*-Kalorimetrie untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt an, dass die thermal induzierte Denaturierung dieses Enzyms irreversibel und der T_m von der *Scanrate* abhängig ist. Dies deutet an, dass der Denaturierungsprozess der L-HicDH mindestens zum Teil kinetisch kontrolliert wird. Die Wärmekapazitätsfunktionen der L-HicDH zeigen einen einzelnen Peak mit dem T_m -Wert zwischen 52,14°C und 55,89°C bei pH 7,0, abhängig von den unterschiedlichen Scangeschwindigkeiten.

Dieser thermale Denaturierungsprozess konnte durch das Lumry-Eyring-Modell $N \leftrightarrow U \rightarrow F$ analysiert werden. Im extremen Fall des Lumry-Eyring-Modells kann dieser Prozess durch das einfache kinetische Schema beschrieben werden: $N \xrightarrow{k} D$, in dem k eine kinetische Konstante der ersten Ordnung, N der native Zustand, und D der denaturierte Zustand sind. Die Geschwindigkeitskonstante der Proteinentfaltung wurde als eine kinetische Konstante der ersten Ordnung anhand der Arrhenius-Gleichung analysiert. Aus der Arrhenius-Analyse wurde ein Wert von 537 kJ/Mol als Aktivierungsenergie dieses Prozesses berechnet.

Ein Einfluss der Proteinkonzentration auf den T_m -Wert der Denaturierung der tetrameren L-HicDH wurde nicht beobachtet. Dies bedeutet, dass die Dissoziation der Tetrameren vor dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt nicht stattfindet. Nach dem geschwindigkeitsbestimmenden Übergangspeak ist kein weiterer Peak im DSC-Thermogram beobachtet worden. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass das gefaltete Tetramer direkt und

5. ZUSAMMENFASSUNG

spontan zum entfalteten Monomer umgewandelt wird. Das heißt mit anderen Worten, dass die thermal induzierte Denaturierung von L-HicDH eng mit der Dissoziation der Untereinheiten verbunden ist.

Verglichen mit den Literaturwerten liegt die Aktivierungsenergie zwischen den gefalteten und entfalteten Zuständen sehr hoch und dies bedeutet, dass der native tetramere Zustand der L-HicDH kinetisch sehr stabil ist. Dies macht den Entfaltungsprozess der L-HicDH sehr langsam und stabilisiert dadurch den gefalteten Zustand der L-HicDH.

Auch der Einfluss des pH-Wertes auf die Thermostabilität der L-HicDH wurde mit der differentiellen *scanning*-Kalorimetrie untersucht. Die Abhängigkeit des T_m (Mittelpunkt des Überganges) der L-HicDH vom pH-Wert wurde bei einer bestimmten Scangeschwindigkeit mit variierenden pH-Bedingungen untersucht. Die pH-Wert-Abhängigkeit der Thermostabilität und der Aktivität der L-HicDH wurden miteinander verglichen. Bei pH 6,0 besitzt die L-HicDH die höchste Thermostabilität. Hier zeigt die L-HicDH auch eine relativ große Enzymaktivität. Diese Bedingung liegt auch sehr nah an dem theoretischen isoelektrischen Punkt ($pI = 5,06$) des Enzyms. Diese Beobachtung stimmt mit der allgemeinen Meinung überein, dass die höchste Thermostabilität von Proteinen in der Nähe von deren isoelektrischen Punkten liegt. Die Übergangstemperatur (T_m) erstreckt sich von $44,07^\circ\text{C}$ bei pH 8,0 bis auf $62,55^\circ\text{C}$ bei pH 6,0. Darüber hinaus hat die Anwesenheit des Liganden (NADH) einen Stabilisierungseffekt an der L-HicDH.

Um die L-HicDH zu thermostabilisieren, wurden einige gezielte Mutationen in diesem Enzym durchgeführt, indem der Austausch der Aminosäuren mit Hilfe eines Thermostabilitätsvorhersageprogramms ausgewählt wurde. Die Thermostabilität aller Mutanten wurde mit der differentiellen *scanning*-Kalorimetrie untersucht. Die thermal induzierte Denaturierung der Mutanten war irreversibel. Die Wärmekapazitätsfunktionen aller Mutanten zeigen ebenfalls einen einzelnen Peak und alle Mutanten entfalten sich als einzelne kooperative Einheit. Das Verhältnis $\Delta H/\Delta H_v$ aller Mutanten zeigt eine extreme Kooperativität. Diese extreme Kooperativität ergibt sich aus dem gleichzeitigen Zerfallen aller strukturellen

Elemente und der außergewöhnlichen Entfaltung dieses großen Proteins. Dies wiederum reflektiert die Stabilisierungsrolle der Oligomerisierung in diesem Enzym.

Die Mutante Gly251Ala zeigt von den angefertigten Mutanten die höchste Thermostabilität mit einem T_m -Wert von 61.27°C bei pH 7,0, der im Vergleich mit der Wild-Typ L-HicDH bei der gleichen Bedingung um 6.19°C höher ist. Unter kinetischem Aspekt hat diese Mutante auch eine hohe kinetische Stabilität mit einem Aktivierungsenergiewert von ca. 713 kJ/Mol. Dieser Wert ist ca. 175 kJ/Mol höher als der Mittelwert der Wild-Typ L-HicDH.

Die Mutanten Gly251Ala und Glu270Met wurden jeweils mit hohen Aktivierungsenergiewerten von 713 kJ/Mol und 598 kJ/Mol stabilisiert. In diesen Mutanten befinden sich die Mutationsorte im Kontaktbereich der Monomere. Der Austausch gegen die kleinen und hydrophoben Aminosäuren verstärkt die Interaktion der Untereinheiten. Die hohe Aktivierungsenergie ergibt sich aus der hydrophoben Wechselwirkung der Untereinheiten, wobei der Mechanismus der irreversiblen Denaturierung der L-HicDH als die Folge der Dissoziation der Untereinheiten definiert werden kann. Die Interaktion der Untereinheiten spielt damit eine bedeutende Rolle in der Stabilisierung des gesamten Enzyms. Die Mutante Gly244Glu wurde ebenfalls mit einer höheren Aktivierungsenergie von 575 kJ/Mol stabilisiert. Die negativ geladene Glu244 verstärkt die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Lys58, Lys245 und Asp62 in einer relativ hydrophilen Umgebung. Die Lösungsmittelzugänglichkeiten dieser Reste zeigen, dass die Oberflächen-Ladungsverteilungen die Stabilität von Proteinen erhöhen können. Alle drei Mutanten besitzen sehr gute Werte der Aminosäure-Atom-Potentiale und Torsionswinkel-Potentiale nach dem Austausch der Aminosäuren. Die Vorhersagegenauigkeit des Programms ist zufriedenstellend. Auch die Vorhersage des CUPSATs über die Thermostabilität der L-HicDH stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit ein.

6. LITERATURVERZEICHNIS

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Ahern, T.J., and Klibanov, A.M. (1987) Analysis of processes causing thermal inactivation of enzymes. *Meth. Biochem. Anal.* 33, 91-127.
- Ahern, T.J., Klibanov A.M (1985) The mechanisms of irreversible enzyme inactivation at 100°C, *Science* (Washington) 228, 1280-1284.
- Alan Cooper, (2000) Differential scanning microcalorimetry. Oxford University Press, Oxford New York, p 287-318.
- Kircher, M., Leuchtenberger, W. Aminosäuren - ein Beitrag zur Welternährung. *Biologie in unserer Zeit.* (1998) 28, 281-293.
- Anabel Rodriguez, David G. Pina, Belen Yelamos, John J. Castillo Leon, Galina G. Zhadan, Arnold, F.H. (1998) Enzyme engineering reaches the boiling point [comment]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 2035-2036.
- Arnould, S., M. Takahashi, and J. M. Camadro. (1998) Stability of recombinant yeast protoporphyrinogen oxidase: effects of diphenyl ether type herbicides and diphenyliodonium. *Biochemistry.* 37, 12818–12828.
- Baier, S., and J. McClements. (2001) Impact of preferential interactions on thermal stability and gelation of bovine serum albumin in aqueous sucrose solutions. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2600–2608.
- Banerjee, T., and N. Kishore. (2004) A differential scanning calorimetric study on the irreversible thermal unfolding of concanavalin A. *Thermochim. Acta.* 411, 195–201.
- Baptista, R. P., J. M. S. Cabral, and E. P. Melo. (2000) Trehalose delays the reversible but not the irreversible thermal denaturation of cutinase. *Biotechnol. Bioeng.* 70, 699–703.
- Bell, L. N., M. J. Hageman, and J. M. Bauer. (1995) Impact of moisture on thermally-induced denaturation and decomposition of lyophilized bovine somatotropin. *Biopolymers.* 35, 201–209.
- Braxton, S. (1996) Protein engineering for stability. In Cleland, J.L. and Craik, C.S. (eds.), *Protein engineering.* Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 299-316.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254.
- Bryan P. N. (2000) Protein engineering of subtilisin. *Biochim Biophys Acta.* 29;1543, 203-222.
- Bullock W, Fernandez J, Short J (1987) XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* Strain with beta-galactosidase selection. *Bio Tech* 5, 376-378.
- Burkovski, A. and Krämer, R. (1999) Mikrobielle Produktion von Aminosäuren. *BIOforum*, 6, 338-341.
- Cambillau, C and Claverie, J.-M. (2000) Structural and Genomic Correlates of Hyperthermostability. *J. Biol. Chem.* 275, 32383-32386.
- Cashikar, A.G., Rao, N.M. Unfolding pathway in red kidney bean acid phosphatase is dependent on ligand binding, *J. Biol.Chem.* 271, 4741-4746.
- Chakravarty S. and Varadarajan R. (2000) Elucidation of determinants of protein stability through genome sequence analysis. *FEBS Lett.* 470, 65-69.
- Chatterjee, S., Schoepe, J., Lohmer, S., Schomburg, D. (2005) High level expression and single-step purification of hexahistidine-tagged L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase making use of a versatile expression vector set. *Protein expression und Purification* 39, 137-143.
- Chen J, Lu Z, Sakon J, Stites WE. (2000) Increasing the thermostability of staphylococcal nuclease: implications for the origin of protein thermostability. *J Mol Biol.* 303, 125-30.
- Cohen SN, Chang, ACY, Hsu (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69, 2110-2114.
- Cupo, P., El-Deiry, W., Whitney, P.L. and Awad, W.M., Jr. (1980) Stabilization of proteins by guanidination. *J Biol Chem*, 255, 10828-10833.
- D`Amico, S., Gerday, C. and Feller, G. (2001) Structural Determinants of Cold Adaptation and Stability in a Large Protein. *J. Biol. Chem.* 276, 25791-25796.
- Daniel, R.M., Dunn, R.V., Finney, J.L., Smith, J.C. (2003) The role of dynamics in enzyme activity. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32, 69-92.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Das, T. K., S. Mazumdar, and S. Mitra. (1998). Characterization of a partially unfolded structure of cytochrome c induced by sodium dodecyl sulphate and the kinetics of its refolding. *Eur. J. Biochem.* 254, 662–670.
- Dill, K.A. (1989) Thermal stability of globular proteins. *Biochemistry* 28, 5439-5449.
- Dill, K.A. (1990) Dominant forces in protein folding. *Biochem.* 29, 7133-7155.
- Dunn, C.R., Wilks, H.M., Halsall, D.J., Atkinson, T., Clarke, A.R., Muirhead, H., Holbrook, J.J. (1991) Design and synthesis of new enzymes based on the lactate dehydrogenase framework. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 332(1263), 177-84.
- Edge, V., Allewell, N.M., Sturtevant, J.M. (1985) High resolution differential scanning calorimetric analysis of the subunits of *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase, *Biochemistry* 24, 5899-5906.
- Enns, C.A. and Chan, W.W. (1978) Stabilization of the relaxed state of aspartate transcarbamoylase by modification with a bifunctional reagent. *J Biol Chem*, 253, 2511-2513.
- Enrique Villar, Francisco Gavilanes, Manuel G. Roig, Ivan Yu. Sakharov and Valery L. Shnyrov. (2002) Thermal stability of peroxidase from the african oil palm tree *Elaeis guineensis*. *Eur. J. Biochem.* 269, 2584–2590.
- Fagain, C.O. (1995) Understanding and increasing protein stability. *Biochim Biophys Acta*, 1252, 1-14.
- Fang, Y. L., O. Gursky, and D. Atkinson. (2003) Lipid-binding studies of human apolipoprotein A-I and its terminally truncated mutants. *Biochemistry.* 42, 13260–13268.
- Feil, I. (1992) Computergestützte Proteinstrukturmodellierung sowie Herstellung und Charakterisierung gentechnologisch veränderter Variante der L-2- Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase aus *Lactobacillus confusus*. Dissertation an der Technischen Universität Carlo-Wilhelmina zu Braunschweig.
- Feil, I. K., Lerch, H. P., Schomburg, D. (1994) Deletion variants of L-hydroxyisocaproate dehydrogenase probing substrate specificity. *Eur. J. Biochem.* 223, 857-863.
- Fersht, A. R. (1999) Protein stability. In *Structure and Mechanism in Protein Science: a Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding* (Fersht, A. R., ed), pp. 508–539, Freeman, New York.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Forrer P, Chang C, Ott D, Wlodawer A, Pluckthun A. (2004) Kinetic stability and crystal structure of the viral capsid protein SHP. *J Mol Biol.* 344, 179-193.
- Geisow, M.J. and Epton, R. (1995) *Perspectives on protein engineering & complementary technologies*. Mayflower Worldwide, Oxford.
- Gill, S.J., Robert, C.H. and Wyman, J. (1988) in „*Biochemical Thermodynamics*“ pp. 145, M.N. Jones (ed.), Elsevier, Amsterdam.
- Guzzi, R., La Rosa, C., Grasso, D., Milardi, D., Sportelli, L. (1996) Experimental model of the thermal denaturation of azurin: a kinetic study. *Biophys. Chem.* 60, 29-38.
- Haney P.J., Badger J.H., Buldak G.L., Reich C.I., Woese C.R., and Olsen G.J. (1999) Thermal adaptation analyzed by comparison of protein sequences from mesophilic and extremely thermophilic Methanococcus species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3578-3583.
- Haney, P., Konisky, J., Koretke, K.K., Luthey-Schulten, Z. and Wolynes, P.G. (1997) Structural basis for thermostability and identification of potential active site residues for adenylate kinases from the archaeal genus Methanococcus. *Proteins*, 28, 117-130.
- Hartley, B.S., Hanlon, N., Jackson, R.J. and Rangarajan, M. (2000) Glucose isomerase: insights into protein engineering for increased thermostability. *Biochim Biophys Acta*, 1543, 294-335.
- Hu, C.Q., & Sturtevant, J. M. (1987) Thermodynamic study of yeast phosphoglycerate kinase. *Biochemistry* 26, 178-182.
- Ishikawa, K., Nakamura, H., Morikawa, K. and Kanaya, S. (1993) Stabilization of Escherichia coli ribonuclease HI by cavity-filling mutations within a hydrophobic core. *Biochemistry*, 32, 6171-6178.
- Jaenicke R, Bohm G. (1998) The stability of proteins in extreme environments. *Curr Opin Struct Biol.* 8, 738-48.
- John F. Brandts and Lung-Nan lin. (1990) Study of strong to ultratight protein interactions using differential scanning calorimetry. *Biochemistry* 29, 6927-6940.
- Kar, K., B. Alex, and N. Kishore. (2002) Thermodynamics of the interactions of calcium chloride with alpha-chymotrypsin. *J. Chem. Thermodyn.* 34, 319–336.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Kaushik, J. K., K. Ogasahara, and K. Yutani. (2002) The unusually slow relaxation kinetics of the folding-unfolding of pyrrolidone carboxyl peptidase from a hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*. *J. Mol. Biol.* 316, 991–1003.
- Kidric, M., H. Fabian, J. Brzin, T. Popovic, and R. H. Pain. (2002) Folding, stability, and secondary structure of a new dimeric cysteine proteinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297, 962–967.
- Kishore, N and Sabulal, B. (1998) Thermal unfolding of hen egg-white lysozyme in the presence of 4-chlorobutan-1-ol. *Pure & Appl. Chem.*, 70, 665-670.
- Klibanov, A.M. (1989) Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem Sci*, 14, 141-144.
- Klibanov, A.M., and Ahern, T.J. (1987) Thermal stability of proteins. In: “Protein Enzymology“, Oxender D.L. and Fox C.F.(eds.). New York, Alan R. Liss, pages 213-218.
- Korkegian, A., Black, M-E., Baker, D., Stoddard, B-L. (2005) Computational Thermostabilization of an Enzyme. *Science*. 308, 857 – 860.
- Kraut, D.A., Carroll, K.S., Herschlag, D. (2003) Challenges in enzyme mechanism and energetics. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 517-571.
- Kumar, S, Tsai, Ch-J and Nussinov, R. (2000) Factors enhancing protein thermostability. *Protein Engineering*, 13, 179-191.
- Kurganov, B.I., Lyubarev, A.E., Sanchez-Ruiz, J.M. & Shnyrov, V.L. (1997) Analysis of differential scanning calorimetry data for proteins. Criteria of validity of one-step mechanism of irreversible protein denaturation. *Biophys. Chem.* 69, 125-135.
- Ladbury, J.E., Chowdhry, B.Z. (1998) (Eds.) Biocalorimetry: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences, John Wiley, Chichester.
- Lerch H. P., Frank R, Collins J. (1989) Cloning, sequencing and expression of the L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase-encoding gene of *Lactobacillus confusus* in *Escherichia coli*. *Gene*. 83 (2), 263-70.
- 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-

6. LITERATURVERZEICHNIS

Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase aus *Lactobacillus confusus*. Dissertation an der Universität Tübingen.

Leuchtenberger, W. (1996) Amino acids – Technical production and use, in: *Biotechnology*, 6 (Rehm, H. J. and Reed, G., eds.), 466-502, VCH-Verlag, Weinheim.

Leven, O. (1999) Vorhersage der Thermostabilität von Protein. Dissertation , Universität zu Köln.

Lumry, R. & Eyring, E. (1954); Conformation changes of proteins. *J. Phys. Chem.* 58, 110-120.

Lyubarev, A.E. & Kurganov, B.I. (1998) Modeling of irreversible thermal protein denaturation at varying temperature. I. The model involving two consecutive irreversible steps. *Biochemistry (Moscow)* 63, 434-440.

Lyubarev, A.E. & Kurganov, B.I. (1999) Modeling of irreversible thermal protein denaturation at varying temperature. II. The complete kinetic model Lumry Eyring. *Biochemistry (Moscow)* 64, 832-838.

Lyubarev, A.E., Kurganov, B.I., Burlakova, A.A., Orlov, V.N., (1998) Irreversible thermal denaturation of uridine phosphorylase from *Escherichia coli* K-12, *Biophys. Chem.* 70, 247-257

Manly, S.P., Mathews, K. S., & Sturtevant, J. M. (1985) Thermal denaturation of the core protein of lac repressor. *Biochemistry* 24, 3842-3846.

Manning, M.C., Patel, K. and Borchardt, R.T. (1989) Stability of protein pharmaceuticals. *Pharm Res*, 6, 903-918.

Matouschek, A., Jacqueline M.Mathews, Christopher M.Johnson and Alan R.Fersht (1994) Extrapolation to water of kinetic and equilibrium data for the unfolding of barnase in urea solution. *Protein Engineering*. 7, 1089-1095.

Mehta, R., A. Kundu, and N. Kishore. (2003b) A mechanistic study on the thermal unfolding of cytochrome c in presence of 4-chlorobutan-1-ol: differential scanning calorimetric and spectroscopic approach. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 5, 5514–5522.

Mehta, R., D. L. Gantz, and O. Gursky. (2003a) Effects of mutations in apolipoprotein C-1 on the reconstitution and kinetic stability of discoidal lipoproteins. *Biochemistry*. 42, 4751–4758.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Michal, G., Herausgeber (1999) *Biochemical pathways*. Biochemie-Atlas. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Milardi, D., La Rosa, C. & Grasso, D. (1994) Extended theoretical analysis of irreversible protein thermal unfolding. *Biophys. Chem.* 52, 183-189.
- Mireille Weijers, Peter A. Braneveld, Marien A. Cohen Stuart and Ronald W. Visschers. (2003) Heat-induced denaturation and aggregation of ovalbumin at neutral pH described by irreversible first-order kinetics. *Protein Science* 12, 2693–2703.
- Murphy, K. P. and Freire, E. (1992) Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. *Adv. Protein Chem.* 43, 313–361.
- Muslin, E.H., Clark, S.E. and Henson, C.A. (2002) The effect of proline insertions on the thermostability of a barley alpha-glucosidase. *Protein Eng*, 15, 29-33.
- Niefind K., Hecht H.J. & Schomburg D. (1995) Crystal Structure of L-Hydroxyisocaproate Dehydrogenase from *Lactobacillus confusus* at 2.2 Å Resolution. An Example of Strong Asymmetry Between Subunits. *J. Mol. Biol.* 251, 256-281.
- Nielsen, J.E. and Borchert, T.V. (2000) Protein engineering of bacterial alpha-amylases. *Biochim Biophys Acta*, 1543, 253-274.
- Norris, A.C. (1981) Computational Chemistry. An Introduction to Numerical Methods, pp 194-199, Wiley, New York.
- Pace C., Shirley B., McNutt M. & Gajiwala K. (1996) Forces contributing to the conformational stability of proteins. *FASEB J.*, 10, 75-83.
- Pace, C.N. (1990) Conformational stability of globular proteins. *Trends Biochem Sci.* 15, 14-17.
- Panse, V.G., Swaminathan, C.P., Aloor, J.J., Surroli, A., Varadarajan, R. (2000) Unfolding thermodynamics of the tetrameric chaperone, SecB, *Biochemistry* 39, 2362-2369.
- Parthiban Vijayarangakannan. (2005) PROSAT (Protein Stability Analysis Tool) Dissertation, Universität zu Köln.
- Patrik Forrer, Changsoo Chang, David Ott, Alexander Wlodawer and Andreas Plückthun. (2004) Kinetic Stability and Crystal Structure of the Viral Capsid Protein SHP. *J. Mol. Biol.* 344, 179–193.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Perez, C., Castellanos, I.J., Costantino, H.R., Al-Azzam, W. and Griebenow, K. (2002) Recent trends in stabilizing protein structure upon encapsulation and release from bioerodible polymers. *J Pharm Pharmacol*, 54, 301-313.
- Perl D, Mueller U, Heinemann U, Schmid FX. (2000) Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein. *Nat Struct Biol*. 7(5), 380-383.
- Plotnikov, V.V., Brandts, J.M., Lin, L-N. and Brandts, J.F. (1997) *Analytical Biochemistry*, 250, 237-244.
- Privalov, P. L. (1979) Stability of proteins: small globular proteins. *Adv. Protein Chem.* 33, 167–241.
- Privalov, P.L. (1982) Stability of proteins. Proteins which do not present a single cooperative system. *Adv. Prot. Chem.* 35, 1-104.
- Privalov, P.L. (1989) Thermodynamic problems of protein structure. *Annu Rev Biophys Chem.* 18, 47-69.
- Privalov, P.L. (1992) in *Protein Folding* (Creighton, T. ed) pp. 83-126, W.H. Freeman and Company, New York.
- Privalov, P.L., and Makhatadze, G.I. (1992) Contribution of hydration and non-covalent interactions to the heat capacity effect on protein folding. *J. Mol. Biol.* 224, 751-723.
- Privalov, P.L., and Makhatadze, G.I. (1993) Contribution of hydration to protein folding thermodynamics. II. The entropy and Gibbs energy of hydration. *J. Mol. Biol.* 232, 660-679.
- Privalov, P.L., Putekhin, S.A. (1986) Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins, *Methode Enzymol.* 131, 4-51.
- Protasevich, I., Ranjbar, B., obachov, Makarov, A.,Gilli, C.Briand, Lafitte, D., Haiech, J. (1997) Conformation and thermal denaturation of apocalmodulin: role of electrostatic mutations, *Biochemistry* 36, 2017-2024.
- Rajalakshmi, N. and Sundaram, P.V. (1995) Stability of native and covalently modified papain. *Protein Eng*, 8, 1039-1047.
- Reinhard Sterner and Wolfgang Liebl. (2000) Thermophilic Adaptation of Protein. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 13, 179-191.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Reinhard Sterner and Wolfgang Liebl. (2001) Thermophilic Adaptation of Protein. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 36 (1), 39 -106.
- Salminen, T., Teplyakov, A., Kankare, J., Cooperman, B. S., Lahti, R. & Goldman, A. (1996) An unusual route to thermostability disclosed by the comparison of *Thermus thermophilus* and *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatases. *Prot. Sci.*, 5, 1014-1025.
- Sanchez-Ruiz, J.M. (1992) Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry. *Biophys. J.* 61, 921-935.
- Sanz, JM, Garcia, JL, Laynez, J, Usobiaga, P., Menendez, M (1993) Thermal Stability and Cooperative Domains of CPL1 Lysozyme and Its NH₂- and COOH-terminal Modules. *J. Biol. Chem.* 268, 6125 – 6130.
- Sanchez-Ruiz, J.M. (1995) Differential scanning calorimetry of protein. *Subcellular Biochemistry* . 24, 133-176.
- Sanchez-Ruiz, J.M., Lopez-Lacomba, J.L., Manuel Cortijo, and Mateo, P.L. (1988) Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin. *Biochemistry* 27, 1648-1652.
- Sandeep Kumar, Chung-Jung Tsai and Ruth Nussinov. (2000) Factors enhancing protein thermostability. *Protein Engineering*. Vol. 13, 179 –191.
- Sanger, F., Nicklen, S & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Sauer J, Sigurskjold BW, Christensen U, Frandsen TP, Mirgorodskaya E, Harrison M, Roepstorff P, Svensson B. (2000) Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. *Biochim Biophys Acta.* 1543(2), 275-293.
- Sauer, R.T., Hehir, K., Stearman, R.S., Weiss, M.A., Jeitler-Nilsson, A., Suchanek, E.G. and Pabo, C.O. (1986) An engineered intersubunit disulfide enhances the stability and DNA binding of the N-terminal domain of lambda repressor. *Biochemistry*, 25, 5992-5998.
- Schlieker, C., Bukau, B. and Mogk, A. (2002) Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *J Biotechnol*, 96, 13-21.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Schlieper, D. (2002) Die Substratbindung der L-2-Hydroxyisocaproat-Dehydrogenase. Doktorarbeit, Universität zu Köln.
- Schomburg, D. & Reichelt J. (1988) BRAGI : A comprehensive protein modelling programme system. *J. Mol. Graph.* 6, 161-165.
- Schütte H., Hummel W. & Kula M.-R. (1984) L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase – A new enzyme from *Lactobacillus confusus* for the stereospecific reduction of 2-ketocarboxylic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19, 167-176.
- Shin, I., I. Silman, C. Bon, and L. Weiner. (1998) Liposome-catalyzed unfolding of acetylcholinesterase from *Bungarus fasciatus*. *Biochemistry* 37, 4310–4316.
- Shortle, D. (1989) Probing the determinants of protein folding and stability with amino acid substitutions. *J Biol Chem*, 264, 5315-5318.
- Spasov VZ, Karshikoff AD, Ladenstein R. (1995) The optimization of protein-solvent interactions: thermostability and the role of hydrophobic and electrostatic interactions. *Protein Sci.* 4, 1516-1527.
- Staniforth, R.A., Bigotti, M.G., Cutruzzola, F., Allocatelli, C.T., and Brunori, M. (1998) Unfolding of apomyoglobin from *Aplysia limacina*: The effect of salt and on the cooperativity of folding. *J. Mol. Biol.* 275, 133-148.
- Steif C, Weber P, Hinz HJ, Flossdorf J, Cesareni G, Kokkinidis M. (1993) Subunit interactions provide a significant contribution to the stability of the dimeric four-alpha-helical-bundle protein ROP. *Biochemistry.* 32, 3867-76.
- Steif, C., Weber, P., Flossdorf, J., Cesareni, G., Kokkinidis, M., Hinz, H.J. (1993) Subunit interactions provide a significant contribution to the stability of the dimeric four—helical-bundle protein ROP, *Biochemistry* 32, 3867-3876.
- Sterner, R. und Liebl, W. (2001) Thermophilic Adaptation of Protein. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 36, 39-106.
- Stidier, F. W., Rossenberg, A.H., Dunn, J.J. und Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185, 60-89.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Stirpe, A., Guzzi, R., Wijma, H., Martin Ph. Verbeet, Gerard W. Canters, Sportelli, L. (2005) Calorimetric and spectroscopic investigations of the thermal denaturation of wild type nitrite reductase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1752, 47-55.
- Studier, F. W. und Moffatt, B.A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.
- Sturtevant, J.M., (1987) Biochemical applications of Differential Scanning Calorimetry. *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 38, 463-488.
- Tabor, S. und Richardson, C. C. (1985) A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1074-1078.
- Taverna, D. M. & Goldstein, R. A. (2002) Why are proteins marginally stable? *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 46, 105–109.
- Thompson M.J. and Eisenberg D. (1999) Transproteomic evidence of a loop-deletion mechanism for enhancing protein thermostability. *J.Mol.Biol.* 290, 595-604.
- Thororlfsson, M., Ibarra-Molero, B., Fojan, P., Petersen, S.B., Sanchez-Ruiz, J.M., Martinez, A. (2002) L-Phenylalanine binding and domain organization in human phenylalanine hydroxylase: a differential scanning calorimetry study. *Biochemistry* 41, 7573-7585.
- Uetz, P. & Vollert, C.S. (2005) Protein-Protein Interactions. Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine (ERGPM), Springer Verlag, in press.
- Ulbrich, R. (1989) Immobilisierte Enzyme. In Schellenberger, A. (ed.), *Enzymkatalyse*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 298-341.
- Wandrey, C., Fiolitakis, E., Wichmann, U. & Kula, M.-R. (1984) L-Aminoacids from a racemic mixture of α -hydroxy acids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 434, 91–94.
- Williams, J.C., Zeelen, J.P., Neubauer, G., Vriend, G., Backmann, J., Michels, P.A., Lambeir, A.M. and Wierenga, R.K. (1999) Structural and mutagenesis studies of leishmania triosephosphate isomerase: a point mutation can convert a mesophilic enzyme into a superstable enzyme without losing catalytic power. *Protein Eng*, 12, 243-250.
- Wong, S.S. and Wong, L.J. (1992) Chemical crosslinking and the stabilization of proteins and enzymes. *Enzyme Microb Technol*, 14, 866-874.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Yamada, H. and Shimizu, S. (1988) Mikrobielle Verfahren zur Produktion biologisch und chemisch wertvoller Verbindungen. *Angew. Chem.* 100, 640-661.

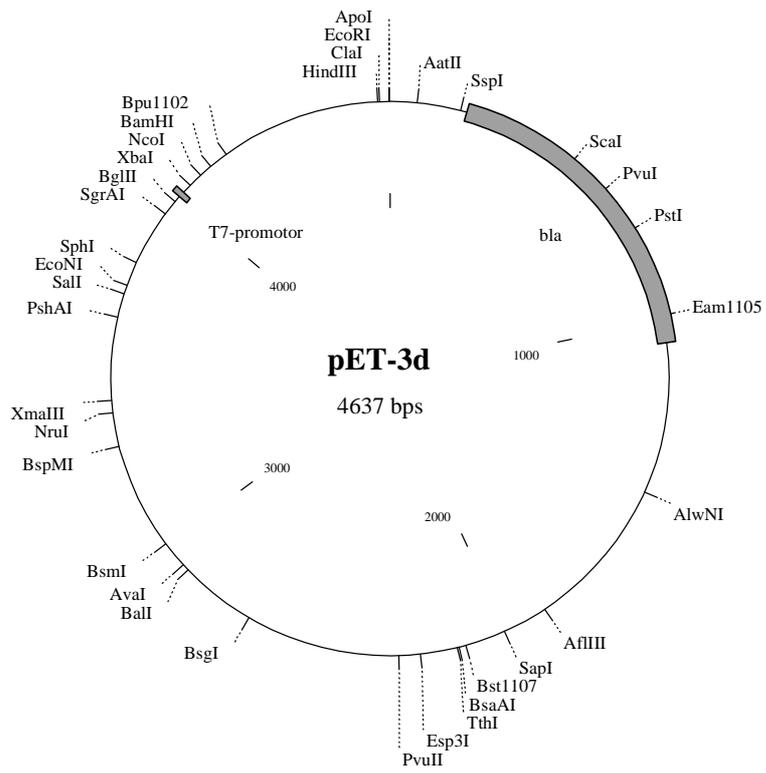
Zale, S.E. and Klibanov, A.M. (1983) On the Role of Reversible Denaturation (Unfolding) in the Irreversible Thermal Inactivation of Enzymes. *Biotechnol Bioeng*, XXV, 2221-2230.

Zale, S.E. and Klibanov, A.M. (1984) Mechanisms of irreversible thermoinactivation of enzymes. *Ann N Y Acad Sci*, 434, 20-26.

Zale, S.E., Klibanov, A.M. (1986) Why does ribonuclease irreversible inactivate at high temperatures ?, *Biochemistry* 25, 5432-5444.

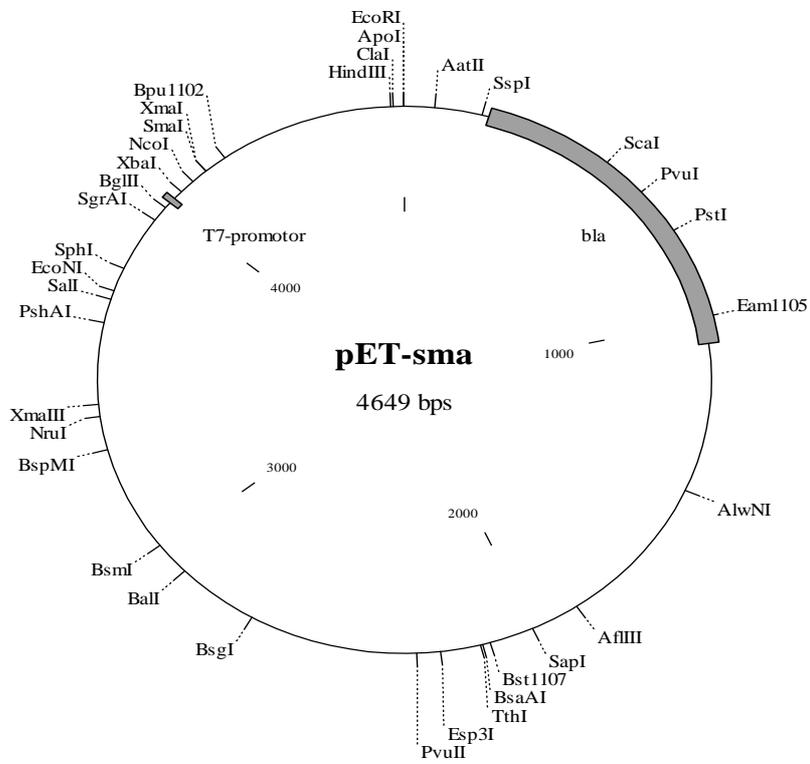
ANHANG

A. 1. Plasmidkarte: pET-3d von Novagen

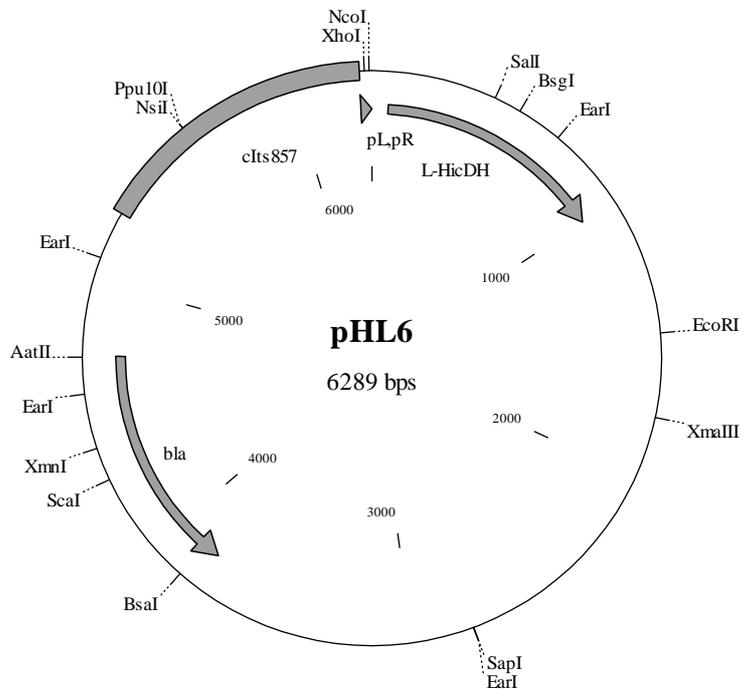


ANHANG

A. 2. Plasmidkarte: pET-sma



A. 3. Plasmid pHL6



ANHANG

A. 5. Mess-Daten der Enzymaktivität

Tabelle A-1. Bestimmung der Enzymaktivität

Protein	pH	Slope1	Slope2	Slope3	Konz. (mg/ml)	f	Volum.-Akt. (U/ml)	Spezif.-Akt. (U/mg)
Wild-Typ	6	0,1990	0,1956	0,1973	11,5	400	685 ± 5,90	60 ± 0,51
Wild-Typ	7	0,5600	0,5607	0,5623	11,5	400	1948 ± 4,09	169 ± 0,36
Wild-Typ	8	0,4595	0,4615	0,4603	11,5	400	1613 ± 3,50	140 ± 0,30
Gly251Ala	6	0,2403	0,2286	0,2244	15,3	1000	2006 ± 71,5	131 ± 1,15
Gly251Ala	7	0,3112	0,2773	0,2940	15,3	1000	2554 ± 147	167 ± 9,6
Gly251Ala	8	0,1860	0,1980	0,1980	15,3	1000	1684 ± 60	110 ± 3,9
Asp184Glu	6	0,2924	0,2961	0,2901	12,6	1000	2543 ± 26,3	202 ± 2,1
Asp184Glu	7	0,2578	0,2574	0,2865	12,6	1000	2321 ± 145	184 ± 11,5
Asp184Glu	8	0,1635	0,1474	0,1476	12,6	1000	1327 ± 80,2	105 ± 6,4
Gly126Ala	6	0,3276	0,3396	0,3360	19,6	1000	2903 ± 53,5	148 ± 2,7
Gly126Ala	7	0,3174	0,3296	0,3216	19,6	1000	2803 ± 53,8	143 ± 2,7
Gly126Ala	8	0,1908	0,1860	0,1860	19,6	1000	1629 ± 24	83 ± 1,2
Gly244Glu	6	0,4054	0,3695	0,3590	24,6	1000	3282 ± 211	133 ± 8,6
Gly244Glu	7	0,2040	0,2292	0,1860	24,6	1000	1792 ± 188	73 ± 7,7
Gly244Glu	8	0,0396	0,0380	0,0420	24,6	100	35 ± 1,75	1,4 ± 0,07
Asn72Phe	6	0,2400	0,2124	0,2340	18,3	100	199 ± 12,6	10,85 ± 0,7
Asn72Phe	7	0,0720	0,0660	0,0648	18,3	100	59 ± 3,3	3,2 ± 0,18
Asn72Phe	8	0,0234	0,0360	0,0300	18,3	100	26 ± 5,5	1,4 ± 0,30
Glu270Met	6	0,1923	0,1752	0,1656	14,57	1000	1543 ± 117	106 ± 8,06
Glu270Met	7	0,3180	0,2859	0,3141	14,57	1000	2657 ± 152	182 ± 10,4
Glu270Met	8	0,2563	0,2660	0,2290	14,57	1000	2174 ± 166,6	149 ± 11,4
Asp327Lys	6	0,3144	0,3180	0,3300	13,42	1000	2785 ± 70,9	207,5 ± 5,28
Asp327Lys	7	0,3048	0,3133	0,3184	13,42	1000	2710 ± 59,6	202 ± 4,44
Asp327Lys	8	0,3763	0,3925	0,3489	13,42	1000	3235 ± 191	241 ± 14,2
Thr305Glu	6	0,0678	0,0666	0,0745	12,5	500	302 ± 18,5	24,2 ± 1,48
Thr305Glu	7	0,1717	0,1712	0,1735	12,5	500	747 ± 5,25	59,7 ± 0,42
Thr305Glu	8	0,1547	0,1543	0,1577	12,5	500	676 ± 8,07	54,1 ± 0,65
Asp302Glu	6	0,2244	0,2484	0,2296	12,4	1000	2032 ± 110	164 ± 8,84
Asp302Glu	7	0,2237	0,2185	0,2460	12,4	1000	1992 ± 127	161 ± 10,2
Asp302Glu	8	0,1305	0,1332	0,1560	12,4	1000	1215 ± 122	98 ± 9,80

* Konz.: Enzymkonzentration; f : Verdünnungsfaktor

Volum.-Akt.: Volumen-Aktivität (U/ml); Spezif.-Akt.: Spezifische Aktivität (U/mg)

ANHANG

Tabelle A-2 Mess-Daten der Enzymaktivität der Wild-Typ L-HicDH bei verschiedenen Temperaturen (f = x400; [E] = 13,18mg/ml)

Temperatur	Spezifische Aktivität	Slope1	Slope2	Slope3
20°C	129 ± 1,38 U/mg	0,4907	0,4996	0,4783
27°C	157 ± 2,10 U/mg	0,5924	0,6107	0,5851
32°C	161 ± 1,88 U/mg	0,5979	0,6131	0,621
37°C	185 ± 2,10 U/mg	0,7148	0,6983	0,6936
42°C	138 ± 0,70 U/mg	0,5202	0,5216	0,5297
49°C	4 ± 0,014 U/mg	0,0115	0,0166	0,0179

Tabelle A-3 Mess-Daten der Enzymaktivität der Wild-Typ L-HicDH bei verschiedenen pH-Werten (f = x400; [E] = 11,5mg/ml)

PH-Wert	Slope1	Slope2	Slope3	Spez. Akt. (U/mg)
5,0	0,1130	0,1128	0,1121	34 ± 0,14
5,5	0,1311	0,1295	0,1289	40 ± 0,34
6,0	0,1990	0,1956	0,1973	60 ± 0,51
6,5	0,3173	0,3168	0,3171	96 ± 0,08
7,0	0,5600	0,5607	0,5623	169 ± 0,36
7,5	0,5859	0,5880	0,5884	177 ± 0,41
8,0	0,4595	0,4615	0,4603	140 ± 0,30
8,5	0,4201	0,4174	0,4161	126 ± 0,62
9,0	0,2483	0,2519	0,2531	76 ± 0,75

ANHANG

A. 6. Mess-Daten der Enzymkinetik

Gly126Ala

[S] (mM)	0.625	0.8	1.25	1.5	2.0	2.5
[S] in Küvette (μM)	23,15	29,63	46,3	55,56	74,07	92.6
1 / [S] (μM ⁻¹)	0,043	0,034	0,022	0,018	0,0135	0.011
Enzymverdünnung	1000x	1000x	1000x	1000x	1000x	1000x
ΔE ₃₄₀ -1	0,1145	0,1596	0,2059	0,2244	0,2803	0,3276
ΔE ₃₄₀ -2	0,1200	0,1519	0,1897	0,2196	0,2484	0,3396
ΔE ₃₄₀ -3	0,1200	0,1500	0,1980	0,2102	0,2733	0,3360
ΔE ₃₄₀ (Mittelwert)	0,1182	0,1538	0,1979	0,2181	0,2673	0,3344
1 / V _o	0,0009 74497	0,00074 8929	0,000582	0,0005281 3	0,0004309 21	0,0003444 53

$$V_{\max} = 5796,5 \text{ U / ml ; } \quad K_m = 105,43 \mu\text{M}$$

$$K_{\text{cat}} = V_{\max} / [E] = \frac{5796,5 \mu \text{ mol / 60 s. ml}}{19,6 \text{ mg/ml}} = \frac{5796,5 \mu \text{ mol / 60 s. ml}}{560 \mu \text{ mol/L}} = 172,5 \text{ S}^{-1}$$

Lineare Regression: Korrelationskoeff. = 0,9923
Standardabweichung = 0,00003162

Gly251Ala

[S] (mM)	0.625	0.8	1.25	1.5	2.0	2.5
[S] in Küvette (μM)	23,15	29,63	46,3	55,56	74,07	92.6
1 / [S] (μM ⁻¹)	0,043	0,034	0,022	0,018	0,0135	0.011
Enzymverdünnung	1000x	1000x	1000x	1000x	1000x	1000x
ΔE ₃₄₀ -1	0,1200	0,1594	0,1916	0,2340	0,2538	0,3112
ΔE ₃₄₀ -2	0,1200	0,1560	0,1897	0,2330	0,2423	0,2773
ΔE ₃₄₀ -3	0,1080	0,1560	0,1890	0,2280	0,2724	0,2940
ΔE ₃₄₀ (Mittelwert)	0,1160	0,1571	0,1901	0,2317	0,2562	0,2942
1 / V _o	0,0009 92979	0,00073 3041	0,000605 917	0,0004971 31	0,0004495 91	0,0003915 19

$$V_{\max} = 5091.29 \text{ U / ml ; } \quad K_m = 89.53 \mu\text{M}$$

$$K_{\text{cat}} = V_{\max} / [E] = \frac{5091.29 \mu \text{ mol / 60 s. ml}}{15.3 \text{ mg/ml}} = \frac{5091.29 \mu \text{ mol / 60 s. ml}}{437,14 \mu \text{ mol/L}} = 194 \text{ S}^{-1}$$

Lineare Regression: Korrelationskoeff. = 0,9870
Standardabweichung = 0,00003999

ANHANG

Asp184Glu

[S] (mM)	0.625	0.8	1.25	1.5	2.0	2.5
[S] in Küvette (µM)	23,15	29,63	46,3	55,56	74,07	92.6
1 / [S] (µM ⁻¹)	0,043	0,034	0,022	0,018	0,0135	0.011
Enzymverdünnung	1000x	1000x	1000x	1000x	1000x	1000x
ΔE ₃₄₀ -1	0,1440	0,1615	0,2111	0,2172	0,2354	0,2578
ΔE ₃₄₀ -2	0,1474	0,1602	0,2025	0,2112	0,2520	0,2574
ΔE ₃₄₀ -3	0,1454	0,1710	0,1997	0,2184	0,2532	0,2865
ΔE ₃₄₀ (Mittelwert)	0,1456	0,1642	0,2044	0,2156	0,2469	0,2672
1 / V _o	0,0007 911	0,00070 15	0,000563 5	0,0005343	0,0004665	0,0004311

$$V_{\max} = 3133.68 \text{ U / ml ; } \quad K_m = 34,8 \text{ µM}$$

$$K_{\text{cat}} = V_{\max} / [E] = \frac{3133,68 \mu \text{ mol} / 60 \text{ s. ml}}{12.6 \text{ mg/ml}} = \frac{3133,68 \mu \text{ mol} / 60 \text{ s. ml}}{360 \mu \text{ mol/L}} = 145 \text{ S}^{-1}$$

Lineare Regression: Korrelationskoeff. = 0,9959
Standardabweichung = 0,00000996

Asn72Phe

[S] (mM)	0.625	0.8	1.5	2.5	5.0
[S] in Küvette (µM)	23,15	29,63	55,56	92.6	185,2
1 / [S] (µM ⁻¹)	0,043	0,034	0,018	0.011	0,0054
Enzymverdünnung	100x	100x	100x	100x	100x
ΔE ₃₄₀ -1	0,0302	0,0373	0,0418	0,0720	0,0714
ΔE ₃₄₀ -2	0,0300	0,0342	0,0417	0,0660	0,0737
ΔE ₃₄₀ -3	0,0240	0,0342	0,0459	0,0648	0,0780
ΔE ₃₄₀ (Mittelwert)	0,0281	0,0352	0,0431	0,0676	0,0744
1 / V _o	0,040992	0,032724	0,026725	0,017039	0,015482

$$V_{\max} = 85.21 \text{ U / ml ; } \quad K_m = 56,82 \text{ µM}$$

$$K_{\text{cat}} = V_{\max} / [E] = \frac{85,21 \mu \text{ mol} / 60 \text{ s. ml}}{18.3 \text{ mg/ml}} = \frac{85,21 \mu \text{ mol} / 60 \text{ s. ml}}{522,86 \mu \text{ mol/L}} = 2,72 \text{ S}^{-1}$$

Lineare Regression: Korrelationskoeff. = 0,9822
Standardabweichung = 0,00232657

ANHANG

Gly244Glu

[S] (mM)	0.3125	0.625	0.8	1.25	2.5
[S] in Küvette (μM)	11,57	23,15	29,63	46,3	92.6
1 / [S] (μM ⁻¹)	0,086	0,043	0,034	0,022	0.011
Enzymverdünnung	1000x	1000x	1000x	1000x	1000x
ΔE ₃₄₀ -1	0,0192	0,0396	0,0804	0,1560	0,2040
ΔE ₃₄₀ -2	0,0180	0,0480	0,0804	0,1464	0,2292
ΔE ₃₄₀ -3	0,0180	0,0458	0,0837	0,1356	0,1860
ΔE ₃₄₀ (Mittelwert)	0,0184	0,0445	0,0815	0,1460	0,2064
Volumenaktivität (U/ml)	159,74	386,33	707,56	1267,52	1791,90
1 / V _o	0,006260	0,002588	0,001413	0,000789	0,000558

$$V_{\max} = 11795,47 \text{ U /ml ; } K_m = 441,13 \text{ } \mu\text{M}$$

$$K_{\text{cat}} = V_{\max} / [E] = \frac{11795,47 \mu \text{ mol} / 60 \text{ s. ml}}{24,6 \text{ mg/ml}} = \frac{11795,47 \mu \text{ mol} / 60 \text{ s. ml}}{702,86 \mu \text{ mol/L}} = 279,70 \text{ S}^{-1}$$

Lineare Regression: Korrelationskoeff. = 0,97267
Standardabweichung = 0,0001452

Glu270Met

[S] (mM)	0.625	0.8	1.25	2.5
[S] in Küvette (μM)	23,15	29,63	46,3	92.6
1 / [S] (μM ⁻¹)	0,043	0,034	0,022	0.011
Enzymverdünnung	1000x	1000x	1000x	1000x
ΔE ₃₄₀ -1	0,1376	0,2088	0,2940	0,3360
ΔE ₃₄₀ -2	0,1507	0,2040	0,2565	0,3216
ΔE ₃₄₀ -3	0,1592	0,1920	0,2850	0,3444
ΔE ₃₄₀ (Mittelwert)	0,1492	0,2016	0,2785	0,3340
1 / V _o	0,000772	0,0005714	0,0004136	0,003449

$$V_{\max} = 6141.41 \text{ U /ml ; } K_m = 80,99 \text{ } \mu\text{M}$$

$$K_{\text{cat}} = V_{\max} / [E] = \frac{6141,41 \mu \text{ mol} / 60 \text{ s. ml}}{14,57 \text{ gm/ml}} = \frac{6141,41 \mu \text{ mol} / 60 \text{ s. ml}}{416,29 \mu \text{ mol/L}} = 245,88 \text{ S}^{-1}$$

Lineare Regression: Korrelationskoeff. = 0,9705
Standardabweichung = 0,00005602

ANHANG

Asp327Lys

[S] (mM)	0.3125	0.625	0.8	1.25	2.5
[S] in Küvette (µM)	11,57	23,15	29,63	46,3	92.6
1 / [S] (µM ⁻¹)	0,086	0,043	0,034	0,022	0.011
Enzymverdünnung	2000x	2000x	1000x	1000x	1000x
ΔE ₃₄₀ -1	0,0396	0,0963	0,2364	0,3864	0,4839
ΔE ₃₄₀ -2	0,0445	0,0886	0,2472	0,3756	0,4636
ΔE ₃₄₀ -3	0,0468	0,1031	0,2210	0,3624	0,4564
ΔE ₃₄₀ (Mittelwert)	0,04363	0,096	0,2352	0,3749	0,46796
1 / V _o	0,00132	0,0005999	0,00049	0,0003072	0,0002461

$$V_{\max} = 14330,75 \text{ U / ml ; } \quad K_m = 202,49 \text{ µM}$$

$$K_{\text{cat}} = V_{\max} / [E] = \frac{14330,75 \mu \text{ mol} / 60 \text{ s. ml}}{13,42 \text{ gm/ml}} = \frac{14330,75 \mu \text{ mol} / 60 \text{ s. ml}}{383,43 \mu \text{ mol/L}} = 622,92 \text{ S}^{-1}$$

Lineare Regression: Korrelationskoeff. = 0,9803
Standardabweichung = 0,00007466

Asp302Glu

[S] (mM)	0.3125	0.625	0.8	1.25	2.5	5.0
[S] in Küvette (µM)	11,57	23,15	29,63	46,3	92.6	185,2
1 / [S] (µM ⁻¹)	0,086	0,043	0,034	0,022	0.011	0,0054
ΔE ₃₄₀ -1	0,072	0,1140	0,1320	0,1636	0,2198	0,2952
ΔE ₃₄₀ -2	0,060	0,1080	0,1272	0,1608	0,2460	0,3029
ΔE ₃₄₀ -3	0,0636	0,1140	0,1140	0,1860	0,2315	0,3720
ΔE ₃₄₀ (Mittelwert)	0,0652	0,1120	0,1244	0,1701	0,2324	0,3234
1 / V _o	0,0017666	0,0010284	0,0009259	0,0006772	0,0004956	0,0003562

$$V_{\max} = 3373.52 \text{ U / ml ; } \quad K_m = 58,15 \text{ µM}$$

$$K_{\text{cat}} = V_{\max} / [E] = \frac{3373.52 \mu \text{ mol} / 60 \text{ s. ml}}{12.4 \text{ gm/ml}} = \frac{3373.52 \mu \text{ mol} / 60 \text{ s. ml}}{354 \mu \text{ mol/L}} = 158.83 \text{ S}^{-1}$$

Lineare Regression: Korrelationskoeff. = 0,99739
Standardabweichung = 0,00002882

ANHANG

Wild-Typ

[S] (mM)	0.3125	0.625	0.8	1.25	2.5
[S] in Küvette (μM)	11,57	23,15	29,63	46,3	92,6
1 / [S] (μM ⁻¹)	0,086	0,043	0,034	0,022	0,011
Enzymverdünnung	1000x	1000x	1000x	1000x	1000x
ΔE ₃₄₀ -1	0,0756	0,1380	0,1512	0,2160	0,2693
ΔE ₃₄₀ -2	0,0876	0,1200	0,1596	0,2273	0,2628
ΔE ₃₄₀ -3	0,0660	0,1200	0,1352	0,2124	0,2546
ΔE ₃₄₀ (Mittelwert)	0,0764	0,1260	0,1487	0,2186	0,2622
1 / V _o	0,0015077	0,0009142	0,0007748	0,000527	0,0004393

$$V_{\max} = 3848.45 \text{ U /ml ; } \quad K_m = 56.23 \text{ } \mu\text{M}$$

$$K_{\text{cat}} = V_{\max} / [E] = \frac{3848.45 \mu \text{ mol} / 60 \text{ s. ml}}{14 \text{ mg/ml}} = \frac{3848.45 \mu \text{ mol} / 60 \text{ s. ml}}{400 \mu \text{ mol/L}} = 160.35 \text{ S}^{-1}$$

Lineare Regression: Korrelationskoeff. = 0,99385
Standardabweichung = 0,00003824

Thr305Glu

[S] (mM)	0.625	0.8	1.25	2.5
[S] in Küvette (μM)	23,15	29,63	46,3	92,6
1 / [S] (μM ⁻¹)	0,043	0,034	0,022	0,011
ΔE ₃₄₀ -1	0,1200	0,1740	0,2364	0,2609
ΔE ₃₄₀ -2	0,1104	0,1563	0,1920	0,2565
ΔE ₃₄₀ -3	0,1116	0,1800	0,2160	0,2379
ΔE ₃₄₀ (Mittelwert)	0,1140	0,1701	0,2148	0,2518
Volumenaktivität (U/ml)	494,86	738,38	932,4	1093
1 / V _o	0,002021	0,001354	0,001073	0,000915

$$V_{\max} = 2264.5 \text{ U /ml ; } \quad K_m = 74 \mu\text{M}$$

$$K_{\text{cat}} = V_{\max} / [E] = \frac{2264.5 \mu \text{ mol} / 60 \text{ s. ml}}{12.5 \text{ gm/ml}} = \frac{2264.5 \mu \text{ mol} / 60 \text{ s. ml}}{357 \mu \text{ mol/L}} = 105.7 \text{ S}^{-1}$$

Lineare Regression: Korrelationskoeff. = 0,87363
Standardabweichung = 0,000212679

ANHANG

A. 7. DCS-Daten für die Ermittlung der Aktivierungsenergie

1. Wild-Typ L-HicDH

File: 310505.dsc

Scan-Rate = $v = 15^\circ\text{C/h} = 0.25 \text{ K/min}$; $Q_t = 189504,04$; $Q_m = 99656,35$

$T_m = 51,81^\circ\text{C} = 324,96\text{K}$; $C_p^m = 44804,57$

Temp	Q_t	Q	C_p	k	$\ln k$	$(1/T)10^{-3} / \text{K}^{-1}$
49,84	189504,04	28989,39	23582,14	0,03673	-3,3042	3,0961
50,79	189504,04	57972,29	37205,24	0,07072	-2,6491	3,0870
51,23	189504,04	75429,33	41480,54	0,09091	-2,3979	3,0828
51,81	189504,04	99656,35	44804,57	0,12467	-2,0821	3,0773
52,36	189504,04	125181,94	43561,63	0,16931	-1,7760	3,0721
52,81	189504,04	144090,04	39576,23	0,21786	-1,5239	3,0679
53,82	189504,04	175886,72	22263,83	0,40874	-0,8947	3,0584

File: 300505b.dsc

Scan-Rate = $v = 30^\circ\text{C/h} = 0.5 \text{ K/min}$; $Q_t = 205189,22$; $Q_m = 109549,25$

$T_m = 53,33^\circ\text{C} = 326,48 \text{ K}$; $C_p^m = 47071,70$

Temp	Q_t	Q	C_p	k	$\ln k$	$(1/T)10^{-3} / \text{K}^{-1}$
51,31	205189,22	32757,24	25854,55	0,07497	-2,59066	3,0820
52,31	205189,22	65232,58	39522,12	0,14119	-1,95762	3,0726
52,83	205189,22	87133,07	44513,71	0,18853	-1,66851	3,0677
53,33	205189,22	109549,25	47071,70	0,24609	-1,40207	3,0630
53,83	205189,22	133780,07	46113,59	0,32288	-1,13047	3,0583
54,37	205189,22	157118,31	40272,61	0,41889	-0,87015	3,0532
55,31	205189,22	187308,87	22595,07	0,63184	-0,45912	3,0445

ANHANG

File: 300505a.dsc

Scan-Rate = $v = 60^\circ\text{C/h} = \mathbf{1\ K/min}$; $Q_t = 204229,61$; $Q_m = 117050,22$

$T_m = 55,07\ ^\circ\text{C} = 328,22\ \text{K}$; $C_p^m = 46209,62$

Temp	Q_t	Q	C_p	k	$\ln k$	$(1/T)10^{-3} / \text{K}^{-1}$
53,08	204229,61	38226,38	28785,96	0,17341	-1,75212	3,0653
54,06	204229,61	72266,38	40748,07	0,30878	-1,17511	3,0561
54,56	204229,61	93904,38	44675,36	0,40494	-0,90401	3,0515
55,07	204229,61	117050,22	46209,62	0,53005	-0,63478	3,0467
55,58	204229,61	140256,52	44540,21	0,69623	-0,36207	3,0420
56,08	204229,61	161501,78	38820,05	0,90854	-0,09591	3,0374
57,06	204229,61	190610,20	20374,01	1,49595	0,40276	3,0284

File: 300505.dsc

Scan-Rate = $v = 90^\circ\text{C/h} = \mathbf{1,5\ K/min}$; $Q_t = 197738,51$; $Q_m = 107173,72$

$T_m = 56,14\ ^\circ\text{C} = 329,29\ \text{K}$; $C_p^m = 44044,70$

Temp	Q_t	Q	C_p	k	$\ln k$	$(1/T)10^{-3} / \text{K}^{-1}$
54,13	197738,51	32168,51	26140,21	0,23682	-1,44045	3,05548
55,13	197738,51	64652,27	38367,10	0,43243	-0,83833	3,04618
55,74	197738,51	89487,74	43172,88	0,59823	-0,51377	3,04053
56,14	197738,51	107173,72	44044,70	0,72950	-0,31540	3,03684
56,64	197738,51	128875,39	41958,55	0,91396	-0,08997	3,03223
57,14	197738,51	148762,59	36723,58	1,12474	0,11756	3,02764
58,09	197738,51	176864,58	21529,58	1,54711	0,43639	3,01896

2. Gly251Ala

File: 030505a.dsc

Scan-Rate = $v = 60^\circ\text{C/h} = \mathbf{1\ K/min}$; $Q_t = 270542,47$; $Q_m = 161982,13$;

$T_m = 61,56\ ^\circ\text{C} = 334,71\ \text{K}$; $C_p^m = 79935,92$

Temp	Q_t	Q	C_p	k	$\ln k$	$(1/T)10^{-3} / \text{K}^{-1}$
59,59	270542,47	37881,82	36427,84	0,15657	-1,85425	3,00535
60,56	270542,47	86976,19	64721,04	0,35258	-1,04249	2,99661
61,07	270542,47	122803,81	76092,30	0,51505	-0,66350	2,99204
61,56	270542,47	161982,13	79935,92	0,73633	-0,30608	2,98766
62,00	270542,47	196049,88	73840,06	0,99124	-0,00880	2,98374
62,54	270542,47	230852,46	54304,98	1,36823	0,31352	2,97894
63,52	270542,47	262876,74	15191,13	1,98169	0,68395	2,97027

ANHANG

3. Gly244Ala

File: 300405a.dsc

Scan-Rate = $v = 60^\circ\text{C/h} = 1 \text{ K/min}$; $Q_t = 223073,00$; $Q_m = 116639,49$;

$T_m = 48,18^\circ\text{C} = 321,33 \text{ K}$; $C_p^m = 55891,54$

Temp	Q_t	Q	C_p	k	$\ln k$	$(1/T)10^{-3} / \text{K}^{-1}$
46,19	223073	34379,78	23290,26	0,12343	-2,0921	3,13146
47,20	223073	66831,41	42162,48	0,26985	-1,3099	3,12159
47,71	223073	90976,51	51990,01	0,39358	-0,9325	3,11662
48,18	223073	116639,49	55891,54	0,52513	-0,6441	3,11207
48,68	223073	144158,43	51396,40	0,65129	-0,4288	3,10723
49,15	223073	166152,41	41879,48	0,73575	-0,3069	3,10270
50,15	223073	196216,35	20377,53	0,75875	-0,2761	3,09310

4. Asp327Lys

File: 240405a.dsc

Scan-Rate = $v = 60^\circ\text{C/h} = 1 \text{ K/min}$; $Q_t = 202185,14$; $Q_m = 118753,63$;

$T_m = 55,68^\circ\text{C} = 328,83 \text{ K}$; $C_p^m = 44684,75$

Temp	Q_t	Q	C_p	k	$\ln k$	$(1/T)10^{-3} / \text{K}^{-1}$
53,76	202185,14	43441,94	29410,42	0,18527	-1,68594	3,05895
54,67	202185,14	75055,95	39703,67	0,31231	-1,16376	3,05045
55,20	202185,14	97598,17	43747,46	0,41829	-0,87159	3,04553
55,68	202185,14	118753,63	44684,75	0,53559	-0,62439	3,04109
56,22	202185,14	142312,50	42290,57	0,70634	-0,34766	3,03610
56,65	202185,14	159689,60	37083,46	0,87264	-0,13623	3,03214
57,62	202185,14	187642,21	19761,84	1,35886	0,30665	3,02325

5. Glu270Met

File: 060505.dsc

Scan-Rate = $v = 60^\circ\text{C/h} = 1 \text{ K/min}$; $Q_t = 217816$; $Q_m = 122842,80$;

$T_m = 55,49^\circ\text{C} = 328,64 \text{ K}$; $C_p^m = 55524,32$

Temp	Q_t	Q	C_p	k	$\ln k$	$(1/T)10^{-3} / \text{K}^{-1}$
53,61	217816	36609,95	30944,36	0,17077	-1,76744	3,06035
54,58	217816	74776,08	47615,41	0,33288	-1,09997	3,05129
55,02	217816	96723,10	53401,03	0,44099	-0,81873	3,04720
55,49	217816	122842,80	55524,32	0,58463	-0,53677	3,04284
56,03	217816	151977,53	52789,33	0,80180	-0,22090	3,03785
56,57	217816	178385,70	43873,50	1,11269	0,10678	3,03288
57,40	217816	205851,50	21994,38	1,83830	0,60884	3,02526

ANHANG

6. Gly126Ala

File: 120505.dsc

Scan-Rate = $\nu = 60^\circ\text{C/h} = 1 \text{ K/min}$; $Q_t = 198217,74$; $Q_m = 113454,08$;

$T_m = 54,18 \text{ }^\circ\text{C} = 327,33 \text{ K}$; $C_p^m = 45590,16$

Temp	Q_t	Q	C_p	k	$\ln k$	$(1/T)10^{-3} / \text{K}^{-1}$
52,23	198217,74	37451,73	27941,51	0,1738	-1,74984	3,07333
53,21	198217,74	71024,41	40380,90	0,3175	-1,14735	3,06410
53,71	198217,74	92306,47	43480,41	0,4105	-0,89029	3,05941
54,18	198217,74	113454,08	45590,16	0,5379	-0,62018	3,05502
54,72	198217,74	137368,59	42756,78	0,7027	-0,35287	3,04999
55,13	198217,74	153907,03	38046,22	0,8586	-0,15242	3,04618
56,07	198217,74	182113,17	20941,45	1,3003	0,26263	3,03748

7. Thr305Glu

File: 090505b.dsc

Scan-Rate = $\nu = 60^\circ\text{C/h} = 1 \text{ K/min}$; $Q_t = 199046,24$; $Q_m = 107203,50$;

$T_m = 55,11 \text{ }^\circ\text{C} = 328,26 \text{ K}$; $C_p^m = 45250,64$

Temp	Q_t	Q	C_p	k	$\ln k$	$(1/T)10^{-3} / \text{K}^{-1}$
53,15	199046,24	33673,49	26287,46	0,158959	-1,83911	3,06466
54,16	199046,24	66714,80	38998,65	0,29470	-1,22178	3,05521
54,67	199046,24	87735,51	43282,85	0,38885	-0,94457	3,05045
55,11	199046,24	107203,50	45250,64	0,49270	-0,70786	3,04637
55,62	199046,24	130007,79	44419,50	0,6434	-0,44099	3,04164
56,05	199046,24	148697,20	40534,01	0,80506	-0,21684	3,03767
57,03	199046,24	180424,71	23666,38	1,27091	0,23974	3,02865

8. Asp302Glu

File: 160505.dsc

Scan-Rate = $\nu = 60^\circ\text{C/h} = 1 \text{ K/min}$; $Q_t = 197862,22$; $Q_m = 118468,24$;

$T_m = 52,52 \text{ }^\circ\text{C} = 325,67 \text{ K}$; $C_p^m = 41916,85$

Temp	Q_t	Q	C_p	k	$\ln k$	$(1/T)10^{-3} / \text{K}^{-1}$
50,63	197862,22	47001,74	30218	0,20030	-1,60792	3,08852
51,51	197862,22	77216,71	38464,31	0,31882	-1,14313	3,08015
52,01	197862,22	97490,75	41336,18	0,41183	-0,88714	3,07541
52,52	197862,22	118468,24	41916,85	0,52796	-0,63873	3,07059
53,09	197862,22	141712,79	38880,85	0,69245	-0,36751	3,06523
53,58	197862,22	159796,68	33307,45	0,87500	-0,13353	3,06063
54,42	197862,22	182466,70	20158,72	1,30939	0,26956	3,05278

ANHANG

9. Asp184Glu

File: 180505.dsc

Scan-Rate = $v = 60^\circ\text{C/h} = 1 \text{ K/min}$; $Q_t = 198730,79$; $Q_m = 112053,23$;

$T_m = 52,42^\circ\text{C} = 325,57 \text{ K}$; $C_p^m = 44659,28$

Temp	Q_t	Q	C_p	k	$\ln k$	$(1/T)10^{-3} / \text{K}^{-1}$
50,51	198730,79	38221,29	28512,62	0,17764	-1,72801	3,08966
51,42	198730,79	69180,17	39108,21	0,30188	-1,19774	3,08100
51,95	198730,79	91386,22	42987,03	0,40046	-0,91515	3,07598
52,42	198730,79	112053,23	44659,28	0,51523	-0,66313	3,07154
52,93	198730,79	134318,21	42441,56	0,65890	-0,41718	3,06673
53,43	198730,79	154397,74	37347,71	0,84243	-0,17146	3,06204
54,33	198730,79	181355,33	22178,30	1,27642	0,24406	3,05362

10. Asn72Phe

File: 220505.dsc

Scan-Rate = $v = 60^\circ\text{C/h} = 1 \text{ K/min}$; $Q_t = 148285,33$; $Q_m = 74455,50$;

$T_m = 43,56^\circ\text{C} = 316,71 \text{ K}$; $C_p^m = 25277,06$

Temp	Q_t	Q	C_p	k	$\ln k$	$(1/T)10^{-3} / \text{K}^{-1}$
41,63	148285,33	30033,62	17380,20	0,14698	-1,91748	3,17682
42,61	148285,33	50065,26	23478,41	0,2390	-1,43113	3,16696
43,12	148285,33	62553,86	25133,72	0,29317	-1,22701	3,16186
43,59	148285,33	74455,50	25277,06	0,34237	-1,07187	3,15716
44,13	148285,33	87914,22	24078,62	0,39884	-0,91919	3,15179
44,57	148285,33	98315,11	22874,37	0,45776	-0,78141	3,14743
45,49	148285,33	117059,62	17926,70	0,5741	-0,55495	3,13834

A. 8. Theoretische Grundlagen

1. Irreversible Denaturierung

Die thermal induzierte Übergang der L-HicDH und ihrer Mutanten sind irreversible und abhängig von der *Scan*-Rate. Dies weist darauf hin, dass die Denaturierung kinetisch kontrolliert wird. Generell ist die thermale Denaturierung von Proteinen ein Begriff, der im Lumry-Eyring Modell diskutiert wird (Lumry and Eyring, 1954). In diesem Modell folgt reversiblen Entfaltungsschritt ein irreversibler Denaturierungsschritt:



wobei N , U und F jeweils die nativen, entfalteten oder teilweise entfalteten, und denaturierten Zustände (oder finalen Zustand) des Proteins sind. Durch das Auftreten einer irreversiblen Teilreaktion kommt es zu keiner Gleichgewichtseinstellung. Somit muss für die Beschreibung

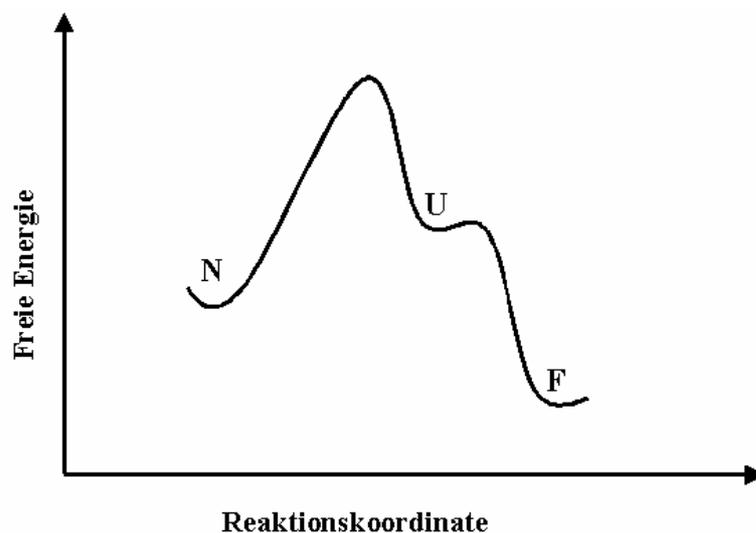


Abbildung A-1. Schematische Darstellung der irreversiblen Denaturierung von Proteinen

ANHANG

der Stabilität die Kinetik betrachtet werden. Nach Gleichung (2) ist die zeitliche Abnahme von N unter stark denaturierenden Bedingungen nur durch die Entfaltung bestimmt (Zale & Klibanov, 1983). Damit reduziert sich Gleichung (1) auf Gleichung (2). Gilt $K_I \gg K_F$, ist für die zeitliche Abnahme von N auch unter schwach denaturierenden Bedingungen nur die Entfaltung geschwindigkeitsbestimmend, und Gleichung (2) kann unter allen Denaturierungsbedingungen zur Beschreibung der Entfaltung verwendet werden. Daher kann die irreversible und Scan-Rate abhängige thermal Entfaltung der L-HicDH und ihrer Mutanten, basierend auf einfachsten so genannten *two-state kinetic model* analysiert werden, obwohl bei diesen Entfaltungsprozessen es sich um Ungleichgewichtsprozesse handelt:



Das *two-state* kinetische Modell ist ein begrenzend Fall des Lumry-Eyring Modells, bei dem nur zwei signifikante populierte makroskopische Zustände (initialer oder nativer Zustand N und der finale oder denaturierte Zustand D) berücksichtigt werden. Der Übergang zwischen den beiden wird durch eine starke temperaturabhängige Geschwindigkeitskonstante (K) der ersten Ordnung bestimmt (Sanchez-Ruiz, 1992; Milardi *et al.*, 1994; Kurganov, *et al.*, 1997; Lyubarev *et al.*, 1998; Lyubarev *et al.*, 1999).

2. Arrhenius Gleichung

Die kinetisch kontrollierten und irreversiblen Prozesse können mit der Arrhenius Gleichung analysiert werden. Die Geschwindigkeitskonstante K kann als eine kinetische Konstante der ersten Ordnung betrachtet werden, die sich nach der Arrhenius Gleichung mit der Temperatursteigerung ändert. Bei den kalorimetrischen Messungen wurde angenommen, dass die Messungen bei einer niedrigen Temperatur gestartet werden, damit die

ANHANG

Reaktionsgeschwindigkeit vernachlässigbar ist und die Konzentration des nativen Zustandes mit der totalen Proteinkonzentration gleich zusetzen ist.

Eine mathematische Ausarbeitung dieses Modells ermöglicht es, die Aktivierungsenergie des kinetischen Prozesses in verschiedener Art und Weise zu berechnen.

Es ist eine bekannte Tatsache, dass eine Steigerung der Temperatur die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht. Diese Beziehung zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und ihrer Temperatur kann durch die Arrhenius Gleichung quantitativ bestimmt werden:

$$K = A e^{-\frac{Ea}{RT}} \quad \text{Gleichung (3)}$$

wobei Ea die Aktivierungsenergie, R Gaskonstante (8.314 J/mol·K), T die absolute Temperatur in Kelvins, und A der Frequenzfaktor ist. Dabei ergibt sich der Frequenzfaktor aus folgender Gleichung:

$$A = p \cdot Z \quad \text{Gleichung (4)}$$

wobei Z die Kollisionsrate und p ein sterischer Faktor ist.

Z erweist sich als nur schwach abhängig von der Temperatur. Daher ist der Frequenzfaktor eine Konstante, die für jede Reaktion spezifisch ist.

Die Arrhenius Gleichung basiert auf der Kollisionstheorie, die annimmt, dass Partikel sowohl mit der korrekten Orientierung als auch mit ausreichender kinetischer Energie kollidieren müssen, damit das Edukt ins Produkt umgesetzt werden kann.

Die Arrhenius Gleichung ist oft in der logarithmischen Form geschrieben:

$$\ln K = -\frac{Ea}{RT} + \ln A \quad \text{Gleichung (5)}$$

Ein Plot von $\ln k$ versus $1/T$ ergibt eine gerade Linie mit der bekannten Form $y = -mx + b$, wobei $x = 1/T$; $y = \ln k$; $m = -Ea/R$; $b = \ln A$.

ANHANG

Die Aktivierungsenergie E_a kann aus der Steigung m der Linie bestimmt werden:

$$E_a = -m \cdot R$$

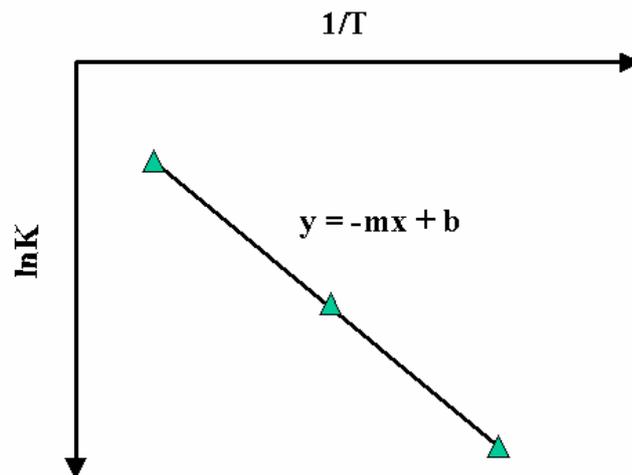
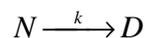


Abbildung A-2. Arrhenius Plot

3. Ermittlung von Aktivierungsenergie E_a : Mathematische Ausarbeitung des kinetischen Modells für die Denaturierung von L-HicDH

Bei Betrachtung der thermal induzierten Denaturierung von L-HicDH und ihrer Mutanten als ein extreme Fall von Lumry-Eyring Modells, bei dem das Protein aus seinem nativen Zustand durch Erhitzen mit einer *Scan*-Rate von v (K/min) in den denaturierten Zustand übergeht, kann dies durch einen kinetische Prozess der ersten Ordnung bestimmt werden:



wobei k eine kinetische Konstante der ersten Ordnung ist, die sich nach der Arrhenius Gleichung mit der Temperatur ändert.

ANHANG

Sanchez-Ruiz *et al.* haben eine mathematische Ausarbeitung von diesem Model durchgeführt, die es ermöglicht, die Aktivierungsenergie auf verschiedenen Wegen zu berechnen (Sanchez-Ruiz *et al.*, 1988).

Um besser zu vergleichen, kann es betrachtet werden, dass es keine netto Wärmekapazitätsänderung bei der Denaturierung gibt. Somit gilt:

$$\Delta_d C_p = C_p (D) - C_p (N) = 0. \quad \text{Gleichung (6)}$$

(A) Für eine bestimmte Temperatur (T), ergibt sich die absolvierte Wärme Q als schraffierter Bereich (Abbildung 2-6). Dieser Wert und die totale Wärme des Prozesses können folgender Maßen formuliert werden:

$$Q = [D]\Delta HV \quad \text{Gleichung (7)}$$

$$Q_t = c \Delta HV \quad \text{Gleichung (8)}$$

wobei [D] die molare Konzentration des denaturierten Zustandes bei der Temperatur T, c die totale molare Konzentration des Proteins in der *Sample*-Zelle, V das Zellvolumen, und ΔH die totale Wärme (Enthalpie) des Prozesses pro Mol Protein ist. Der Q_t -Wert entspricht daher der totalen Fläche unter der Übergangskurve (Abbildung 2-5).

Für einen kinetischen Prozess der ersten Ordnung folgt damit:

$$d [N] / dt = - k [N] \quad \text{Gleichung (9)}$$

Da die Scan-Rate $v = dT / dt$ ist, gilt:

$$k = - \frac{v}{[N]} \frac{d[N]}{dT} \quad \text{Gleichung (10)}$$

ANHANG

wobei $[N]$ die Konzentration des nativen Zustandes bei der Temperatur T ist. Dieser Wert kann auch wie folgt formuliert werden:

$$[N] = c - [D] = (Q_t - Q) / \Delta HV \quad \text{Gleichung (11)}$$

und daher gilt:

$$\frac{d[N]}{dT} = \frac{-1}{\Delta HV} \frac{dQ}{dT} = \frac{-C_p}{\Delta HV} \quad \text{Gleichung (12)}$$

Durch Einsetzen in Gleichung (10) ergibt sich:

$$k = vC_p / (Q_t - Q) \quad \text{Gleichung (13)}$$

Diese Gleichung wurde für die Erzeugung des *Arrhenius Plots* verwendet.

(B) Aus Gleichung (10) und der *Arrhenius* Beziehung kann folgende Gleichung abgeleitet werden:

$$\frac{d \ln[N]}{dT} = -\frac{k}{v} = -\frac{A}{v} \exp(-E/RT) \quad \text{Gleichung (14)}$$

Der Wert von $d^2 \ln [N] / d T^2$ wird die Gleichung erneuert abgeleitet, und ergibt sich:

$$\frac{d^2 \ln[N]}{dT^2} = -\frac{A}{v} \frac{E}{RT^2} \exp(-E/RT) = \frac{E}{RT^2} \frac{d \ln[N]}{dT} \quad \text{Gleichung (15)}$$

aber auch

$$\frac{d^2 \ln[N]}{dT^2} = \frac{1}{[N]} \frac{d^2[N]}{dT^2} - \frac{1}{[N]^2} \left(\frac{d[N]}{dT} \right)^2 \quad \text{Gleichung (16)}$$

ANHANG

Wird Gleichung (12) nach C_p umgestellt, erhält man:

$$C_p = -V\Delta H \frac{d[N]}{dT} \quad \text{Gleichung (17)}$$

gilt $T = T_m$, ergibt sich $dC_p/dT = 0$ und daher $|d^2[N]/dT^2|_{T=T_m} = 0$.

Werden die Gleichung (15) und (16) zusammengefasst (für $T = T_m$) erhält man Gleichung (18):

$$\frac{E}{RT^2} \frac{1}{[N]} \left(\frac{d[N]}{dT} \right)_{T_m} = \frac{1}{[N]^2} \left(\frac{d[N]}{dT} \right)_{T_m}^2 \quad \text{Gleichung (18)}$$

oder

$$\frac{E}{RT^2} = - \left(\frac{d \ln[N]}{dT} \right)_{T_m} \quad \text{Gleichung (19)}$$

Unter Berücksichtigung der Gleichung (14) erhält man aus der Gleichung (19) die Gleichung (20):

$$\frac{v}{T_m^2} = \frac{AR}{E} \exp(-E/RT_m) \quad \text{Gleichung (20)}$$

Mit der damit erhaltenen Gleichung (20) kann die Aktivierungsenergie berechnet werden.

(C) Die Ableitung der Gleichung (14) innerhalb einer Gleichung, die die Konzentration des nativen Zustandes als eine Funktion der Temperatur beinhaltet, benötigt die Berechnung des sogenannten Arrhenius Integrals. Dies muss zahlenmäßig abgeleitet (Norris, 1981) oder durch einige Annäherungen ausgeführt werden. Da T_m für jede Temperatur durch $T = T_m + \Delta T$ in Bezug gebracht werden kann, und sich die *Taylor*-Expansion von $1/T$ aufgrund des kalorimetrischen Übergangs $\Delta T \ll T_m$ auf $1/T_m$ vereinfacht, ergibt sich die Gleichung (21):

$$1/T = 1/T_m + (d(1/T)/dT)_{T_m}(T - T_m) = 1/T_m - \Delta T / T_m^2 \quad \text{Gleichung (21)}$$

ANHANG

Durch Einsetzen von Gleichung (21) in Gleichung (14) und Verwenden von Gleichung (20) bekommt man:

$$D \ln [N] / d T = - A / v \exp(- E / R T_m) \exp[(E / R T_m^2) \Delta T] = - W \exp(W \Delta T) \quad \text{Gleichung (22)}$$

wobei $W = A / v \exp(- E / R T_m) = E / R T_m^2$ (siehe Gleichung 20) ist.

Nach Integration mit $\Delta T_0 = T_0 - T_m$, wobei T_0 vernachlässigbare Größe ist, erhält man:

$$\ln [N] / [N]_0 = \exp (W \Delta T_0) - \exp (W \Delta T) \quad \text{Gleichung (23)}$$

Wenn T_0 genug niedrig ist, gilt für den Temperatur-Bereich des kalorimetrischen Übergangs: $\exp (W \Delta T) \gg \exp (W \Delta T_0)$ (Achtung $\Delta T_0 < 0$), ergibt sich:

$$\ln \frac{[N]_b}{[N]} = \exp(W \Delta T) = \exp \left[\frac{E}{R} \left(\frac{T - T_m}{T_m^2} \right) \right] \quad \text{Gleichung (24)}$$

Somit wird unter Verwendung von Gleichung (7 und 8) nach folgende Gleichung erhalten:

$$\frac{[N]_b}{[N]} = \frac{Q_t}{Q_t - Q} \quad \text{Gleichung (25)}$$

Unter Berücksichtigung des engen Bereiches des Übergangs $(T - T_m)/T_m^2 = 1/T_m - 1/T$ (Gleichung 21), bekommt man anschließend

$$\ln \left(\ln \frac{Q_t}{Q_t - Q} \right) = \frac{E}{R} \left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right) \quad \text{Gleichung (26)}$$

Für $T = T_m$ vereinfacht sich die Gleichung(26) zu:

$$\ln \frac{Q_t}{Q_t - Q} = 1 \quad \frac{Q_t}{Q_t - Q} = e \quad \text{Gleichung (27)}$$

(D) Bei $T = T_m$ unter Berücksichtigung der Gleichung (14) und (20), ergibt sich die Gleichung (13) zu:

$$\frac{vC_{pm}}{Q_t - Q_m} = \frac{Ev}{RT_m^2} \quad \text{Gleichung (28)}$$

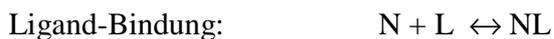
Durch Einsetzen von Gleichung (28) und Anwendung der Gleichung (27) bekommt man anschließend:

$$E = \frac{RT_m^2 C_{pm}}{Q_t - Q_m} = \frac{eRT_m^2 C_{pm}}{Q_t} \quad \text{Gleichung (29)}$$

Obwohl diese mathematische Ausarbeitung unterschiedlichen Annäherungen und verschiedenen experimentalen Informationen enthält, wurde es bis heute von dem Biowissenschaftler verwendet, die Aktiveierungsenergie des kinetischen Prozesses zu ermitteln.

4. Effekt der Ligand-Bindung auf die Faltungsthermodynamik

Das Prinzip von Le Chatelier impliziert, dass wenn ein Ligand vorzugsweise an ein gefaltetes Protein bindet, sich die Faltung des Proteins stabilisiert und die Entfaltung wird stufenweise mit steigender Ligand-Konzentration reduziert. Umgekehrt gilt, dass die vorzugsweise an das entfaltete Protein bindenden Liganden die Faltung destabilisieren und die Entfaltung stärken. Für den einfachen Fall, dass ein Ligand-Molekül (L) spezifisch nur an dem nativen gefalteten Protein (N) bindet, gilt das folgende Gleichgewicht:



$$K_{L,N} = [N][L] / [NL] \quad \text{Gleichung (30)}$$

ANHANG

Entfaltung: $N \leftrightarrow U$

$$K_0 = [U] / [N] \quad \text{Gleichung (31)}$$

wobei $K_{L,N}$ die Dissoziationskonstante für die Ligand-Bindung an das nativen Protein und K_0 die Gleichgewichtskonstante der Entfaltung für ein Protein ohne Ligand ist.

Bei der Anwesenheit von Ligand wird die effektive Gleichgewichtskonstante der Entfaltung (K_{unf}) durch das Verhältnis der totalen Konzentration von entfaltenen und gefalteten Spezies gebildet:

$$K_{\text{unf}} = [U] / [N] + [NL] = K_0 / (1 + [L] / K_{L,N}) \approx K_0 \cdot K_{L,N} / [L] \quad \text{Gleichung (32)}$$

Die grobe Form gilt bei einer hohen Konzentration an freien Liganden. Sie zeigt dass K_{unf} sinkt und die gefaltete Form mit steigender Ligand-Konzentration noch stabiler wird.

Als freie Energie angegeben, gilt:

$$\begin{aligned} \Delta G_{\text{unf}} &= -RT \cdot \ln(K_{\text{unf}}) = \Delta G_{\text{unf},0} + RT \cdot \ln(1 + [L] / K_{L,N}) \\ &\approx \Delta G_{\text{unf},0} + \Delta G^{\text{O}}_{\text{diss},N} + RT \cdot \ln[L] \quad (\text{für hohen } [L]) \quad \text{Gleichung (33)} \end{aligned}$$

wobei $\Delta G_{\text{unf},0}$ die freie Energie der Entfaltung des Proteins ohne Ligand und $\Delta G^{\text{O}}_{\text{diss},N} = -RT \cdot \ln(K_{L,N})$ die Standard Gibbsche freie Energie für die Dissoziation des Ligands aus seinen Bindungsstellen am nativen Protein ist. Daher kann der Stabilisierungseffekt von gebundenen Liganden veranschaulicht werden. Es ergibt sich aus der zusätzlichen freien Energie, die benötigt wird, um den Liganden vor der Entfaltung abzulösen, und dem zusätzliche Beitrag ($RT \cdot \ln[L]$) aus der Entropie der Mischung der frei gelassenen Liganden und dem Lösungsmittel.

ANHANG

Bei naher der hohen Ligand-Konzentration kann die freie Energie in Enthalpie und Entropie folgender Maßen geteilt werden:

$$\Delta H_{\text{unf}} \approx \Delta H_{\text{unf},0} + \Delta H^{\text{O}}_{\text{diss},N} \quad \text{Gleichung (34)}$$

und
$$\Delta S_{\text{unf}} \approx \Delta S_{\text{unf},0} + \Delta S^{\text{O}}_{\text{diss},N} - R \cdot \ln[L] \quad \text{Gleichung (35)}$$

wobei ΔH_{unf} die Enthalpieänderung der Entfaltung des Proteins, $\Delta H_{\text{unf},0}$ die Enthalpieänderung der Entfaltung des Proteins ohne Ligand, $\Delta H^{\text{O}}_{\text{diss},N}$ die Standard Enthalpieänderung für die Dissoziation des Ligands aus seinen Bindungsstellen am nativen Protein ist. ΔS_{unf} ist die Entropieänderung der Entfaltung des Proteins, $\Delta S_{\text{unf},0}$ ist die Entropieänderung der Entfaltung des Proteins ohne Ligand, $\Delta S^{\text{O}}_{\text{diss},N} - R \cdot \ln[L]$ ist die Standard Entropieänderung für die Dissoziation des Ligands aus seinen Bindungsstellen am nativen Protein.

Für kleine Liganden kann die Wärme der Dissoziation im Vergleich zur Wärme der Entfaltung des Proteins ziemlich gering, und damit, im kalorimetrischen Experiment schwer zu differenzieren sein. Besonders wenn ΔH_{unf} wegen ΔC_P -Effekts mit Temperatur variierend ist, ist die Wärme der Dissoziation des Ligands schwer zu differenzieren. Der Entropie-Effekt, besonders der aus der Größe der Ligand-Mischung ($R \cdot \ln[L]$) entstehende Anteil, wird in diesen Fall sehr entscheidend.

Der Effekt der Ligand-Bindung (entweder an N oder U) von Proteinen bei T_m im Fall schwach bindender Liganden wie folgt verallgemeinert werden:

$$\Delta T_m/T_m = \pm (nRT_{m0}/\Delta H_{\text{unf},0}) \cdot \ln(1 + [L]/K_L) \quad \text{Gleichung (36)}$$

wobei $\Delta T_m = T_m - T_{m0}$ die Verschiebung der Übergangstemperatur der Entfaltung und n die Anzahl der Ligand-Bindungsstellen an das Protein (identisch angenommen) sind. Das Zeichen \pm zeigt ob der Ligand die gefaltete oder entfaltete Form stabilisiert.

Bei geringer Konzentration schwach bindender Liganden ($[L]/K_L \leq 1$) wird eine annähernd lineare Ligand-Konzentration erhalten:

ANHANG

$$\Delta T_m / T_m \approx \pm nRT_{m0} [L] / (K_L \cdot \Delta H_{\text{unf } 0}) \quad \text{Gleichung (37)}$$

Man muss beachten, dass die T_m -Verschiebung mit steigender Ligand-Konzentration sogar über den Wert steigen kann, bei dem die Proteine vollständig an Ligand gebunden sind. Dies ist eine Erscheinungsform der dominanten Entropie-Beiträge von Mischungen auf die bereits eingegangen wurde.

ANHANG

A. 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1. Die gesamte Topologie von einem L-HicDH Monomer	9
Abbildung 1-2. Tetramer der L-HicDH	10
Abbildung 1-3. Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus der L-HicDH (Niefind <i>et al.</i> , 1995). His198, Asp171 und Arg174 bilden eine katalytische Triade.	12
Abbildung 1-4. Die Reaktion von 2-Oxoisocaproat zu Leucin.	13
Abbildung 1-5. Energieschema für die Änderung der freien Energie der Entfaltung.	22
Abbildung 1-6. Arbeit und Wärme	27
Abbildung 2-1. T7-Expressionssystem (Bildquelle: Novagen)	44
Abbildung 2-2. Roti®-Mark 10-150 von der Firma Roth.....	49
Abbildung 2-3. Das Gerät VP-DSC-Microkalorimeter der Firma MicroCal.....	53
Abbildung 2-4. Aufbau eines typischen DSC (adaptiert aus Alan Cooper, 2000).....	54
Abbildung 2-5. DSC-Daten in <i>worksheet</i>	58
Abbildung 2-6. Die totale Wärme-Energie-Aufnahme der Probe wird durch die Fläche unter dem Thermogram-Peak integriert	59
Abbildung 2-7. Die Wärme-Energie-Aufnahme (Q) der Probe bei einer bestimmten Temperatur (T) wird durch die Fläche unter dem Thermogram-Peak integriert	59
Abbildung 3-1. Analytisches Gel für das Plasmid pET-3d.	61
Abbildung 3-2. PstI-SmaI-Spaltung des Plasmides pET-SmaI.....	62
Abbildung 3-3. Analytisches Gel: NcoI-/SmaI-Spaltung des Plasmides pET-L-HicDH	63
Abbildung 3-4. SDS-Polyacrylamidgele für die Wild-Typ L-HicDH und ihre Mutanten.....	69
Abbildung 3-5. Enzymaktivitätskurve der Wild-Typ L-HicDH bei 30°C und verschiedenen pH-Werten	70
Abbildung 3-6. Enzymaktivitätskurve der Wild-Typ L-HicDH bei verschiedenen Temperaturen.....	71
Abbildung 3-7. Enzym-Aktivität der Wild Typ L-HicDH und ihrer Mutanten bei unterschiedlichen pH-Bedingungen	73
Abbildung 3-8. Vergleich der enzymatischen Effizienzen der Wild-Typ L-HicDH und ihrer Mutanten, charakterisiert durch die K_{cat}/K_M -Werte.....	75
Abbildung 3-9. Die Thermostabilität der Wild-Typ L-HicDH bei verschiedenen pH-Werten mit verschiedenen Konzentrationen von NADH.....	76
Abbildung 3-10. Schmelzpunkte (T_m) der L-HicDH und ihrer Mutanten bei pH 6.0, pH 7.0 und pH 8.0	81
Abbildung 3-11. Enthalpieänderung der L-HicDH und ihrer Mutanten bei pH 6.0, pH 7.0 und pH 8.0	82
Abbildung 3-12. Reproduzierbarkeit der DSC-Messungen bei gleichen Bedingungen.	83
Tabelle 3-9. Übereinstimmung der DSC- und CD-Messung im gleichen Puffer.....	84
Abbildung 3-13. DSC-Messung der Mutante Thr305Glu in 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0	85
Abbildung 3-14. CD-Messung von Mutante Thr305Glu in 5 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.0	85

ANHANG

Abbildung 3-15. DSC-Messung von Mutante Asp327Lys in 5 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.0	86
Abbildung 3-16. CD-Messung von Mutante Asp327Lys in 5 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.0	86
Abbildung 3-17. DSC-Messung von Mutante Asp327Lys in 5 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 8.0	87
Abbildung 3-18. CD-Messung von Mutante Asp327Lys in 5 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 8.0	87
Abbildung 3-19. DSC-Messung der Wild-Typ L-HicDH in 5 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.0	88
Abbildung 3-20. CD-Messung der Wild-Typ L-HicDH in 5 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.0	88
Abbildung 3-21. Abhängigkeit der thermal induzierten Entfaltung von der Scan-Rate bei der DSC-Messung der Wild-TypL-HicDH.....	89
Abbildung 3-22. Überlagerung der DSC-Spektren der Entfaltung der Wild-Typ L-HicDH bei unterschiedlichen <i>Scan-Rate</i>	90
Abbildung 3-23. Die thermale Denaturierung der Wild-Typ L-HicDH bei pH 7.0 zeigt einen typischen exothermen Spur direkt nach dem endothermen Entfaltungspeak bei hohen Temperatur	91
Abbildung 3-25. Arrhenius Plot der DSC-Daten mit unterschiedlichen Scan-Raten.	94
Abbildung 3-26. Plot von $\ln [\ln Q_t / (Q_t - Q)]$ versus $1/T$	95
Abbildung 3-27. Vergleich der Aktivierungsenergie der Wild-Typ L-HicDH und ihrer Mutanten	99
Abbildung 4-1. Irreversible Denaturierung von Protein durch Aggregation	114
Abbildung A-1. Schematische Darstellung der irreversiblen Deanturierung von Proteinen ..	154
Abbildung A-2. Arrhenius Plot	157

ANHANG

A. 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1. Proteinfaltung, Interaktion und Stabilität vermittelnde Kräfte.....	15
Tabelle 2-1. Verwendete Geräte	30
Tabelle 2-2. Oligonukleotide für die Mutagenese, Sequenzierung des Gens und Sequenzierung am Mutationsort.....	34
Tabelle 2-3. Verwendete Kits	36
Tabelle 3-1. Aminosäure-Atom-Potentiale und Torsionswinkel-Potential nach Austausch von Aminosäuren in den Mutanten.....	66
Tabelle 3-2. Enzymaktivität (spezifische Aktivität: U/mg) der Wild-Typ L-HicDH bei verschiedenen pH-Werten	70
Tabelle 3-3. Enzymaktivität (spezifische Aktivität: U/mg) der Wild-Typ L-HicDH bei verschiedenen Temperaturen	71
Tabelle 3-4. Enzymaktivität (spezifische Aktivität: U/mg) der L-HicDH und ihrer Mutanten bei verschiedenen pH-Bedingungen	72
Tabelle 3-5. Kinetische Parameter der L-HicDH Wild-Typ und ihrer Mutanten	74
Tabelle 3-6. Mit DSC gemessenen T_m -Werte der Wild-Typ L-HicDH bei verschiedenen pH-Werten mit verschiedenen Konzentration von NADH.....	76
Tabelle 3-7. Thermostabilitätsparameter der L-HicDH und ihrer Mutanten	77
Tabelle 3-8. Der Durchschnittswert der drei Messungen	80
Tabelle 3-9. Übereinstimmung der DSC- und CD-Messung im gleichen Puffer.....	84
Tabelle 3-10. <i>Scan-Rate</i> und T_m von DSC-Messungen der Entfaltung des L-HicDH Wild-Typ-Proteins	90
Tabelle 3-11. Ermittlung der Aktivierungsenergie der Wild-Typ L-HicDH mittels Arrhenius-Analyse	96
Tabelle 3-12. Bestimmung der Aktivierungsenergie der Mutanten aus der Arrhenius-Analyse mit verschiedenen Methoden	97
Tabelle 3-13. Durchschnittswerte der Daten aus CUPSAT.....	103
Tabelle 4-1. Häufigkeit der Aminosäurereste an den Mutationsstellen (Aus ProTherm)	119
Tabelle 4-2. Häufigkeit der ausgewählten Mutanten in ProTherm	119
Tabelle A-1. Bestimmung der Enzymaktivität	142
Tabelle A-2 Mess-Daten der Enzymaktivität der Wild-Typ L-HicDH bei verschiedenen Temperaturen	143
Tabelle A-3 Mess-Daten der Enzymaktivität der Wild-Typ L-HicDH bei verschiedenen pH-Werten	143

A. 11. Vorabveröffentlichungen

A. 12. Erklärung

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 oben 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. Dietmar Schomburg betreut worden.

Bao Lide

ANHANG

A. 13. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Bao Lide (Bold Sharnod)
Geschlecht: männlich
Geburtsdatum: 23. Dezember 1961
Geburtsort: West Ujumqin, die Innere Mongolei, VR China
Familienstand: verheiratet, ein Kind
Staatsangehörigkeit: chinesisch

Schulbildung

Sept. 1970 - Juli 1975 Grundschole in West Ujumqin
Sept. 1975 - Juli 1980 Mittelschole in West Ujumqin

Studium

Sept. 1980 - Juli 1985 Pädagogische Universität der Inneren Mongolei
Studienfach: Biologie
Juli 1992 - Sept. 1993 Masterstudium an der Universität Wuhan
Studienfach: Biochemie
März 1998 - Sept. 1999 Deutschkurs für ausländischen Studenten
an der Universität Bonn
Mai 2000 - Juni 2006 Promotionsstudium an dem Institut für Biochemie,
Universität zu Köln

Berufliche Tätigkeiten

Juli 1985 - Mai 1989 Biologielehrer an dem mongolischen Gymnasium
der Stadt Hohhot
Mai 1989 - März 1994 Professorassistent an der Fakultät Biologie der
Pädagogischen Hochschule der Inneren Mongolei
März 1994 - Nov. 1997 Dozent für Biochemie an der pädagogischen
Hochschule der Inneren Mongolei
Januar 2002 - März 2004 wissenschaftlicher Mitarbeiter an dem Institut für
Biochemie, Universität zu Köln